



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Evaluación de resistencia y biosorción de metales
pesados en levaduras nativas aisladas de lagunas
altoandinas contaminadas con relaves mineros**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

AUTOR

Tito Libio SÁNCHEZ ROJAS

ASESOR

Dr. Pablo Sergio RAMÍREZ ROCA

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Sánchez, T. (2020). *Evaluación de resistencia y biosorción de metales pesados en levaduras nativas aisladas de lagunas altoandinas contaminadas con relaves mineros*. Tesis para optar grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Unidad de Posgrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIA:

TESIS DOCTORAL: TITO LIBIO SÁNCHEZ ROJAS- Código Renacyt: P0002130

➤ CODIGO ORCID DEL AUTOR: 0000-0003-3853-2128

➤ CODIGO ORCID DEL ASESOR: 0000-0001-9309-7021

➤ DNI del autor: 08550935

➤ GRUPO DE INVESTIGACIÓN:

INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS
AGROINDUSTRIALES Y AMBIENTALES (titular).
GENOMICA FUNCIONAL DE MICROORGANISMOS Y BIORREMEDIACIÓN (colaborador).

➤ Instituciones que financiaron: Convenio N° 391-PNICP-PIAP-2014-Innovate Perú.
VRIP – UNMSM. Fondos de tesis doctoral, con código B17100046a.

➤ Ubicaciones geográficas- **Coordenadas UTM - 18L GWS 84:**

LIMA: Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM

Lago JUNÍN. Este: 363858; Sur: 8790283

Relavera Yanamate. Este: 363540; Sur: 8814894

Relavera Quiulacocha. Este: 359466; Sur: 8816540

➤ **Años de Investigación (2008-2010; 2016-2019)**



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú. Decana de América



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 047-UPG-FCB-2019

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO
ACADEMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Siendo las...16:05... horas del día 16 de enero de 2020 en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado de Tesis presidido por el:

Dr. Pedro Luis Castellanos Sánchez	(Presidente)
Dr. Abad Flores Paucarima	(Miembro)
Dr. Dan Erick Vivas Ruíz	(Miembro)
Dr. Pablo Sergio Ramírez Roca	(Asesor)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas, que solicitara el Señor Magíster Don **TITO LIBIO SÁNCHEZ ROJAS**.

Después de darse lectura al Expediente N° 047-UPG-FCB-19, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, receptionaron la exposición de la Tesis Titulada:

“EVALUACIÓN DE RESISTENCIA Y BIOSORCIÓN DE METALES PESADOS EN LEVADURAS NATIVAS AISLADAS DE LAGUNAS ALTOANDINAS CONTAMINADAS CON RELAVES MINEROS”, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú. Decana de América

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: *Muy Bueno con la nota de 18*

A continuación el Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas al Magíster **TITO LIBIO SÁNCHEZ ROJAS**.

Siendo las... *18:30* se levantó la Sesión, recibiendo el graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, el día jueves 16 del mes de enero del año 2020.

Pedro Luis Castellanos Sánchez

Dr. Pedro L. Castellanos Sánchez
Profesor Principal a T.C.
PRESIDENTE

Pablo S. Ramírez Roca

Dr. Pablo S. Ramírez Roca
Profesor Principal a D.E.
ASESOR
RENACYT P0012460

Abad Flores Paucarima

Dr. Abad Flores Paucarima
Profesor Principal a D.E.
MIEMBRO

Dan Erick Vivas Ruíz

Dr. Dan Erick Vivas Ruíz
Profesor Asociado T.C.
MIEMBRO
RENACYT P0004721

DEDICATORIAS

A mis amados y entrañables padres Absalón y Amanda que siempre están acompañándome desde su lecho eterno.

A mis hermanos Selfida, Marco, Carlos, Marina y Luis.

A todos mis seres queridos y familiares por su apoyo permanente y ser el estímulo de cada día. Especialmente a Katherine por ser mi compañera y amiga, a mi hija Claudia, por ser su perseverancia y fortaleza.

A mis amigos y compañeros de siempre, mis agradecimientos eternos.

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto “*Monitoreo y Evaluación de la calidad del agua en cabecera de cuenca del Río Rímac, lagos y lagunas de la Región Central del Perú para determinar organismos indicadores y marcadores moleculares de contaminación por metales pesados*” financiado por el Fondo para la Innovación, Ciencia y Tecnología (FINCyT), Convenio N° 391-PNICP-PIAP-2014-Innovate Perú. Por el apoyo financiero, materiales reactivos y equipamiento de nuestro laboratorio.

Al Vicerrectorado de investigación y Postgrado (VRIP) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por los fondos de tesis doctoral, con código B17100046a.

A mi asesor Dr. Pablo Sergio Ramírez Roca, por sus sugerencias constructivas y apoyo en la ejecución de la presente tesis.

Al Dr. Leo Kei Iwai investigador del Laboratorio Especializado de Toxicología Aplicada-LETA del Instituto Butantan de Sao Paulo, Brasil y Mg. Fabio Montoni por su apoyo en la pasantía para procesar proteínas de levaduras para el análisis por espectrometría de masas. A mi colega y amigo Dr. Abad Flores Paucarima por su apoyo permanente y consejos en la ejecución de la tesis.

A mis colegas Abraham Espinoza Culupú y Marcos Sulca por su apoyo en el manejo de datos sobre espectrometría de masas y secuenciamiento de proteínas. A Diego Macedo, por el soporte informático en la configuración de gráficas, figuras y tablas de la presente tesis. A Magerlyn, Isabel, Diana, Keny, Ana Paula, Gian Pool, Kevin, Lee, Julio, Valeria tesisistas y miembros del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

Mi agradecimiento a todos los miembros del Jurado de mi Tesis Doctoral. Dr. Pedro Castellanos Sánchez, presidente del jurado, al Dr. Dan Vivas Ruíz por sus contribuciones y facilidades en la corrección de la presente tesis. Así mismo al Dr. Abad Flores Paucarima.

Finalmente, nuestros agradecimientos al Dr. Alberto Paradela por el servicio realizado en el análisis de proteínas en *Yarrowia Lipolytica* AMJ6, en el laboratorio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Madrid - España.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE	i
ÍNDICE DE TABLAS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Metales pesados.....	4
2.1.1 Definición.....	4
2.1.2 Generalidades de los metales.....	4
2.1.3 Toxicidad celular de los metales pesados.....	10
2.1.4 Detoxificación celular de metales	12
2.1.5 Proteínas y polipéptidos queladores de metales pesados	17
2.1.6 Biosorción de metales.....	24
2.1.7 Contaminación metálica de suelos y aguas	27
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	29
3.1 Hipótesis	29
3.2 Objetivos	29
3.2.1 Objetivo general	29
3.2.2 Objetivos específicos.....	29
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	30
4.1 Metodología de trabajo.....	30
4.1.1 Muestreo y aislamiento de levaduras de aguas y suelos.....	30
4.1.2 Evaluación del crecimiento de las muestras de Pacococha a diferentes pH.....	34
4.1.3 Aislamiento y selección de colonias.....	34
4.1.4 Preparación de la solución estándar de los metales utilizados	34
4.1.5 Prueba de resistencia a metales pesados y /o CMI.....	35
4.1.6 Caracterización molecular de las cepas resistentes a metales pesados.....	35

	Pág.
4.1.6.1 Extracción de DNA genómico.....	35
4.1.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región D1/D2 LSU	37
4.1.6.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa	37
4.1.6.4 Secuenciación e identificación molecular	37
4.1.6.5 Cinética de crecimiento y Concentración Letal Media (CL ₅₀).....	38
4.1.6.6 Biosorción de metales pesados.....	39
4.1.6.7 Obtención de biomasa y extracción de proteínas totales.....	39
4.1.6.8 Digestión de proteínas y marcaje con Itraq-8-plex.....	40
4.1.6.9 Cromatografía líquida y análisis de espectrometría de masas.....	41
4.1.6.10 Análisis de datos y estadística de proteínas.....	41
V. RESULTADOS	43
5.1 Georreferenciación y parámetros fisicoquímicos de las lagunas muestreadas...	43
5.2 Crecimiento de las muestras en caldo YPG a diferentes valores de pH.....	50
5.3 Aislamiento de levaduras extremófilas en medio sólido YPG	52
5.3.1 Levaduras de la laguna Pacococha.....	52
5.3.2 Coloración de las colonias aisladas de la laguna Pacococha.....	55
5.3.3 Características macroscópicas y microscópicas de otras levaduras	59
5.4 Crecimiento de levaduras a diferentes concentraciones de metales	69
5.5 Aislamiento de muestras de tierra y agua del lago Junín y Ancash	75
5.6 Resultados de identificación molecular.....	83
5.6.1 Electroforesis en agarosa al 1% de los amplicones de levaduras.....	83
5.6.2 Identificación molecular y filogenia de levaduras.....	84
5.7 Cinética de crecimiento	91
5.7.1 Cinética de crecimiento de <i>Yarrowia lipolytica</i> AMJ3 y AMJ6	91
5.7.2 Cinéticas de crecimiento con cobre y cromo de las cepas	91
5.8 Ensayo de citotoxicidad- Concentración Letal Media (CL ₅₀)	92

	Pág.
5.9 Biosorción de metales.....	94
5.10 Electroforesis en SDS-PAGE de las proteínas de <i>Y. lipolytica</i> AMJ6	100
5.11 Proteínas reguladas encontradas bajo el tratamiento con iones metálicos.	101
5.11.1 Proteínas expresadas bajo el tratamiento con iones cromo	101
5.11.2 Proteínas expresadas bajo el tratamiento con iones cadmio.....	103
5.11.3 Proteínas expresadas bajo el tratamiento con iones cobre.....	104
VI. DISCUSIÓN	106
VII. CONCLUSIONES	117
VIII. RECOMENDACIONES	118
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
X. ANEXOS	127
Anexo 1: Proteínas expresadas con regulación diferenciada, mayor y menor expresión (Up and Down) sometidas al tratamiento con ión Cr ⁻⁶	127
Anexo 2: Cuantificación relativa en los cambios de abundancia de proteínas en <i>Yarrowia lipolytica</i> frente al tratamiento con cromo.....	128
Anexo 3: Proteínas expresadas con regulación diferenciada, alta y menor expresión (Up and Down) sometidas al tratamiento con ión Cd ⁺²	129
Anexo 4: Cuantificación relativa en los cambios de abundancia de proteínas en <i>Yarrowia lipolytica</i> frente al tratamiento con cadmio	130
Anexo 5: Proteínas expresadas con regulación diferenciada, alta y menor expresión (Up and Down) sometidas al tratamiento con ión Cu ⁺²	131
Anexo 6: Cuantificación relativa en los cambios de abundancia de proteínas en <i>Yarrowia lipolytica</i> frente al tratamiento con ión cobre.....	132
Anexo 7: Resumen de los resultados de las proteínas encontradas bajo el tratamiento con iones metálicos	133
Anexo 8: Resultados del análisis de metales pesados de las muestras obtenidas de cuerpos de agua altoandinos de Pasco y Junín.....	134

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla N° 1: Medición del pH <i>in situ</i> de las muestras de aguas y tierra contaminadas con efluentes mineros de la laguna Pacococha, Huancavelica.....	43
Tabla N° 2: Parámetros fisicoquímicos de cuerpos de agua altoandinos de la Región Junín, Pasco y cabecera de cuenca del Rímac-Georreferenciados (junio, 2015).....	45
Tabla N°3: Caracterización fisicoquímica de cuerpos de agua altoandinos de la Región Junín, Pasco y cabecera de cuenca del río Rímac-Georreferenciados (octubre, 2015).....	47
Tabla N°4: Caracterización fisicoquímica de relaveras altoandinas de la Región Junín, Pasco y cabecera cuenca del río Rímac impactadas con relaves mineros (junio, 2015)	48
Tabla N°5: Condiciones fisicoquímicas del lago Junín y lagunas impactadas de la Región Junín, Pasco y cabecera de cuenca del río Rímac (octubre, 2015).....	49
Tabla N° 6: Resultados de los cultivos de muestras de agua y suelos contaminadas con relaves mineros de la laguna Pacococha en caldo YPG a pH 2.....	50
Tabla N° 7: Resultados de los cultivos de muestras de agua y suelos contaminadas con relaves mineros de la laguna Pacococha en caldo YPG a pH 3.....	50
Tabla N° 8: Resultados de los cultivos de muestras de agua y suelos contaminadas con relaves mineros de la laguna Pacococha en caldo YPG a pH 4.....	51
Tabla N° 9: Resultados de los cultivos de muestras de agua y suelos contaminadas con relaves mineros de la laguna Pacococha en caldo YPG a pH 5.....	51
Tabla N° 10: Resultados de los cultivos de muestras de agua y suelos contaminadas con relaves mineros de la laguna Pacococha en caldo YPG a pH 6.....	52
Tabla N° 11: Resultado del cultivo de las muestras de Pacococha en agar YPG a pH 3.5	53
Tabla N° 12: Microorganismos aislados de relaveras ubicadas en Cerro de Pasco	56
Tabla N° 13: Microorganismos aislados de lagunas altoandinas de cabecera de cuenca (Junin, Pasco y Lima), en la primera salida, junio 2015	57
Tabla N° 14: Microorganismo aislados de relaveras y lago Junín en la segunda salida de campo octubre del 2016.	58
Tabla N° 15: Evaluación del crecimiento y/o CMI de levaduras con iones Cr ⁺⁶	69
Tabla N° 16: Evaluación del crecimiento y/o CMI de levaduras con iones Zn ⁺²	70
Tabla N° 17: Evaluación del crecimiento y/o CMI de levaduras con iones Hg ⁺²	70

	Pág.
Tabla N° 18: Evaluación del crecimiento y/o CMI de levaduras con iones Co^{+2}	71
Tabla N° 19: Evaluación del crecimiento y/o CMI de levaduras con iones Ba^{+2}	72
Tabla N° 20: Evaluación del crecimiento y/o CMI de levaduras con iones V^{+2}	72
Tabla N° 21: Evaluación del crecimiento y/o CMI de levaduras con iones Pb^{+2}	73
Tabla N° 22: Evaluación del crecimiento de levaduras de de la laguna Pacococha en caldo YPG con cuatro metales pesados a diferentes concentraciones.	74
Tabla N° 23: Resultado del crecimiento en caldo YPG de las muestras de suelos y aguas del lago Junín y San Cristóbal	75
Tabla N° 24: Características culturales de colonias levaduriformes aisladas de muestras de suelos del lago Junín y afluentes	76
Tabla N° 25: Características culturales de colonias levaduriformes aisladas de muestras de aguas del lago Junín y afluentes	77
Tabla N° 26: Crecimiento de levaduras aisladas del lago Junín y afluentes, sembradas en agar YPG con diferentes metales (100 ppm)	78
Tabla N° 27: Crecimiento de levaduras aisladas del lago Junín y afluentes, sembradas en agar YPG con diferentes metales (200 ppm)	79
Tabla N° 28: Crecimiento de levaduras aisladas del lago Junín y afluentes, sembradas en agar YPG con diferentes metales (400 ppm).....	80
Tabla N° 29: Crecimiento de levaduras aisladas del lago Junín y afluentes, sembradas en agar YPG con diferentes metales (600 ppm).....	81
Tabla N° 30: Muestras de aguas de la mina San Cristóbal-Huaraz sembradas en Agar YPG .	82
Tabla N° 31: Crecimiento de las levaduras aisladas de aguas de mina San Cristóbal, diferentes concentraciones de iones metálicos: 100, 200, 400 y 600 ppm.....	82
Tabla N° 32: Resultados del análisis de 6 secuencias de levaduras ambientales de la laguna Pacococha Castrovirreyna-Huancavelica.	88
Tabla N° 33: Levaduras nativas aisladas de Junín y Pasco identificadas molecularmente	90
Tabla N° 34: Porcentaje de biosorción de cobalto.....	96
Tabla N° 35. Porcentaje de biosorción de zinc	97
Tabla N° 36. Porcentaje de biosorción de cobre.....	98
Tabla N° 37. Porcentaje de biosorción de cromo	99

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura N° 1: Rutas de toxicidad de metales en microorganismos.....	12
Figura N° 2: Mecanismos de detoxificación de metales pesados en microorganismos procariotas y eucariotas.	16
Figura N° 3: Ejemplos de la estructura de metalotioneínas de distintos organismos.....	18
Figura N° 4: Modelo de mecanismos de resistencia a metales pesados en levaduras.....	20
Figura N° 5: Transportadores ABC con sus dos dominios transmembrana.....	22
Figura N° 6: Zona de muestreo de aguas y suelos contaminados con efluentes mineros de la laguna Pacococha	31
Figura N° 7: Zona de muestreo de aguas y suelos de afluentes (puente Upumayo) de la laguna Junín (Chinchaycocha).	31
Figura N° 8: Efluentes neutralizados eliminados de Minera Milpo (3900 msnm) y Relavera Quiulacocha Pasco.....	32
Figura N° 9: Monitoreo fisicoquímico y biológico en la Relavera Quiulacocha (4273 msnm) Pasco.....	32
Figura N° 10: Monitoreo fisicoquímico y microbiológico, relavera Yanamate (4347 msnm) Pasco.....	32
Figura N° 11: Laguna Sta. Catalina, cabecera de cuenca del Rímac y Pasivo Ambiental-Relavera Sillustani Puno.....	33
Figura N° 12: Monitoreo fisicoquímico y microbiológico en pasivo ambiental, boquerón Sillustani.....	33
Figura N° 13: Cepa (AMP3), colonias mucoides ovaladas, características de <i>Rhodospodium toruloides</i>	54
Figura N° 14: Cepa (AMP4) colonias mucoides aplanadas, característica de <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	54
Figura N° 15: Cepa (AMP6) colonias esféricas, mucoides brillantes, características macroscópicas de una cepa de <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	54
Fig. N° 16: Cepa (AMP5) colonias mantecosas, aplanadas, arrugadas, característica de <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	54

	Pág.
Figura N° 17: Coloración de <i>Meyerozyma guilliermondii</i> cepas AMP4 y AMP6.....	55
Figura N° 18: Coloración de <i>Meyerozyma guilliermondii</i> cepa AMP5 sin metal y con 100 ppm de Zn ⁺²	55
Figura N° 19: Coloración de <i>Meyerozyma guilliermondii</i> cepa AMP6 con Co ⁺² y Cr ⁺⁶	55
Figura N° 20: Colonias aisladas de la laguna Canchis, Lima	59
Figura N° 21: Tinción Gram: colonias de la laguna Canchis, Lima	59
Figura N° 22: Colonias de levaduras aisladas del lago Junín	60
Figura N° 23: Tinción Gram: colonias aisladas del lago Junín.....	60
Figura N° 24: Colonia de levaduras aisladas lago Junín.....	61
Figura N° 25: Tinción Gram: colonias aisladas del lago Junín.....	61
Figura N° 26: Colonias aisladas relavera Huarón y puente Upumayo.....	62
Figura N° 27: Tinción Gram: colonias aisladas relavera Huarón y puente Upumayo.....	62
Figura N° 28: Colonias aisladas del lago Junín	63
Figura N° 29: Tinción Gram: colonias aisladas del lago Junín.....	63
Figura N° 30: Colonias aisladas de relavera Yanamate.	64
Figura N° 31: Tinción Gram: colonias aisladas de relavera Yanamate.	64
Figura N° 32: Colonias aisladas del lago Junín.....	65
Figura N° 33: Tinción Gram: colonias aisladas del lago Junín	65
Figura N° 34: Colonias aisladas relavera Milpo	66
Figura N° 35: Tinción Gram: colonias aisladas relavera Milpo.....	66
Figura N° 36: Colonias aisladas relavera Quiulacocha.	67
Figura N° 37: Tinción Gram: (Colonias aisladas relavera Quiulacocha)	67
Figura N° 38: Colonias aisladas relavera Huarón y Yanamate.	68
Figura N° 39: Tinción Gram Levaduras: colonias aisladas relavera Huarón y Yanamate	68
Figura N° 40: Electroforesis de los amplicones de levaduras de la laguna Pacococha.	83
Figura N° 41: Electroforesis de los amplicones de levaduras aisladas de Junín y Pasco.	84
Figura N° 42: Árbol filogenético construido de secuencias relacionados filogenéticamente con <i>Yarrowia lipolytica</i> AMJ6, cepa evaluada para el estudio proteómico	86
Figura N° 43: Árbol filogenético de las levaduras aisladas de la laguna Pacococha.....	87

Figura N° 44: Alineamiento de las secuencias de las levaduras de la laguna Pacococha.....	89
Figura N° 45: Modelo evolutivo Kimura 2-parámetros, evaluado con el programa Dambe ...	89
Figura N° 46: Cinética de crecimiento de las cepas sin metales.....	91
Figura N° 47: Cinéticas de crecimiento de las cepas con Cu^{+2} y Cr^{+6}	92
Figura N° 48: Concentración Letal Media CL_{50} de la cepa AMJ3 con iones metálicos.....	93
Figura N° 49: Concentración Letal Media CL_{50} la cepa AMJ6 con iones metálicos.....	94
Figura N° 50: Biosorción de Co^{+2} con las cepas: AMP3, AMP5 y AMP6.....	96
Figura N° 51: Biosorción de Zn^{+2} con las cepas AMP3 y AMP6.....	97
Figura N° 52: Biosorción de Cu^{+2} con las cepas AMJ3 y AMJ6.	98
Figura N° 53: Biosorción de Cr^{+6} con las cepas AMJ3 y AMJ6.	99
Figura N° 54: Perfil proteico de <i>Yarrowia lipolytica</i> AMJ6.....	100
Figura N° 55: Proteínas reguladas bajo tratamiento con iones cromo, cadmio y cobre.....	101
Figura N° 56: Clasificación de las proteínas reguladas en el tratamiento con cromo.....	102
Figura N° 57: Clasificación de las proteínas reguladas en el tratamiento con cadmio	103
Figura N° 58: Clasificación de las proteínas reguladas en el tratamiento con cobre	104
Figura N° 59: Representación en diagrama de Venn de la distribución de las proteínas que se sobreexpresan y proteínas que disminuyen su expresión, encontradas bajo tratamiento con tres metales: Cromo, Cadmio y Cobre	105

RESUMEN

La minería metálica constituye la actividad económica que genera mayores ingresos fiscales al Perú, pero también es la responsable del origen de los Pasivos Ambientales Mineros (PAM), contaminando diversos ecosistemas. Estos PAM contienen metales pesados que son tóxicos para todas las formas de vida conocidas. En la naturaleza existen microorganismos como los hongos que toleran y resisten la toxicidad de estos metales pesados. Como mecanismo de defensa, las levaduras modifican su actividad metabólica, incluyendo la expresión positiva o negativa de ciertos grupos de proteínas con diversas actividades biológicas. Proteínas que participan controlando el estrés oxidativo, como catalasas, superóxido dismutasa, peroxirredoxinas, tiorredoxinas, glutatión peroxidasa, entre otras; también proteínas queladores de metales como metalotioneínas, fitoquelatinas y tripéptidos glutatión. En este trabajo, se aisló e identificó mediante PCR, diferentes cepas de levaduras extremófilas de muestras de agua y suelo contaminados con relaves mineros. Las levaduras aisladas fueron cultivadas en caldo YPG a diferentes pH, se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y biosorción con algunos metales pesados. Posteriormente, se evaluó la cinética de crecimiento de dos cepas de levaduras (AMJ3 y AMJ6) y la Concentración Letal Media (CL50) con iones Cr^{+6} , Cu^{+2} y Cd^{+2} . La cepa AMJ6 fue elegida para el estudio de expresión de proteínas en Medio Mínimo Mineral Vogel-Bonner pH 4.0 suplementado con cada metal. Las proteínas obtenidas fueron tratadas e hidrolizadas con tripsina, los péptidos fueron secuenciados mediante espectrometría de masas. Las cepas de levaduras aisladas fueron identificadas molecularmente y accesadas al NCBI del GenBank. Las CMIs mostraron diversos niveles de resistencia: 80, 120, 150, 300 y 400 ppm, para Hg^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} , Cr^{+6} y Cu^{+2} , respectivamente. La biosorción fue más del 90% para algunos metales. La cepa AMJ6 presentó mayor CL50 que AMJ3. El estudio proteómico se realizó con la cepa AMJ6 bajo estrés por metales pesados, presentó alta y baja expresión de proteínas con diversas actividades biológicas, especialmente proteínas que participan contra el estrés oxidativo, óxido reducción; metabolismo y plegamiento de proteínas, síntesis de ATP y carbohidratos, transporte de iones, entre otras funciones. Este es el primer estudio proteómico en levaduras extremófilas aisladas de relaves mineros de zonas altoandinas del Perú.

Palabras Claves: *Biosorción, levaduras, relaves mineros, lagunas altoandinas, resistencia a metales pesados, proteómica.*

ABSTRACT

Metal mining constitutes the economic activity that generates the highest tax revenues in Peru, but is also responsible for the origin of the Mining Environmental Liabilities (PAM), polluting different ecosystems. These PAMs contain heavy metals that are toxic to all known life forms. In nature there are microorganisms such as fungi that tolerate and resist the toxicity of these heavy metals. As a defense mechanism, yeasts modify their metabolic activity, including the positive or negative expression of certain protein groups with various biological activities. Proteins that participate to reduce oxidative stress, such as catalase, superoxide dismutase, peroxiredoxins, thioredoxins, glutathione peroxidase, among others; also, metal chelating proteins such as metallothioneins, phytochelatins and glutathione tripeptides. In this work, different strains of extremophilic yeasts from water and soil samples contaminated with mining tailings were isolated and identified by PCR. The isolated yeasts were grown in YPG broth at different pH, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and biosorption with some heavy metals were determined. Subsequently, the growth kinetics of two yeast strains (AMJ3 and AMJ6) and the Average Lethal Concentration (LC50) with Cr⁺⁶, Cu⁺² and Cd⁺² ions were evaluated. The strain AMJ6 was chosen for the study of protein expression in Vogel-Bonner Mineral Minimum Medium pH 4.0 supplemented with each metal. The proteins obtained were hydrolyzed with trypsin, the peptides obtained were sequenced by mass spectrometry. The isolated yeast strains were molecularly identified and deposited to the NCBI of the GenBank. The MICs showed various levels of resistance: 80, 120, 150, 300 and 400 ppm, for Hg⁺², Co⁺², Cd⁺², Cr⁺⁶ and Cu⁺², respectively. Biosorption was more than 90% for some metals. The AMJ6 strain had a higher LC50 than AMJ3. The proteomic study was carried out with the strain AMJ6, under heavy metal stress, this presented high and low protein expression with various biological activities, especially proteins that participate against oxidative stress, oxide reduction; protein metabolism and folding, synthesis of ATP and carbohydrates, ion transport, among other functions. This is the first proteomic study about the isolating of extremophiles yeast from mining tailings in high Andean areas of Peru.

Keywords: *Biosorption, yeasts, mining tailings, high Andean lagoons, resistance to heavy metals, proteomic.*

I. INTRODUCCIÓN

Los problemas ambientales en el Perú han sido abordados parcialmente a través de la normatividad ambiental y la última Ley del Ambiente, promulgada en el 2005, mediante sus instrumentos de prevención, control y recuperación ambiental, como los Diagnóstico de Impacto Ambiental (DIA), Estudios de Evaluación de Impacto Ambiental (EIA) y el Programa de Adecuación y Manejo Ambiental (PAMA) entre otros instrumentos de gestión ambiental. Las escasas investigaciones en esta problemática ambiental y los precarios trabajos realizados no han sido suficientes, frente a la magnitud del problema generado. Un ejemplo de este problema ambiental fue determinado por (Ramos et al., 2006), en un trabajo de investigación realizado en pobladores expuestos a relaves mineros en San Mateo de Huanchor Departamento de Lima-Perú, se determinó la enfermedad denominada queratosis arsenical, en pobladores que consumieron agua contaminada con arsénico.

En el Perú, a nivel nacional se han reportado 8,816 Pasivos Ambientales Mineros (PAM) en el 2015, según el Sistema Nacional de Impacto Ambiental (SINIA), organismo dependiente del Ministerio del Ambiente (MINAM). Frente a este problema, ha surgido la necesidad de investigar nuevas tecnologías que nos permitan recuperar los metales pesados del ambiente. Hace muchos años se viene investigando la capacidad de los organismos (bacterias, algas, mohos, levaduras, plantas, etc.) que tengan la capacidad de tolerar y resistir a dichos metales pesados (Casamorin et al., 2014). Los procesos fisicoquímicos y biológicos como, biotratamiento, biotransformación, biosorción, entre otros, son alternativas que recientemente se están estudiando de manera aislada, pero que no abordan la magnitud real del problema ambiental (Wang & Chen, 2006b). La Agencia de Protección Ambiental o su sigla en inglés (EPA) incluye una relación de metales peligrosos como el: plomo, selenio, talio, antimonio, arsénico, berilio, cromo, mercurio, cadmio, níquel, plata, y mercurio, siendo el berilio uno de los más tóxicos y disponibles (Yi et al., 2017). Actualmente, se aplican tratamientos fisicoquímicos para la recuperación de metales, pero ninguno de estos son eficientes para la recuperación del metales pesados (Gutiérrez et al., 2015). Los procesos biotecnológicos son una gran alternativa en comparación a los tratamientos tradicionales de remoción de metales en ambientes contaminados. En la literatura científica se encuentran reportes sobre organismos

como plantas, algas, bacterias, hongos filamentosos y levaduras, con capacidad de eliminar metales pesados de las diferentes soluciones acuosas y en el ambiente (Wang & Chen, 2006a). La biosorción es una técnica reportada desde hace décadas, se presenta como una alternativa viable frente a los tratamientos tradicionales, puesto que en este proceso se emplea biomasa (células muertas o vivas) para aprovechar las cualidades que tienen los microorganismos. Frumkin et al., 2001; Fu et al., 2010; Wang & Chen, 2006b reportan la remoción del cromo, utilizando biomasa celular de la levadura capsulada *Cryptococcus neoformans*, frente a siete metales pesados (Pb, Zn, Co, Hg, Cr, Cd, y As), encontrándose que el *C. neoformans* era más resistente al Pb (2000 ppm), Zn (1000 ppm), presentando mayor sensibilidad a As, Cd, Cr y Hg (100, 150, 250 y 50 ppm). Existen numerosas referencias sobre procesos pasivos, de bioadsorción de metales en solución acuosa mediante el uso de la biomasa muerta de bacterias, hongos, levaduras y algas, con porcentajes de captación de iones metálicos relativamente altos (Carro et al., 2010).

El modo activo de acumulación de metales en las células vivas se da mediante el gasto de energía, el mecanismo más conocido es la bioabsorción, dependiente de la actividad metabólica de la célula en donde participan las proteínas transportadoras ABC, proteínas queladoras (metalotioneínas y fitoquelatinas), glutatión, entre otras moléculas, pero los mecanismos moleculares no son conocidos (Gadd, 2000). Según lo propuesto por Viarengo & Nott, 1993 los mecanismos de defensa para bloquear el exceso de metales son: (1) atracción iónica en la envoltura celular; (2) disminución del transporte en la membrana; (3) eliminación de metales; (4) localización en estructuras celulares; (5) formación de complejos con diferentes compuestos inorgánicos y orgánicos como: metalotioneína, polipéptidos, aminoácidos citrato, malato, entre otros y (6) síntesis de proteínas para contrarrestar el estrés, así como enzimas protectoras o reparadoras de daños ocasionados.

Los mecanismos de tolerancia o resistencia varían en eficiencia entre los diferentes organismos. Actualmente, las evidencias experimentales indican que la expresión de proteínas como las metalotioneínas, fitoquelatinas y otras moléculas podrían explicar, en gran parte, los mecanismos de resistencia celular a elevadas concentraciones de metales pesados (Rauser, 1990). La síntesis de metabolitos o proteínas de estrés (PE) han sido descrita como el mecanismo

de resistencia más importante ante la contaminación por metales pesados en organismos acuáticos (Hightower, 1993). Los cambios físicos y químicos como la exposición a metales pesados ocasionan la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), induciendo la expresión de proteínas enzimáticas bloqueadoras y/o degradadoras de los ROS, como la catalasa y superóxido dismutasa, entre otras proteínas. Como consecuencia, aumenta la expresión de proteínas por la exposición a metales (Aránguiz et al., 2009). Las proteínas como las metalotioneínas (MTs), y otras proteínas, son inducidas como señales de estrés por una gran variedad de estímulos o condiciones de estrés químico, como elevada concentración de metales pesados (Haq et al., 2003; Kagi, 1993). Una vez dentro de la célula, el metal pesado puede unirse a un ligando de azufre del glutatión (GSH) a fitoquelatinas (PCs) y ácidos orgánicos como el citrato (Clemens, 2006).

En nuestro país, no existen estudios de resistencia a metales en levaduras, mucho menos estudios de expresión de proteínas en levaduras sometidas a estrés por metales pesados. En el presente trabajo, se estudió la expresión de proteínas en la levadura extremófila *Yarrowia lipolytica* AMJ6, aislada de la relavera Yanamate de Pasco-Perú, cultivada en condiciones normales y en estrés, frente a iones metálicos (Cd^{+2} , Cu^{+2} y Cr^{+6}). En los resultados analizados se determinaron las proteínas que se sobreexpresan (Up-regulated) y proteínas que disminuyen su expresión (Down-regulated), así mismo las proteínas que participan en diversas vías metabólicas. Los objetivos de la tesis fueron determinar la resistencia de las levaduras a los metales pesados, evaluar la biosorción de metales, los mecanismos de resistencia, la expresión de proteínas involucradas en la resistencia, determinar la expresión de proteínas en condiciones normales y en estrés a metales pesados, y proteínas que participan en vías metabólicas relacionadas con la homeostasis celular de iones metálicos.

II. MARCO TEORICO

2.1 METALES PESADOS

2.1.1 Definición

La denominación de *metal pesado* ha sido variado, en algunos casos similares y en otros contradictorios, basados en el peso atómico, toxicidad y otras características de los iones metálicos (Hodson, 2004). Aún no ha sido definitivo el significado de metal pesado por autoridades involucradas en esta disciplina como la “*International Unión of Pure and Applied Chemistry*” (IUPAC), actualmente es objeto de controversia, según lo refiere C. Michael, 2010. En ecotoxicología se denominan a aquellos metales y metaloides tóxicos para los organismos, esta toxicidad es relativa, debido a la concentración. Algunos oligoelementos esenciales para los organismos del planeta, incluyendo los humanos, el consumo o exposición a dosis altas son tóxicos para toda forma de vida (Paz-Ferreiro et al., 2014). La controversia, sigue y no ha sido resuelto aún, en nuestro trabajo emplearemos el término metal pesado, basado en el número atómico y/o o masa atómica.

2.1.2. Generalidades de los metales

Todos los metales presentan sus propias características fisicoquímicas que deben ser consideradas al evaluar el riesgo que presentan para el humano y la biósfera del planeta. Los metales se encuentran en diferentes concentraciones en los diferentes hábitats, nichos ecológicos y/o regiones geográficas (Fairbrother et al., 2007). Los diversos metales están en forma natural o asociados a compuestos de azufre formando sulfuros metálicos, introduciéndose al ambiente por procesos naturales como la erosión y lixiviación química o microbiana, también por procesos antropogénicos, realizados por la actividad humana. Los metales pueden variar por la presencia de otros, muchos metales están asociados en la minería polimetálica, entre ellos pueden interaccionar de forma aditiva o sinérgica, otros pueden actuar de forma antagonista (Preston et al., 2000). Los metales no pueden ser destruidos o degradados como otras moléculas, compuestos y/o sustancias, son contaminantes persistentes, no obstante pueden cambiar su estado de oxidación, disminuyendo su toxicidad, además de influir en su bioaccesibilidad y biodisponibilidad (Fairbrother et al., 2007).

Un compuesto es biodisponible cuando está en forma libre o soluble y puede introducirse al citoplasma atravesando las envolturas y/o membranas celulares, o también pueden ser expulsados al exterior celular (Semple et al., 2004). La bioaccesibilidad va a depender de la solubilidad del metal, si está en forma soluble o insoluble, la cantidad del metal podría estar accesible por cierto tiempo y bajo ciertas características. La biodisponibilidad y toxicidad de los metales, varían de acuerdo con las condiciones fisicoquímicas donde se encuentran, tienen relación con propiedades del metal y las características del medio como: capacidad de intercambio catiónico, concentración de oxígeno, pH, potencial redox, concentración de materia orgánica, entre otros (Calace et al., 2006). La acidez es el factor abiótico más importante que cambia el comportamiento de los iones metálicos (Fairbrother et al., 2007). El pH ácido favorece la solubilidad, como consecuencia su biodisponibilidad. La accesibilidad de los metales no es exclusiva de las condiciones fisicoquímicas, también influyen los factores biológicos. La actividad metabólica de los seres vivos es influenciada por las condiciones fisicoquímicas del ambiente. En los seres vivos también afectan la movilidad y biodisponibilidad del metal, utilizando mecanismos de precipitación biológica, captura del metal por quelación, biosorción y/o acumulación de los metales por organismos, entre otros (Bondarenko et al., 2008).

Los oligoelementos y algunos metales esenciales (Zn, Fe, Mg, Mn, Cu, Co, Na y K) son imprescindibles para todo ser vivo, son cofactores en muchas reacciones enzimáticas, forman parte de muchas proteínas, participan en variadas funciones y transporte celular. Son esenciales en el catabolismo y anabolismo, desarrollo y crecimiento celular, son importantes a bajas concentraciones, el incremento de estos metales en el consumo también va a ser tóxicos. Otros metales no esenciales como el Cd, Hg, Ag, Pb, Cr y Pt hasta el momento no se ha determinado su importancia biológica, y son considerados como muy tóxicos a bajas concentraciones (Bondarenko et al., 2008). A continuación, se describen las características de los metales Cu, Cd, Co, Cr, Hg y Zn empleados en la presente tesis.

a. Cobre

El cobre de masa atómica de 63,55 y número atómico 29, es considerado un metal de transición, no ferroso, utilizado industrialmente en diversos accesorios eléctricos y dispositivos, presenta

coloración rojiza, maleable, dúctil, tiene alta conductividad eléctrica y térmica. Se encuentra asociado a diferentes minerales, en su estado nativo se encuentra en la forma metálica, en rocas y menas. El cobre en el planeta se encuentra de forma insoluble como sulfuros minerales, formando parte de diversos agregados de calcopirita, bornita calcocita, enargita y covelita. Este metal es esencial en concentraciones trazas para el metabolismo de los humanos y animales en general, las necesidades de los organismos es de 5 a 20 microgramos de Cu por día; y es indispensable como micronutriente para la mayoría de organismos (Kirova et al., 2012). Generalmente este metal, se encuentra en muy bajas concentraciones o trazas en muchos alimentos de consumo, está en el agua y escasamente en el aire, son abundantes como sulfuros provenientes de los volcanes e industrias; en concentraciones altas es perjudicial y puede ser letal en los organismos. Ser biodisponible lo hace aún más peligroso para cualquier forma de vida. Es letal en los seres humanos, cuando la concentración es superior a los 250 mg/día (Wright & Nelson, 2002). Las elevadas concentraciones de cobre en los suelos provoca pérdidas en los cultivos; pocas plantas pueden vivir en estas condiciones; además las lombrices de tierra y otros organismos macrodescomponedores también pueden ser afectados (Gaete et al., 2010). Los residuos de cobre o de sus aleaciones metálicas producen chalcosis o uveítis en las personas expuestas. La chalcosis se da por la acumulación del metal en los tejidos del órgano de la visión, como consecuencia produce la pérdida de la vista; en la uveítis se produce la irritación e hinchazón del tejido de la úvea, que se ubica en la capa central del ojo, donde se da la mayor parte del flujo sanguíneo a la retina (Wright & Nelson, 2002).

b. Cadmio

Es un metal pesado pertenece al grupo IIB de la tabla periódica, con una masa atómica promedio de 112.41 y número atómico 48, es dúctil, de color blanco con un ligero matiz azulado. El ión cadmio (Cd^{2+}) se combina usualmente con los iones derivados del oxígeno molecular, como óxido de cadmio (CdO_2), sulfato de cadmio ($CdSO_4$) o cloruro de cadmio ($CdCl_2$); el cadmio en la naturaleza no se encuentra en estado libre, forma sulfuros como la greenockita CdS (Navar Ruiz & Méndez-Armenta, 2011). Gran parte de cadmio se obtiene como subproducto de la fundición y refinamiento de minerales que también contienen zinc, también están presentes en pigmentos de industrias textiles, subproductos de hierro, lubricantes para motores, en la utilización de fertilizantes y pesticidas (Faroon et al., 2012). Estos desechos pueden llegar a las

poblaciones principalmente por 2 vías, la oral a través del agua de consumo y alimentos contaminados con cadmio y la inhalación de este metal presente en el material particulado suspendido en el aire, proveniente de la industria (Goyer, 1997). Este metal afecta una variedad de tejidos y órganos, causando enfermedades renales ocupacionales como alteración de los túbulos renales, insuficiencia renal crónica y proteinuria; también afecta al corazón, produce arteroesclerosis en la arteria aórtica y coronaria, esto debido al aumento de ácidos grasos y colesterol. Asimismo afecta los testículos, placenta, huesos, sistema nervioso periférico y central (Méndez et al., 2007). El pulmón es el más sensible a la exposición a cadmio, la exposición permanente y la inhalación, puede ocasionar bronquitis con daño agudo alveolar, como resultado enfisema y fibrosis secundaria (Gwaltney Jr, 2002).

c. Cobalto

Este elemento metálico tiene masa atómica de 58.93 y número atómico de 27. En estado libre o combinado es parecido al níquel y hierro. Tiene amplia distribución en la naturaleza y es un componente que forma parte de las rocas ígneas de la corteza de nuestro planeta (0.001%), siendo menor al níquel, el cual se encuentra alrededor del 0.02%. El cobalto se encuentra en meteoritos, en los océanos, en aguas dulces, en diversos suelos y plantas; en los animales varía dependiendo de su alimentación (Abriata, 2013). También están como elementos traza en muchos minerales de plata, manganeso hierro, cobre, níquel y zinc. Los organismos en general necesitan pequeñas cantidades de cobalto, es importante para los humanos debido a que están presentes en el complejo de las vitaminas, como la B12, esencial para nuestra salud. La dosis letal media (DL₅₀) de las sales de cobalto soluble en el cuerpo se estima entre 50 y 500 mg/kg. La exposición a concentraciones elevadas de cobalto en el aire, causa efectos negativos en los pulmones, como consecuencia produce neumonía, asma, náuseas, vómitos, problemas de corazón, de la visión, fibrosis pulmonar y daño en la glándula tiroides (Abriata, 2013).

d. Cromo

Es un metal con masa atómica 51.996 y número atómico 24; presenta una estructura dura y quebradiza, tiene una coloración blanquecina plateada. No se encuentra como cromo elemental en la naturaleza, se encuentra en mayor abundancia en el mineral cromita. Este metal presenta valencias (0, +3 y +6) son las formas más frecuentes en las que está en la naturaleza. El cromo

(0), llamado cromo metálico, se usa en la producción de acero, el cromo trivalente (III) y el más tóxico el hexavalente (VI), se utilizan en los cromados, también en la fabricación de colorantes y pigmentos, en el tratamiento para el ablandamiento del cuero, en la conservación de la madera, inhibidores de corrosión, producción de las telas y de tóner para fotocopiadoras. El cromo hexavalente (Cr^{+6}) y el cromo (Cr^0) son los más tóxicos, ambos son producidos en procesos industriales, a diferencia de las formas trivalentes, están presentes en organismos de los diversos ecosistemas acuáticos y terrestres (Atsdr, 1997). El Cr (III) es necesario para mantener un buen estado de salud, ya que ayuda al cuerpo en el metabolismo de los azúcares, grasas y proteínas (Atsdr, 1997).

La incorporación del cromo a los organismos, puede ser por vía oral, respiratoria y dérmica. Cuando ingresa al organismo se distribuye en los ganglios linfáticos, médula ósea, riñón, hígado pulmones y bazo. El cromo tóxico con valencia +6 se reduce a cromo +3 en la mitocondria y el núcleo (Dorsey & Ingerman, 2004). El cambio de oxidación en el interior de la célula genera productos reactivos como el cromo +5, +4, y +3, también radicales hidroxilos libres; estas formas reactivas son inductores de mutación en el ADN. El 60% de cromo es eliminado por los riñones y en menor proporción por el tracto digestivo (bilis), las uñas, leche, sudor y cabello (Cuberos et al., 2009). En la orina se elimina principalmente el Cr^{+3} formando complejos con el glutatión (Cuberos et al., 2009) (Dorsey & Ingerman, 2004).

El cromo hexavalente (VI) es peligroso para la salud de las personas, sobre todo para los que trabajan en la producción de acero y telas. Los fumadores de tabaco también tienen una alta exposición al cromo (VI). Este metal impacta negativamente en la salud, produciendo reacciones alérgicas, por ejemplo, erupciones cutáneas, irritación en las fosas nasales y sangrado. También es responsable de problemas estomacales y úlceras, alteraciones y enfermedades en vías respiratorias, inmunosupresión del sistema inmunológico, daños renales y hepáticos, mutaciones de genes, cáncer pulmonar y muerte (Emsley, 2003). Las moléculas de cromo y níquel están clasificadas en el grupo I de elementos carcinógenos, de acuerdo con la “Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer” por sus siglas en inglés (IARC).

e. **Mercurio**

Elemento con símbolo (Hg), de masa atómica 200.59 y número atómico 80. Este metal a temperatura ambiente es líquido, de color blanco plateado, el punto de solidificación de -38.4 °C, y ebullición de 357 °C a una atmósfera de presión. El mercurio es considerado como un metal noble, es soluble, cuando está en estado sólido es suave, es muy tóxico así como sus compuestos, se encuentra solo, o formando sales de mercurio, también se encuentran en compuestos orgánicos (Dorsey & Ingerman, 2004).

La inhalación de Hg causa daños en los nervios, cerebro, pulmones y riñones, asimismo produce vómitos, diarreas, irritación de los ojos y reacciones en la piel. En general, su consumo produce daños al sistema nervioso, cerebro, también cansancio, dolores de cabeza, mutaciones, daño al ADN y cromosomas, daño en los gametos, alteración en la reproducción, nacimientos con defectos y malformaciones y abortos en diferentes estadios. El daño cerebral causa dificultad y pérdida del habla, deficiencia en el aprendizaje, cambios en la conducta, alteraciones neurológicas con temblores, alteración de la visión, descoordinación muscular, pérdida de la memoria, sordera, entre otras alteraciones (Clarkson, 1997).

Este metal es liberado por la ruptura de minerales en rocas y suelos a través de la erosión del agua y viento. Aún persiste contaminación por mercurio en el ambiente y está aumentando debido a la actividad humana, como la minería ilegal. El mercurio es liberado al ambiente a través de la quema de combustibles fósiles, fundiciones, combustión de sólidos, minería, aplicación de fertilizantes y los vertidos de aguas residuales industriales que eventualmente terminará en suelos o aguas superficiales (Crinnion, 2000). Los microorganismos pueden convertir el mercurio de las aguas superficiales o suelos en moléculas más complejas como metil mercurio, que puede ser rápidamente absorbido por muchos organismos. Los organismos acuáticos como peces, moluscos e invertebrados absorben gran cantidad de metil mercurio. Acumulándose en las diversas redes o cadenas alimenticias hasta llegar a peces, mamíferos y el hombre.

Zinc

Presenta masa atómica 65.37 y número atómico de 30, el zinc es maleable, dúctil y de color grisáceo. Tiene alrededor de 15 isótopos, siendo los más estables con masas atómicas 64, 66, 67, 68 y 70. El zinc es un elemento traza importante para el funcionamiento de muchas proteínas,

es esencial para muchos organismos incluyendo los humanos. Cuando hay deficiencia de zinc en la dieta, hay inapetencia, disminuye la sensibilidad, el sabor y el olor. El consumo de altas cantidades de zinc puede también causar problemas de salud, como úlcera al estómago, irritación de la piel, vómitos, náuseas y anemia. Este elemento es vital para los organismos fotosintéticos y animales. La escases del zinc en nuestros alimentos afecta y altera el crecimiento y desarrollo de los niños y la madurez, también es causante de la anemia (Substances & Registry, 1999). Una de las proteínas más importantes en el metabolismo de la glucosa como la insulina contiene zinc, por lo cual es importante el consumo de alimentos ricos en zinc. Este metal está presente en la mayor parte de los alimentos proteicos; en promedio el cuerpo humano necesita alrededor de dos gramos de zinc (Barceloux & Barceloux, 1999).

2.1.3. Toxicidad celular de los metales pesados

La toxicidad de los metales pesados es alta y tiene que ver con su biodisponibilidad (es decir, la concentración del metal iónico libre presente) y daño directo, bloquean las actividades metabólicas, principalmente la inactivación de las enzimas por la unión de los metal a grupos funcionales -SH (sulfhidrilos) de sus aminoácidos, produciendo daños irreparables. La biodisponibilidad de los metales están asociadas íntimamente con las condiciones abióticas del ambiente (Brown & Hargreaves, 1999; Kim et al., 2002).

Los cambios de valencia como reducciones de V (V) a V (III), Au (III) a Au (0) y Cr (VI) a Cr (III), llevan a la precipitación de los metales. Uno de los metales más utilizados en la industria del acero, es el cromo principalmente en la producción de automóviles, curtiembres, equipamiento de hospitales, entre otras. El Cr (VI) es altamente tóxico clasificado como contaminante de clase I, de acuerdo a la “Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos” (EPA) por sus siglas en ingles, el metal es estable en soluciones acuosas, como consecuencia de la alta movilidad en los ambientes, potencialmente mutagénico y cancerígeno. En cambio el Cr^{+3} no es soluble en soluciones líquidas y precipita, por lo tanto disminuye la mutagenicidad. El uso de microorganismos resistentes a este metal, para la conversión de cromo Cr^{+6} en Cr^{+3} es muy importante en la descontaminación de efluentes industriales (Lovley, 2000a; Srinath et al., 2002). Sin excepción, todos los metales son tóxicos en mayor o menor grado para el hombre y en general para todos los organismos. Los metales que no son

considerados como esenciales causan efectos perjudiciales, aún a concentraciones muy bajas, causando muerte celular (Wu et al., 2016).

Los metales pueden ingresar a la célula por dos vías. La primera por alta concentración y/o gradiente quimiosmótico por la membrana citoplasmática, mecanismo no específico y un segundo mecanismo altamente específico asociado al transporte activo con gasto de ATP (Nies, 1999). Otros desplazan elementos esenciales, causando deformaciones en la conformación de la estructura de los ácidos nucleicos (AN) generando mutaciones y alteraciones proteicas, como resultado pierden su actividad. La concentración elevada de metales en la célula produce directa o indirectamente estrés oxidativo, generándose las especies reactivas de oxígeno y radicales libres, altamente estresantes (Hall, 2002; Rico et al., 2009). Otros efectos negativos de los metales pesados, son los efectos genotóxicos, como consecuencia alteraciones de proteínas que participan en la reparación del ADN afectado, también producen daño oxidativo en las bases nitrogenadas, originando modificaciones como la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG) molécula responsable de las mutaciones (Bertin & Averbeck, 2006). En la Figura 1, se resume las rutas de toxicidad más frecuentes de los metales pesados en las células.

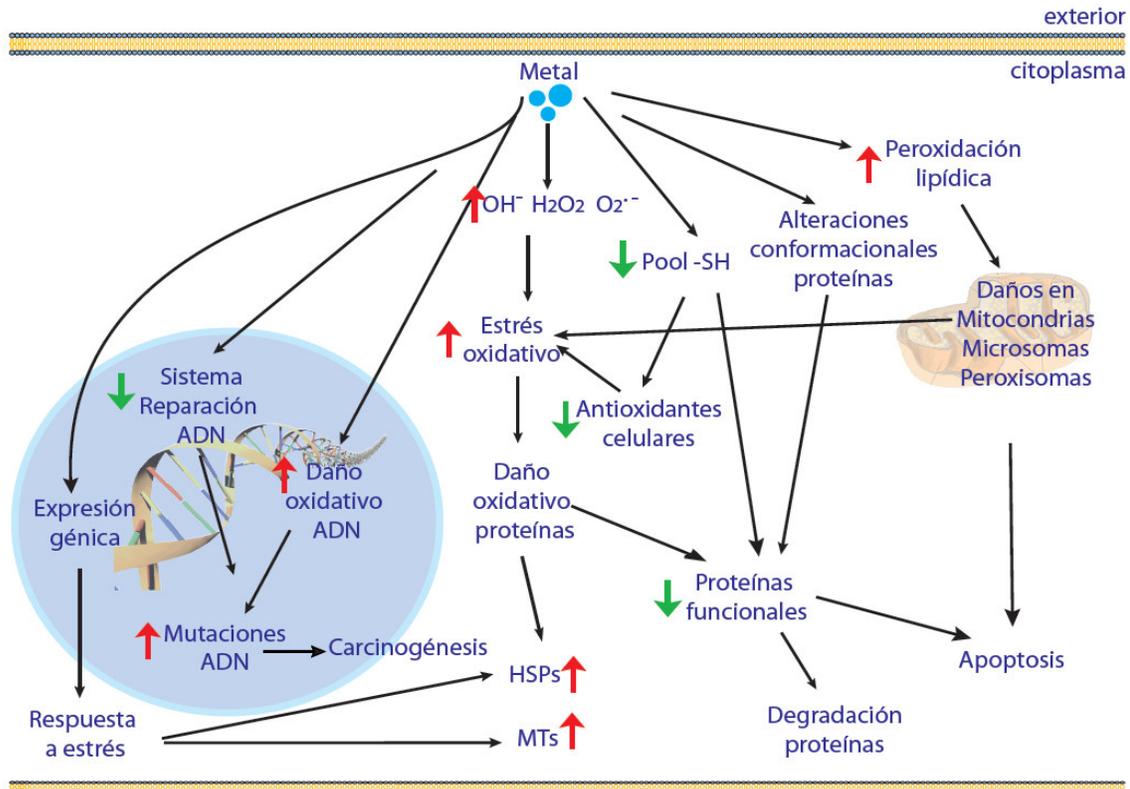


Figura 1. Se muestra las rutas de toxicidad de los metales. A) HSPs: proteínas de choque térmico. B) MTs: Metalotioneínas. C) Flechas rojas: incremento de radicales libres. D) Flecha verde: Disminución de proteínas. Modificado (Bertin & Averbeck, 2006).

2.1.4. Detoxificación celular de metales

En la naturaleza, persisten algunos metales que conllevan a modificaciones considerables en las comunidades microbianas. Se ha demostrado que los metales pesados inhiben el crecimiento microbiano y actividades enzimáticas, bloqueando grupos funcionales, desplazando iones de metales esenciales y modificando la configuración de moléculas biológicas (Gadd, 2009). En ambientes contaminados con metales, las respuestas de las comunidades microbianas dependen, entre otros factores, de las concentraciones de los agentes tóxicos a los que estén expuestas, de la naturaleza de los nutrientes, forma química del agente tóxico, etc. En general los metales tienen efectos tóxicos en los seres vivos, cuando exceden el límite máximo requerido, más aún los no esenciales, y también los oligoelementos y elementos traza. Por lo cual las células eucariotas y procariontas tienen una serie de mecanismos de defensa para contrarrestar el efecto tóxico de los contaminantes ambientales (Gadd, 2009).

A. Bloqueo del transporte intracelular. Este mecanismo se da en los procariotas, es una forma típica de las bacterias, se activa frente a metales no esenciales, que utilizan los mecanismos de transporte activo para la homeostasis de iones metálicos esenciales, ejemplo de esto es el bloqueo, ante la presencia iones como Cd^{2+} y el As^{4+} , entran a la célula mediante las proteínas y los sistemas de transporte de Mn^{2+} y fosfato. Por tanto las células bloquean los canales de entrada y captan los metales esenciales por vías alternas (Bruins et al., 2000).

B. Bombeo extracelular de los iones. Este mecanismo consiste en expulsar los metales, mediante el transporte activo con gasto de energía, a través de canales proteicos ubicados en las membranas celulares, expulsando los iones metálicos que se encuentran en el citoplasma. Existen diferentes enzimas como las ATPasas dependientes del fosfato que participan en la expulsión de metales tóxicos, entre ellos el plomo, cadmio, entre otros. Las ATPasas se encuentran en organismo eucariotas, bacterias y arqueobacterias, emplean sistemas de antiporte quimiosmótico catión/ H^+ , como la ATPasa *cadA*, que contribuye en la resistencia al ion Cd^{2+} en bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Bacillus* (Silver & Phung, 2005).

C. Modificación química de iones. Este mecanismo consiste en el cambio del estado químico del metal del estado iónico al metálico, el cual es menos tóxica. Hay modificaciones químicas que se basan en la reducción y/o metilación del metal. Un ejemplo es el “sistema *mer*” de resistencia al ión Hg^{2+} en *Pseudomonas aeruginosa* (Silver & Phung, 2005). Otros ejemplos son las reducciones de V^{5+} a V^{3+} , Au^{3+} a Au^0 y Cr^{6+} a Cr^{3+} , estas formas reducidas conducen a la precipitación de estos metales, en condiciones fisiológicas establecidas para los microorganismos. Las interacciones metal-microbiota están siendo estudiadas en el contexto de la biotecnología ambiental, con el objeto de implementar métodos de remoción, recuperación o detoxificación de metales pesados y radionúclidos (Lloyd & Lovley, 2001; Lovley, 2000b).

D. Bioabsorción y/o bioacumulación. Consiste en la inmovilización a nivel del citoplasma de los cationes metálicos a moléculas orgánicas denominadas ligandos, para su posterior compartimentalización del complejo ligando-metal. Este complejo quelados finalmente, son eliminados de la célula como complejos no tóxicos (Rauser, 1999). En los organismos existen

tres principales tipos de moléculas orgánicas que retienen los iones metálicos y responsables de la bioacumulación. El mecanismo celular involucra un complejo proteico transportador activo de membrana que introduce al metal pesado del entorno celular con el consumo de energía. Proporcionado por el ATP, mediante el sistema bomba de hidrogeniones H^+ y la enzima ATPasa. Incorporado el metal pesado al citoplasma, es secuestrado por la presencia de proteínas queladoras, ricas en grupos sulfhidrilos conocidas como metalotioneínas, también son compartimentalizadas en vacuolas, como ocurre en hongos (Rauser, 1999). Los tripéptidos glutatión (GSH), las fitoquelatinas (FQs), las metalotioneínas (MTs) y otras moléculas como ácidos orgánicos, son potenciales queladores de metales pesados (Rauser, 1999). Algunos ejemplos de estos procesos son interesantes, por ejemplo, en la bioacumulación del uranio por *Pseudomonas aeruginosa*, detectado en el citoplasma, al igual que en *Saccharomyces cerevisiae*. La superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) son dos enzimas que sirven como indicadores moleculares que se expresan en condiciones de estrés oxidativo por metales pesados (Li & Yuan, 2008).

E. Bioadsorción. Es el proceso pasivo de captación inespecífica de metales por biomasa viva o muerta de células, también por polímeros o estructuras de superficie o envolturas celulares (glucocalix, cápsulas y paredes). Las células viables como no viables, no dependen del transporte ni del metabolismo celular. Este mecanismo se da en biomasa viva o muerta, como el uso de algas (Crist et al., 1981) y en procariotas (Mann et al., 1990), es una captación inespecífica, se da mediante la afinidad con algunos cationes metálicos.

La captura de metales pesados por microorganismos ha sido ampliamente estudiada, en la recuperación de iones metálicos en procesos de biorremediación de plomo, níquel, cadmio, cromo, zinc y cobre (Jianlong et al., 2001; Srinath et al., 2002; Tangaromsuk et al., 2002). Los microorganismos utilizados actúan como biosorbentes, en ambiente contaminados, acumulan iones metálicos en tiempos cortos, en contacto con las soluciones de metales. Este mecanismo pasivo, baja los costos en un proceso de bioremediación, no es necesario agregar nutrientes al sistema, por trabajar con biomasa microbiana muerta. En las últimas décadas la búsqueda de este tipo de microorganismos están en crecimiento, junto con el estudio de sistemas biosorbentes, se están utilizando grupos microbianos, o sistemas mixtos con polímeros y/o

macromoléculas como sorbentes, que incrementen el rendimiento en la captación de iones metálicos (Bréant et al., 2002).

Los fenómenos de bioadsorción se caracterizan por la retención del metal mediante una interacción fisicoquímica con grupos funcionales expuestos hacia el exterior celular pertenecientes a moléculas de las paredes celulares; ejemplo grupos fosfato, sulfhidrilo, amino, hidroxilo, carboxilo, entre otros. Es un mecanismo rápido que no es dependiente de la temperatura, estos procesos se estudian en detalle, mediante la construcción de los modelos de isotermas de Langmuir y Freundlich (Herrejón Figueroa et al., 2008).

F. Bioprecipitación. Son mecanismos utilizados por hongos y bacterias, por su capacidad de excretar al medio una variedad de productos del metabolismo (compuestos de azufre y ácidos orgánicos) que quelan los iones metálicos tóxicos, de forma inespecífica (Gadd, 2009). Algunos de estos mecanismos son conocidos como biosorción, bioacumulación, biotransformación y biomineralización, entre otros (Figura 2).

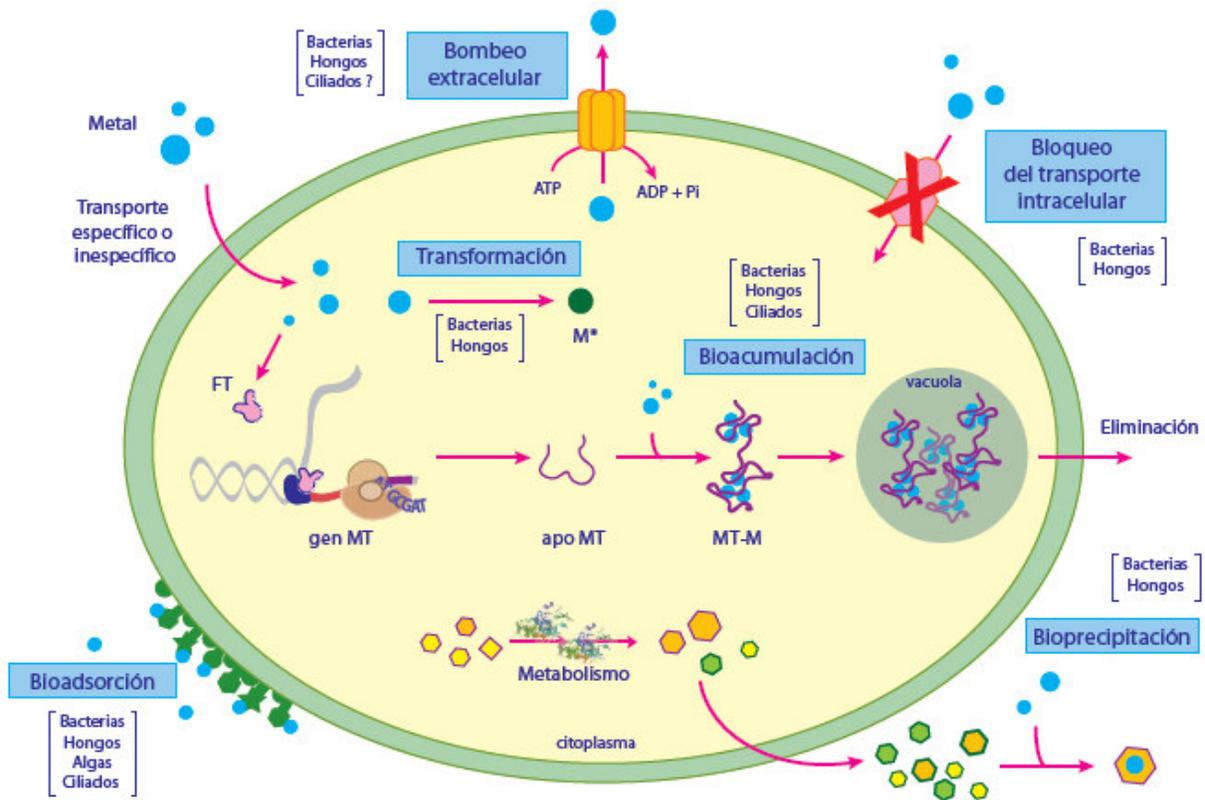


Figura 2. Los mecanismos de detoxificación de iones metálicos en procariotas y eucariotas. M: Metal pesado, M*: M. reducido o metilado, MT: Metalotioneína, MT-M: Complejo metalotioneína-metal, FT: Factor de Transcripción. En paréntesis se indican grupos de microorganismos que presentan algunos mecanismos (Gutiérrez et al., 2011).

Además los microorganismos también han desarrollado diversos mecanismos para mantener la homeostasis y adaptarse a los metales tóxicos en el ecosistema (Brar et al., 2006). Estos mecanismos de resistencia se explotan *in situ* (tratamiento en el sitio de contaminación), o *ex situ* (el sitio contaminado, puede ser tratado lejos del punto de contaminación) para la remediación del ambiente. En estos mecanismos, se han utilizado biosorbentes para remoción y recuperación de metales pesados. La mayoría de los metales pesados atraviesan las membranas microbianas, pero los microorganismos pueden desarrollar mecanismos de resistencia que los ayuden a superar el efecto tóxico (Gadd, 1994). Por lo tanto, la respuesta fisiológica de los microorganismos a la toxicidad de los metales pesados es importante para la recuperación de ambientes contaminados. Un mecanismo es la transformación del estado de valencia, esto es aplicable a metales con diferentes estados de valencia y de toxicidad. Para el caso de resistencia

al mercurio, la enzima alquilmercurio liasa, cataliza el metil mercurio a Hg (+2), que es cien veces menos tóxico (Wu et al., 2016). El metil mercurio es un compuesto neurotóxico capaz de bioacumularse y concentrarse en los niveles tróficos conocido como biomagnificación (Myers et al., 2000).

2.1.5 Proteínas y polipéptidos queladores de metales pesados

A. Metalotioneínas

Son pequeñas proteínas que cumplen una función importante en las células expuestas a metales, son de baja masa molecular promedio que oscila (< 7-10 kDa), por lo general no presentan el aminoácido histidina ni aminoácidos aromáticos. Estas proteínas son muy ricas en cisteína (Cys) entre el 23-33 %. Estos aminoácidos le confieren la capacidad de quelar iones metálicos, como Cu, Cd y Zn (Coyle et al., 2002) y son responsables de capturar los metales, mediante los residuos de Cys, con variados motivos: Cys-Cys, Cys-XX-Cys y Cys-X-Cys, siendo X es un aminoácido distinto a la cisteína (Kägi, 1991). Estas proteínas fueron descubiertas por Margoshes & Vallee, en el año 1957, fueron identificadas en el córtex del hígado de equino, esta molécula se le asumió como responsable de la acumulación de cadmio (Margoshes & Vallee, 1957). Posteriormente se determinó que estas proteínas también eran capaces de unir, no solo cadmio, sino zinc y cobre (Kägi & Vallee, 1960; Pulido et al., 1966). Los estudios realizados han comprobado que las metalotioneínas son capaces de unir hasta 17 iones metálicos distintos monovalentes y divalentes, sin embargo otros investigadores manifiestan que, en organismos vivos solo pueden unir a Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Bi^{2+} , Cu^{2+} y Ag^{+} (Coyle et al., 2002). La atracción por los diferentes metales varía según la carga y los tipos de proteínas. La quelación depende de la conformación estructural de la metalotioneína (Coyle et al., 2002).

Se han reportado metalotioneínas en diversos invertebrados (equinodermos, artrópodos, moluscos, nemátodos y anélidos) como en vertebrados, incluyendo a los mamíferos; también en organismos microscópicos eucariotas (microalgas, protozoos, mohos y levaduras), y organismos procariotas (proteobacterias y cianobacterias), también se han reportado en plantas (Robinson et al., 2001). A pesar de ser descubiertas en el siglo pasado, y ser estudiadas en su conformación, su estructura, distribución, regulación génica, características bioquímicas; su actividad biológica

fundamental sigue siendo incierta (Palmiter, 1998). No obstante, se les han atribuido funciones biológicas como la regulación de la homeostasis de los iones metálicos esenciales (Cousins, 1985), la captura de “especies reactivas de oxígeno” (ROS) (Viarengo et al., 2000), protección, frente a iones metálicos tóxicos (Liu et al., 1996), así mismo en la presencia de xenobióticos (Klaassen & Liu, 1998). Por otro lado en los mamíferos, se les atribuye un papel de protección de enfermedades neurodegenerativas (Penkowa & Hidalgo, 2000) y en procesos de maduración y diferenciación celular (Viarengo & Nott, 1993).

La metalotioneína Cu-MT, se expresan cuando algunos organismos como las levaduras, se exponen al ión cobre, esta metalotioneína es conocida como CUP1 (Figura 3). Esta proteína se caracterizó por primera vez, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y la Cu-MT del moho *Neurospora crassa*, ambas captan iones Cu (Winge et al., 1985). Tienen una estructura similar al dominio β de las metalotioneínas que captan iones Cd (Cd-MTs) en los mamíferos (Ruotolo et al., 2004). A diferencia en algunos artrópodos como los crustáceos, las metalotioneínas del cobre presentan 2 dominios β (Valls et al., 2001).

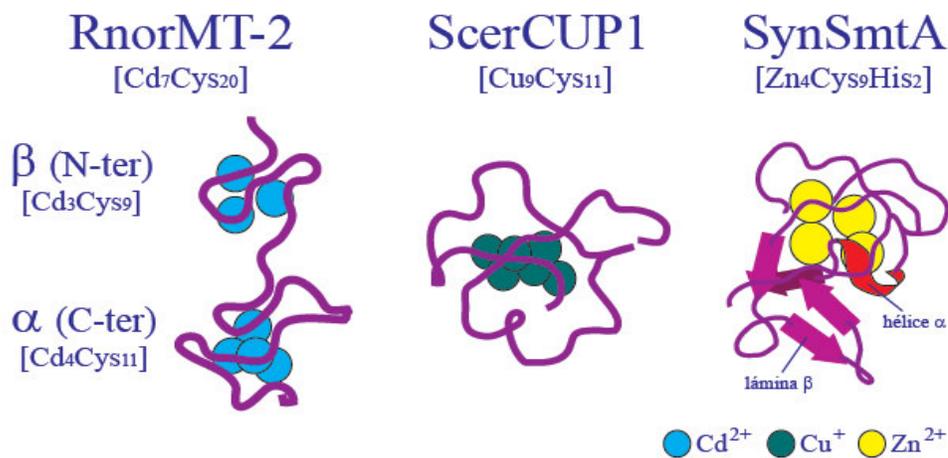


Figura 3. Se muestran metalotioneínas (MET) de diferentes organismos. RnorMT-2: de *Rattus norvegicus*. ScerCUP1: de *Saccharomyces cerevisiae*. SynSmtA+ de *Synechococcus* sp. En las paréntesis están la estequiometría de la capacidad de quelación de metales por las metalotioneínas y su dominio (Huckle et al., 1993; Robinson et al., 2001).

B. Fitoquelatinas

B.1. Fitoquelatinas y fitoquelatín sintasa

Estas pequeñas moléculas denominadas fitoquelatinas (FQs) son pequeños péptidos, contruidos a partir del glutatión (GSH), por la fitoquelatín sintasa (FQS), clasificada como: g-glutamil cisteiniltransferasa; EC 2.3.2.15; proteína sintetizada en respuesta al estrés por iones metálicos. De acuerdo a lo descrito (Rauser, 1999); las FQs tienen una configuración general (g-Glu-Cys)_n-Gly, (n=2-11), también presentan variantes en las cadenas de aminoácidos que conforman la estructura, en algunos vegetales presentan una configuración variada (Glu-Cys)_n-Ser, (g-Glu-Cys)_n-b-Ala y (g-Glu-Cys)_n-Glu. Fueron identificados inicialmente en *Schizosaccharomyces pombe* (Kondo et al., 1983) y denominadas como cadistidinas. Se han agrupado de acuerdo a sus características en 5 familias, y se han encontrado en plantas acuáticas, terrestres y microalgas, también en algunas especies de levaduras como *S. pombe*, *S. cerevisiae* y hongos filamentosos como *Neurospora crassa* (Grill et al., 1985; Kneer & Zenk, 1992). Presentan un dominio conservado N-terminal, relacionado con la actividad enzimática, para generar FQs queladoras de los iones metálicos (Ruotolo et al., 2004), así mismo presentan un dominio variable C-terminal, al cual se le atribuye como el elemento sensor de los iones metálicos (Cobbett, 2000) esta configuración le confiere mayor estabilidad y actividad de la enzimas FQS, importante para responder a un amplio espectro de metales iónicos (Ruotolo et al., 2004; Vestergaard et al., 2008).

Se les atribuye a las FQs el rol principal en la detoxificación de metales pesados. En trabajos experimentales (Schat et al., 2002) demostraron que las FQs actúan en la detoxificación de As, Cd y Hg. Otros autores (Shine et al., 2015) demostraron que los genes putativos FQS, están presentes tanto en ascomicetos y basidiomicetos, así como genes homólogos. Protegen contra metales como el cadmio, en la homeostasis de los metales a nivel del citosol, como medio extracelular. Los mecanismos aun no son muy conocidos, por ello, se investigan sus posibles funciones.

B.2. Mecanismo de detoxificación de metales por polipéptidos y proteínas

Los mecanismos de bloquear la actividad de los metales son complejos, por ejemplo, los iones cadmio al unirse a las moléculas queladoras glutatión y fitoquelatinas forman complejos tiolato-metal para unirse a la enzima FQS con la finalidad de activarla (Figura 4). Las fitoquelatinas

son sintetizadas en el citosol, en el sistema endomembranoso rugoso o en ribosomas libres, con la finalidad de quelar iones cadmio, formándose “complejos Cd-fitoquelatinas de bajo peso molecular” (LMW CdFQn), depositándose en vacuolas por proteínas transportadoras tipo ABC. En las vacuolas, los complejos CdFQn de menor peso molecular se combinan uniéndose a más iones Cd, como resultado forman complejos CdFQn de mayor tamaño y de alto peso molecular (HMW Cd-FQn) formándose macromoléculas, las cuales están estabilizados por átomos de azufre (Cobbett, 2000). Estos complejos son compartimentalizados en levaduras y plantas, en estructuras vacuolares. En *Schizosaccharomyces pombe* se demostró que existe un grupo de mutantes denominados *hmt1*, deficientes en el transportador vacuolar de tipo ABC, siendo estos mutantes sensibles al cadmio (Eide et al., 1993). También determinaron que las mutaciones, que afectan los transportadores ABC son sensibles a otros metales.

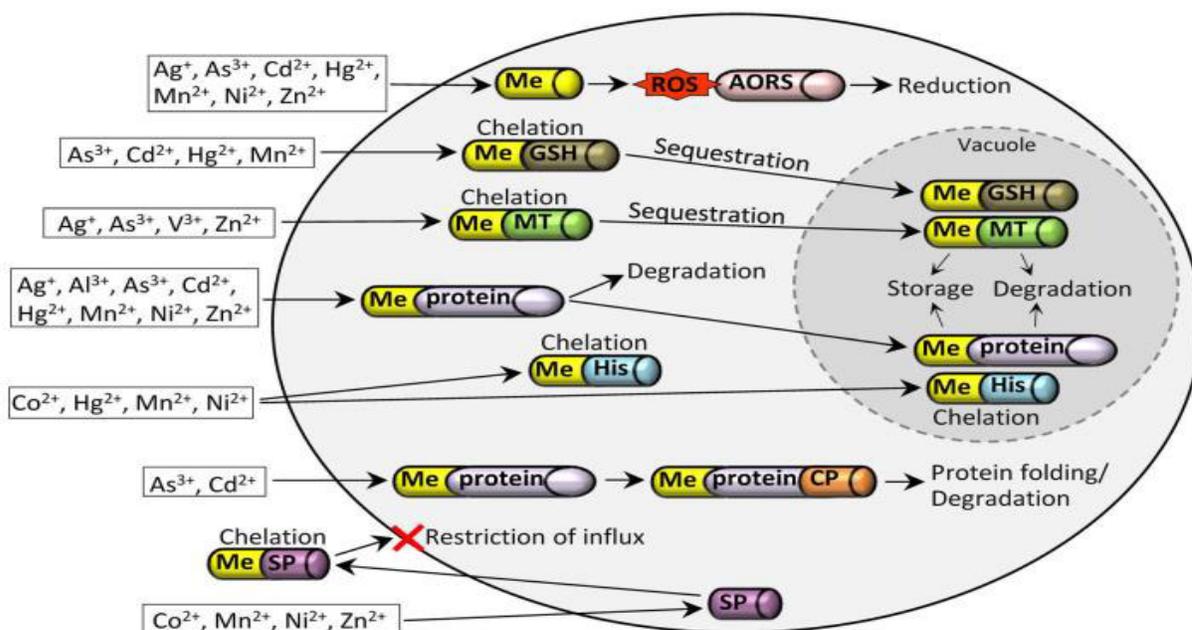


Figura 4. Modelo de mecanismos de resistencia a metales pesados en levaduras (Hosiner et al., 2014). Activación del sistema antioxidante redox (AORS) para reducir especies reactivas de oxígeno (ROS). La quelación de iones metálicos (Me) vía glutatión (GSH) y metalotioneína (MT); conlleva al secuestro vacuolar de quelatos, el almacenamiento de iones metálicos y la degradación de proteínas. En el caso de la quelación de metales sea extracelular, se realiza a través de sideróforos (SP), para restringir la entrada de metales. Asimismo, si se realiza la quelación de metales a través de histidina (His), conlleva a la degradación vacuolar y no vacuolar de complejos de metal/proteína. En el caso de unión de los iones metálicos a una proteína se activan las chaperonas (CP) para el plegamiento y degradación de complejos de metal/proteína; si hay ausencia de alguna molécula mediadora, este complejo se degradará a nivel del citosol o vacuolar.

C. Transportadores ABC

Los transportadores ABC son una gran familia de proteínas involucradas en el transporte de una amplia variedad de compuestos, como azúcares, iones, péptidos y moléculas orgánicas más complejas. Los transportadores ABC son un subconjunto de proteínas transportadoras del tipo hidrolasas que contienen un motivo, Q-loop y H-loop / región de cambio. Asimismo, estos dominios de unión se encuentran en contacto con las moléculas de ATP y GTP para su hidrólisis y liberación de energía (Marchler-Bauer et al., 2016). Se reporta que esta familia transporta iones metálicos como As^{+5} , Cr^{+6} , Hg^{+2} , entre otros (Satyanarayana et al., 2014). Las proteínas ATPasas que participan con los transportadores ABC (ATP Binding Cassette), son antiguas y diversas que se encuentran en eucariotas, arqueas y eubacterias. Cambian su conformación en los procesos de transporte de moléculas o iones, pero no se fosforilan cuando cumplen esta función. Los transportadores ABC (Figura 5) están formados por dos dominios funcionales: el responsable del dominio transmembranal (TMD), (siendo variable en las diferentes bombas) y el dominio interno, el citoplasmático, el cual es el más estable (proteína “cassette” unida al ATP-ABC), en donde está la actividad ATPasa.

Las proteínas funcionales como las transportadoras están formadas por unidades básicas, pudiendo ser diferentes o iguales los dominios de membrana ABC (Marchler-Bauer et al., 2016). Los transportadores ABC, son proteínas transmembrana, utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para llevar a cabo procesos biológicos, incluyendo el transporte de sustratos a través de las membranas y otros procesos no relacionados con el transporte, como la traducción del ARN y reparación del ADN. Juegan un papel esencial en la protección de los organismos frente a metabolitos tóxicos. Su ubicación comprende las membranas de diversas vacuolas, peroxisomas, mitocondrias y retículo endoplasmático (Marchler-Bauer et al., 2016).

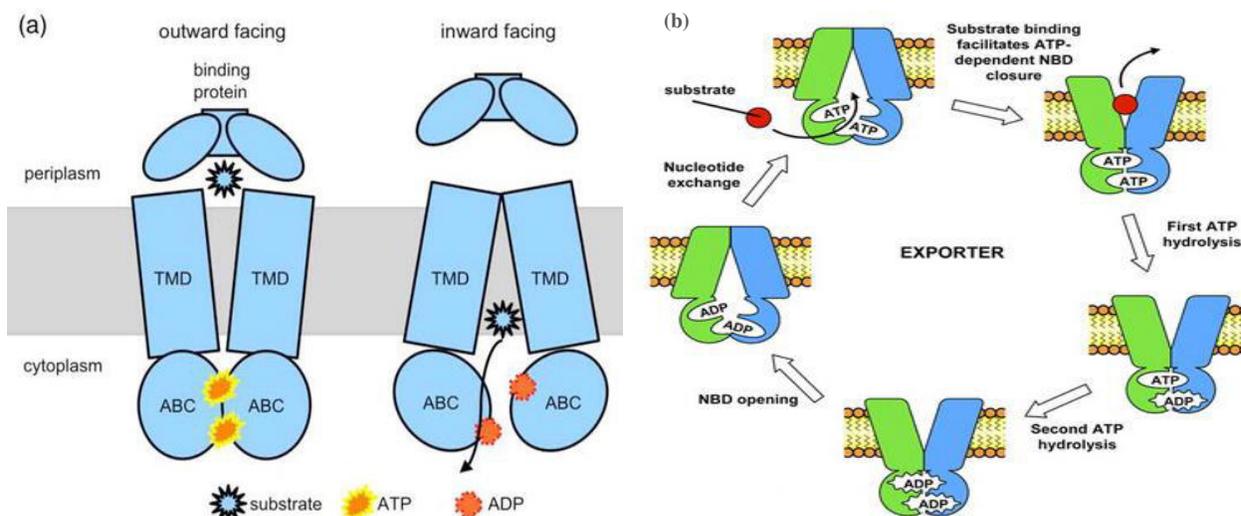


Figura 5. (a) Transportadores ABC con sus dos dominios transmembrana TMD funcionales: un dominio transmembrana-muy diverso entre las diferentes bombas y un dominio citoplásmico más conservado (la “cassette” de unión del ATP, ABC), en donde reside la actividad ATPasa. (b) El otro dominio funcional es el Dominio de Unión a Nucleótido (NBD), al cual se une el ATP aportando energía para el cambio conformacional, que en última instancia provoca el transporte. Todos los transportadores ABC tienen como mínimo dos dominios transmembrana y dos NBDs (Marchler-Bauer et al., 2016).

D. Proteínas de estrés

Existe un grupo de proteínas que regulan su expresión, en condiciones normales y en condiciones adversas, el estrés puede ser causado por diferentes agentes físicos y químicos como pH, calor o frío, escasez de nutrientes, metales pesados, entre otros. Klionsky *et al.* (1990) determinaron la importancia de los genes *hml1*, responsables del polipéptido HMT1 que participan en el transporte vacuolar. La secuencia señal de la fosfatasa alcalina (ALP) reprimible en *S. cerevisiae* puede dirigir polipéptidos quiméricos a la membrana vacuolar de la levadura en fase de formación. La compartimentación subcelular de los procesos metabólicos y compuestos es el sello distintivo de las células eucariotas cuando están expuestas a metales (Klionsky et al., 1990). Actualmente, se sabe que ciertos microorganismos como bacterias y levaduras, provenientes de zonas contaminadas por metales pesados, adquieren gran potencial de adaptación hacia estos metales, esto debido a sus diversos mecanismos de resistencia, como quelación de metales por fitoquelatinas y la activación del sistema antioxidante redox (AORS)

para reducir especies reactivas de oxígeno (ROS). La quelación de iones metálicos vía glutatión (GSH) y metalotioneína (MT) es un mecanismo que utilizan los microorganismos para bloquear a los metales (Hosiner et al., 2014; Llivisaca et al., 2011).

Está bien establecido que una gran variedad de proteínas hidrolasas se secuestra dentro de las vacuolas de hongos. Además, en el citoplasma, la homeostasis de una serie de aminoácidos y iones inorgánicos, tales como Ca^{2+} , Zn^{2+} y polifosfato, está mediada en parte por almacenamiento de estos compuestos en la vacuola. Por analogía, es concebible que las vacuolas de *S. pombe* jueguen un papel central en la detoxificación de metales pesados, mediada por fitoquelatinas (PQs). Esta afirmación es la conclusión de que la mayoría de los iones Cd^{2+} del tabaco se acumulan en la vacuola, al igual que los PQs se sintetizan en respuesta a este estrés (Vögeli-Lange & Wagner, 1990).

Los transportadores específicos que residen en las vacuolas de las membranas de los hongos, son responsables del mantenimiento vacuolar de arginina y Ca^{+2} para *Saccharomyces sp* (Klionsky et al., 1990), y para *N. crassa* (Davis, 1986). El hallazgo de una proteína de transporte, requerida para la acumulación de complejos HMW PQ-Cd-S-2, está localizado en la membrana vacuolar en *S. pombe*. Se sabe que la captación celular de iones Cd^{2+} induce la síntesis de FQs mediante la activación alostérica de FQS sintasa. Las FQs producidas quelarán los iones metálicos libres, probablemente formando el complejo de bajo peso molecular (LMW). En este modelo, el complejo LMW FQ-Cd funcionaría como un eliminador y portador de iones Cd^{2+} citoplásmico, mientras que el complejo HMW se ocuparía del almacenamiento. También (Pickett & Lu, 1989) y Mendum (1990) han propuesto que el reconocimiento del glutatión como transportador de membrana, los péptidos de las FQs, contiene restos de glutatión con carboxilo terminal, participando en el transporte celular de metales. Las FQs median la capacidad de tolerar a los metales pesados en los vegetales y hongos por la actividad de los complejos metales-fitoquelatinas en las vacuolas.

En la actualidad, solamente la proteína HMT1 de la levadura *S. pombe* ha sido descrita como un transportador de FQs, los intentos para identificar a los transportadores ortólogos de fitoquelatinas en plantas y otros organismos no han sido fructíferos. Información reciente demuestra que la mutante *hmt1* que no presenta transportadores ABC, acumula niveles

significativos de fitoquelatina en vacuolas, lo cual demuestra que existen otros transportadores no identificados de FQs en hongos (Mendoza, 2010). La eliminación de los transportadores ABC impide la acumulación en las vacuolas de FQs en *S. pombe*, quedando fuera la llegada de vesículas microsomales con metales. En estudios realizados en la familia de los transportadores ABC de *S. pombe*, se identificó al transportador ABC2, proteína que media el transporte de FQs. En contraste con HMT1, los transportadores ABC2 ortólogos, están ampliamente distribuidos entre las divisiones de organismos, estos se han propuesto como los transportadores vacuolares de FQs en vegetales y otros organismos (Mendoza, 2010).

Las proteínas, genes y otras biomoléculas pueden usarse como marcadores moleculares, de uso ambiental; estos deben ser aplicables, simples de detectar, altamente sensibles y rentables. El marcador debe mostrar una interferencia mínima con el sistema ambiental y con los procesos fisiológicos de la célula. La esencia de los marcadores moleculares, es su especificidad frente a una determinada respuesta. Por ejemplo, en el caso de las metalotioneínas (MT) como la Cup1 en *Saccharomyces cerevisiae*, responde de forma específica a altos niveles de cobre (Moore & Simpson, 1992). El ingreso del ión cobre al citosol es mediado por proteínas transportadoras que pertenecen a la superfamilia ABC. En presencia del ión cobre, se activan factores de transcripción, como el Ace2. Estos factores de transcripción activan al gen Cup1 que codifica para las metalotioneínas en presencia del ión de cobre, estas metalotioneínas atrapan estos iones para luego transportarlos a la vacuola (Moore & Simpson, 1992).

2.1.6 Biosorción de metales

La biosorción es un proceso que realizan los organismos para acumular iones metálicos, por diversos mecanismos, pasivos sin gasto de energía, o activos con gasto de energía, es un proceso que utiliza biomasa muerta (bioadsorción) o biomasa viva (bioadsorción y bioabsorción), con la finalidad de retirar o inmovilizar iones metálicos, de un medio líquido o sólido, estos procesos han sido estudiados desde los años 70 (Cañizares, 2000). Rodríguez et al. (2008) realizaron estudios con la finalidad de determinar la bioadsorción con biomasa muerta de *Saccharomyces cerevisiae* en aguas contaminadas con iones Pb^{2+} , Cd^{2+} y Cr^{3+} , y los efectos del pH, concentración de iones, presencia de electrólitos y tratamiento de la biomasa. Determinaron que el pH, la concentración de biomasa y el tratamiento previo tienen un efecto significativo sobre

la bioadsorción de Pb^{2+} . Para la bioadsorción del Cr^{3+} fueron significativos el pH de 4 a 5, y la densidad microbiana 10^8 UFC/mL; para la bioadsorción del ion Cd^{2+} , además de la biomasa, fue importante la presencia de co-iones (NaCl 0.01M) y el pH; por lo cual la extracción de los iones Cd^{2+} sería más complicada, que la extracción de los iones Cr^{3+} y Pb^{2+} . A pH 5.0 la cantidad de acumulación de iones Cr^{3+} y Pb^{2+} fueron del 47% y 56%, respectivamente. En tanto que a pH de 3.0, la cantidad de acumulación, en todos los metales fue menor. Se determinó que, para cada metal, los factores más importantes fueron el pH, la concentración del metal y la concentración de la biomasa.

Rehman & Anjum, (2011) realizaron estudios con *Candida tropicalis* con el fin de determinar la capacidad de bioacumulación de iones Cd^{+2} en un medio líquido que contenía 100 mg/L del ión y en aguas residuales. *C. tropicales* disminuyó el Cd^{+2} en 70%, 85% y 92% del medio después de 48, 96 y 144 h, respectivamente. También se determinó la eliminación del Cd^{+2} de aguas residuales en 40% y 78%, después de 6 y 12 días respectivamente. El Cd^{+2} en una concentración de 100 mg/L, es un ión que induce el aumento del glutatión (GSH) en 135%. El aumento en la síntesis de GSH está involucrado en la tolerancia del metal, la presencia de concentraciones crecientes de GSH puede ser un marcador en *C. tropicalis*, en condiciones de estrés a estos iones metálicos, en cepas adaptables a condiciones ambientales (Rehman & Anjum, 2011).

Estudios realizados por Li & Yuan, (2008) con la levadura *Rhodotorula* sp. *Y11* frente al Cd^{+2} , determinaron mediante microscopia electrónica de barrido (MEB), que la acumulación de Cd^{+2} en esta cepa, no causó efectos visibles en la morfología celular. Más del 20% de las células todavía mostraron viabilidad después de 15 h de acumulación de Cd^{+2} en una concentración de 100 ppm. El análisis microscópico mostró que la plasmólisis y la pared celular gruesa no fueron observadas en todas las células. En presencia de Cd^{+2} , las actividades de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) fueron mayores que el control por lo que las actividades de estas dos enzimas, también dependían de la exposición al metal. Por lo tanto, los autores sugieren que los antioxidantes desempeñan un papel importante en la tolerancia al cadmio en *Rhodotorula* sp. *Y11*. La electroforesis en geles de policrilamida reveló solo una isoforma SOD en Y11, incluso bajo exposición al Cd^{+2} .

En otros estudios evaluaron la bioacumulación del cobre en soluciones acuosas en las levaduras *C. tropicalis* y *Pichia guilliermondii*, Junghans & Straube, 1991 determinaron que la bioadsorción fue influenciada por factores ambientales. Las células de la fase de crecimiento estacionaria fueron capaces de adsorber una cantidad elevada de cobre, en un rango óptimo de pH entre 5.0 y 7.0. Según refieren los investigadores, la biomasa podría reutilizarse para la adsorción de Cu, después de la desorción por ácidos. Volesky & May-Phillips, (1995) evaluaron la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*, para secuestrar metales pesados en soluciones acuosas diluidas. Los resultados difirieron para uranio, zinc, cadmio y cobre a un pH óptimo de 4.0 a 5.0. La capacidad de captación de metal con levadura de cerveza muerta fue en el orden siguiente: U>Zn>Cd>Cu; con biomasa de levadura de cerveza viva fue Zn> Cd> U> Cu; con levadura viva de panadería se obtuvo biosorción Zn>Cu ~ (Cd)> U. La biomasa de levadura de cerveza muerta acumuló 0,58 mmol U/g. El mejor biosorbente de zinc fue levadura de panadería muerta (~ 0,56 mmol Zn/g de biomasa). Células muertas de *S. cerevisiae* eliminaron aproximadamente el 40% más de uranio o de zinc que los cultivos vivos correspondientes. La bioadsorción del uranio con biomasa de *S. cerevisiae* fue un proceso rápido que alcanzó el 60% a los 15 minutos de contacto con el fluido. La disposición del uranio difiere de otros metales pesados, más asociados con la pared celular, el uranio se depositó como cristales de aguja fina en el interior y el exterior de las células de *S. cerevisiae* (Volesky & May-Phillips, 1995).

Por otro lado, Donnellan et al. (1995) trabajaron con biomasa muerta de la cepa *Kluyveromyces marxianus* IMB3, productora de etanol; la levadura fue capaz de biosorber uranio con un valor calculado de 127 mg de U/g de peso seco de levadura después de la exposición de la biomasa a campos eléctricos de 2.500 V/cm durante 20 minutos. Sin embargo, con menores concentraciones residuales de uranio a 10 mg/L, la capacidad de la biomasa tratada aumentó significativamente. Trivedi & Patel, (2007) también trabajaron con un basidiomiceto tropical causante de la podredumbre blanca por su potencial de biosorción de cromo (VI) a partir de una solución acuosa, se realizó el pretratamiento de la biomasa fúngica con ácido y el resultado fue de 100% de adsorción de metal en comparación con el 26.64% de adsorción sin ningún tratamiento previo. La adsorción del cromo fue un proceso rápido a la exposición temprana, resultando en un 60% de eliminación de cromo en las primeras 2 h de exposición. Un aumento en la biomasa mostró un aumento en la adsorción de iones metálicos, pero una disminución en

la captación específica de iones metálicos. Las concentraciones de cromo tuvieron un efecto pronunciado sobre la adsorción. El rendimiento de adsorción fue del 100% cuando la concentración inicial de Cr (VI) fue de 100 ppm, con una biomasa de 1000 mg/L, la adsorción disminuyó a 47,5% de Cr (VI), con una biomasa de 500 mg/L.

Rehman et al. (2007), trabajaron en un cultivo con *C. tropicalis* en un medio con 100 ppm con iones Cu^{+2} , la disminución del cobre fue en 74%, después de las 96 horas de incubación. Los cultivos de la levadura también fueron capaces de disminuir el ión Cu^{+2} en 16%, 20%, 29%, 43%, 46%, 55% y 68% del medio después de 6, 12, 18, 24, 30, 48 y 72 horas, respectivamente. Muchas cepas de *Candida* spp, también tenían la capacidad de bioacumular metales.

En trabajos con efluentes industriales con iones Cd^{+2} , se evaluó la capacidad de la levadura *C. tropicalis* para eliminar ión Cd^{+2} . Se pudo determinar que *C. tropicalis* eliminó 40% de Cd^{+2} de las aguas residuales después de 6 días y el 78% de Cd^{+2} después de 12 días. También se determinó que la levadura acumuló Cd^{+2} en 28 y 60 mg/g de biomasa en un medio que contenía 100 mg/L de Cd^{+2} , a los 6 y 12 días de exposición. Rehman et al. (2007), al trabajar con *C. tropicalis* en aguas residuales industriales contaminadas con iones Cu^{+2} observó la disminución del 64% después de 4 días y el 74% después de 8 días. En un estudio realizado por Gutiérrez Moreno (2015) con biomasa muerta de *Serratia marcescens* M8A-2T para la remoción de Cd y Pb, la biomasa logró remover 99,97 % de Cd a pH 3.0 y 96 % de Pb a pH 7.0 después de 60 minutos de enfrentamiento con 100 ppm de cada uno de los metales. Si bien el trabajo fue realizado con biomasa muerta de esta bacteria, los resultados obtenidos fueron buenos.

2.1.7 Contaminación metálica de suelos y aguas

En algunas áreas urbanas y zonas de explotación minera, se elimina gran cantidad de relaves mineros que contaminan los ecosistemas terrestres, acuáticos y la atmósfera; los efluentes contaminados por escorrentía van a las aguas superficiales, también se filtran en aguas freáticas, subterráneas y acuíferos, sobre todo en cabeceras de cuenca, donde se van formando los ríos y constituyen las reservas de agua del planeta. La actividad minera genera la mayor contaminación de metales pesados (Ag, Au, Cr, Ni, Hg, Cu, Zn, Pb, Cd, Co, entre otros) también radionúclidos como (Th y U), muchas veces eliminados al ambiente sin un mínimo control

(Vullo, 2003). Los suelos contaminados son menos fértiles y es allí donde comienza la acumulación de metales en la cadena alimentaria, afectan la calidad del suelo, generando problemas en la agricultura. Las aguas subterráneas y acuíferos pueden estar comprometidos peligrosamente en su calidad, como consecuencia de la contaminación; el uso de este recurso es una fuente hídrica fundamental para el consumo humano. La descontaminación de lugares afectados por contaminación metálica mediante el uso de procesos químicos, involucra altos costos, debido a los subproductos específicos que se generan (Vullo, 2003).

La contaminación por metales pesados se ha extendido y ha causado graves problemas ecológicos en muchas partes del planeta. Entre estos metales pesados, el Cd se convierte en un problema generalizado de contaminación ambiental comúnmente generado por la minería, fundición, galvanoplastia y la pintura, lo cual está perjudicando por el aumento de la acumulación en tejidos animales, en humanos y en toda la cadena alimenticia (De Silóniz et al., 2002). Por lo expuesto, uno de los objetivos de la presente tesis fue: determinar la capacidad de biosorción de algunos metales pesados en nuestras levaduras seleccionadas y determinar la expresión de proteínas frente a diversos iones metálicos.

III. HIPÓTESIS

Las levaduras nativas aisladas de lagunas altoandinas contaminadas con relaves mineros biosorven metales pesados y modifican la expresión de proteínas en cultivos con iones Cu^{+2} , Cd^{+2} y Cr^{+6} .

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo General

Aislar, seleccionar e identificar levaduras nativas de lagunas altoandinas contaminadas con relaves mineros para determinar su potencial de resistencia, biosorción de metales pesados y variación en la expresión de proteínas en cultivos suplementados con iones Cu^{+2} , Cd^{+2} y Cr^{+6} .

3.2.2 Objetivos específicos

1. Aislar levaduras extremófilas resistentes a metales pesados de lagunas altoandinas contaminadas con relaves mineros.
2. Optimizar los parámetros fisicoquímicos que influyen en el crecimiento de levaduras nativas extremófilas.
3. Evaluar la resistencia de las levaduras seleccionadas frente a diferentes concentraciones de metales pesados.
4. Identificar molecularmente las levaduras seleccionadas, aisladas de ambientes altoandinos contaminados con metales.
5. Determinar la capacidad de biosorción de metales pesados en levaduras seleccionadas.
6. Evaluar la expresión de proteínas en *Yarrowia lipolytica* cepa AMJ6 cultivada en condiciones normales y en estrés con iones Cu^{+2} , Cd^{+2} y Cr^{+6} .
7. Determinar los grupos de proteínas que participan en diferentes vías metabólicas en *Yarrowia lipolytica* cepa AMJ6 cultivada en estas condiciones de estrés.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Metodología de trabajo

4.1.1. Muestreo y aislamiento de levaduras de aguas y suelos

- **Metodología y procedimientos aplicados.** Se realizó de acuerdo a los métodos de muestreo establecidos en los protocolos de monitoreo de calidad de agua del Subsector Minería del Ministerio de Energía y Minas y en el Protocolo Nacional de Monitoreo de la Calidad de Aguas Naturales de Aguas Superficiales, publicado mediante resolución Jefatura de la Autoridad Nacional del Agua N° 182-2011- Autoridad Nacional del Agua (ANA).
- **Estaciones de muestreo**

Las muestras se tomaron de cuerpos de agua altoandinos, ubicados en la cabecera de cuenca del río Mantaro y río Rímac. La cuenca del río Mantaro se encuentra en el departamento de Junín, Pasco y la cuenca del río Rímac en Lima. Ambas están en la sierra central del Perú. Las estaciones de muestreo fueron georreferenciadas en coordenadas UTM WGS84. Para ello, se utilizó el equipo GPS (GARMIN® eTrex 30). Las estaciones de muestreo se muestran en las Tablas: N° 2, N° 3, N° 4 y N° 5; Figuras: N° 6, N° 7, N° 8, N° 9, N° 10, N° 11 y N° 12.
- **Recolección de muestras:** Por cada estación se recolectaron 3 muestras de agua en botellas estériles de acuerdo a “Standard Methods for the examination of water and wastewater”, 22nd. Edition (2012). Los puntos de muestreo fueron realizados en diferentes lagunas y relaveras altoandinas de la sierra del Perú: laguna Pacococha en Huancavelica, relaveras Yanamate, Quiulacocha en Cerro de Pasco, lago Chinchaycocha (Junín), relavera Huarón, laguna Huacrancocha en Junín, y lagunas de cabecera de la cuenca del río Rímac.
- **Preservación y Almacenamiento:** Las muestras fueron preservadas y almacenadas, siguiendo las instrucciones establecidas por la norma de la Autoridad Nacional del Agua-ANA R.J-201-2011. El pH de las muestras se midió *in situ*, con un potenciómetro digital (EXTEC-DO700) (Tablas 1, 2, 3, 4 y 5). Posteriormente, fueron enviadas al Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

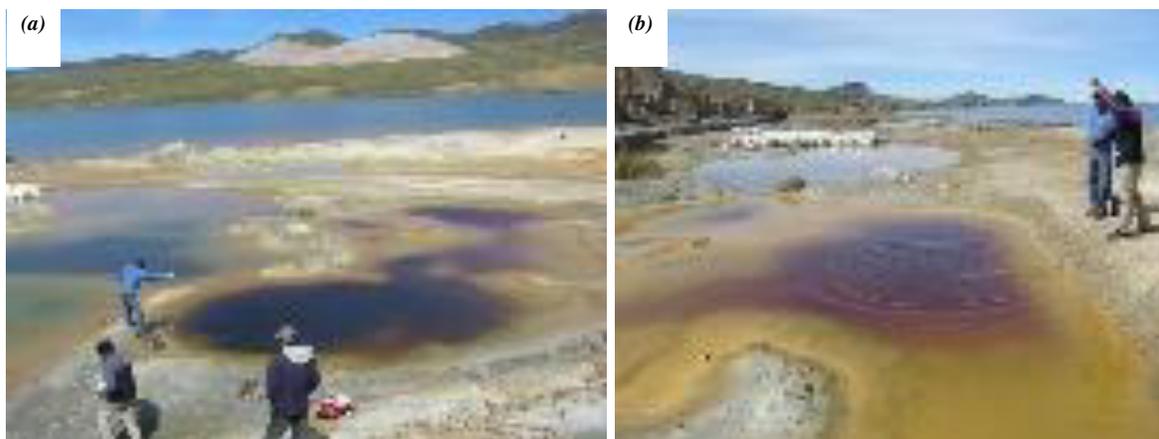


Figura N° 6. (a) y (b) Estación de muestreo de aguas y suelos con efluentes mineros de la laguna de Pacococha, provincia de Castrovirreyna, Región Huancavelica ubicada a 4400 msnm.

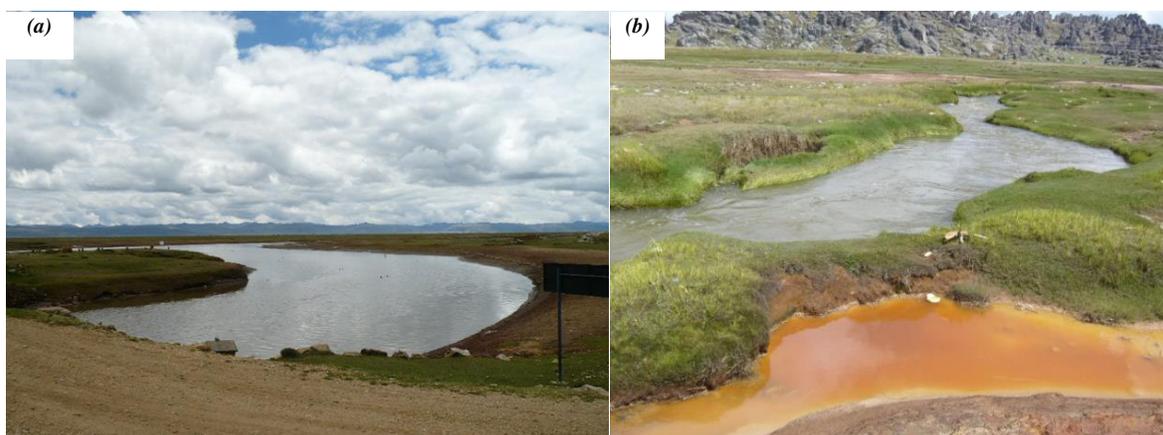


Figura N° 7. (a) y (b) Estación de muestreo de aguas y suelos de afluentes (puente Upumayo) de la laguna Chinchaycocha, ubicada a 4200 msnm. Pampa de Junín, Meseta de Bombón. Departamento de Junín.

- **Aislamiento de levaduras.** Para el aislamiento y selección de las levaduras, se sembraron las muestras en tubos con caldo Extracto de Levadura Peptona Glucosa (YPG) g/L: 30 g de glucosa, 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura a pH 4.0, incubado en un agitador a 150 rpm a 10 y 20 °C hasta por un tiempo de 3 semanas. Las muestras con crecimiento positivo, se resembraron por estriado en Agar YPG incubados a 10°C y 20°C, observándose el crecimiento hasta por 3 semanas. Se aislaron las colonias sospechosas de acuerdo a su aspecto y morfología de crecimiento. La metodología utilizada fue la propuesta por Martínez, (1993) y Lee et al. (1975^a).

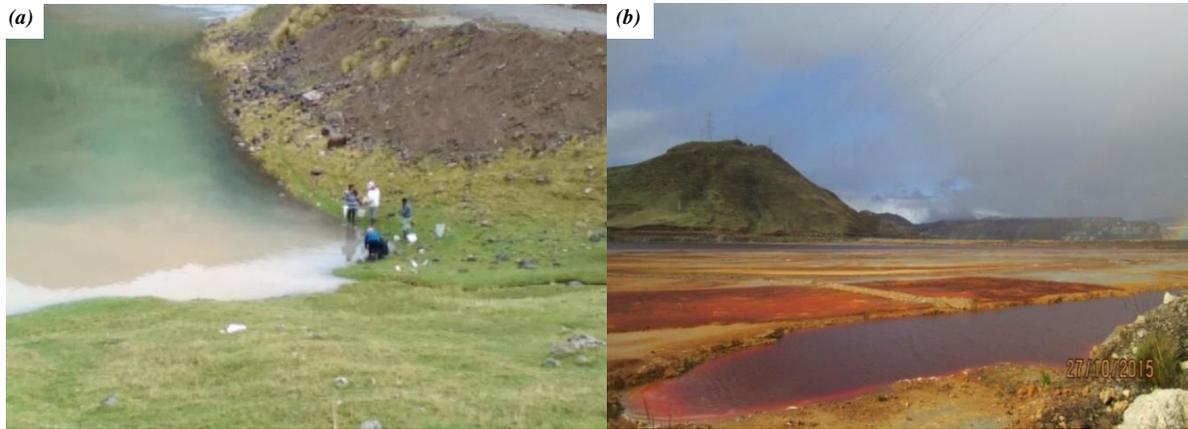


Fig. 8. (a) Efluentes neutralizados eliminados de Minera Milpo. (b) Relavera Quiulacocha - Pasco



Fig. 9. (a) y (b) Monitoreo físico-químico y biológico en la relavera Quiulacocha (4273 msnm) Pasco.

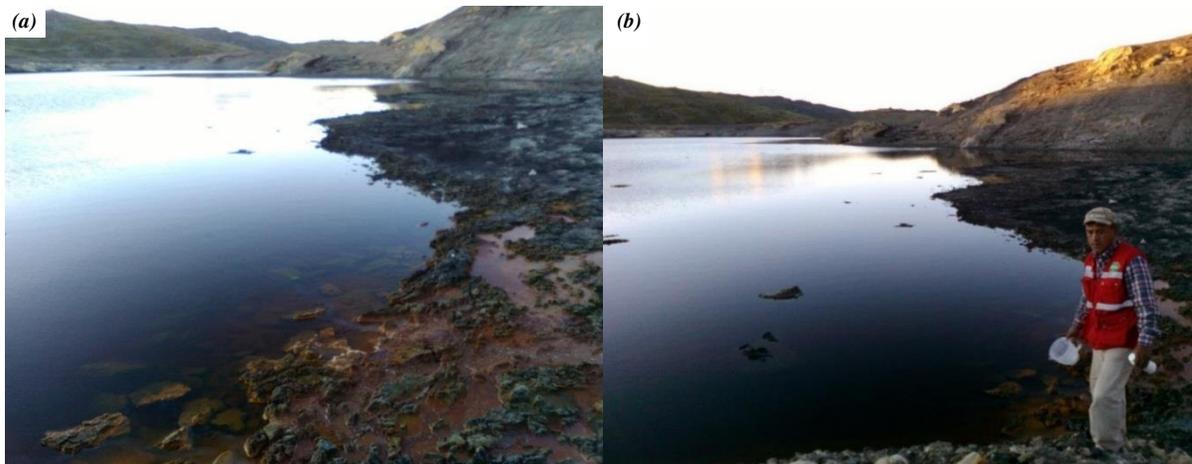


Fig. 10. (a) y (b) Monitoreo físico-químico y microbiológico de la relavera Yanamate (4347 msnm) Pasco.

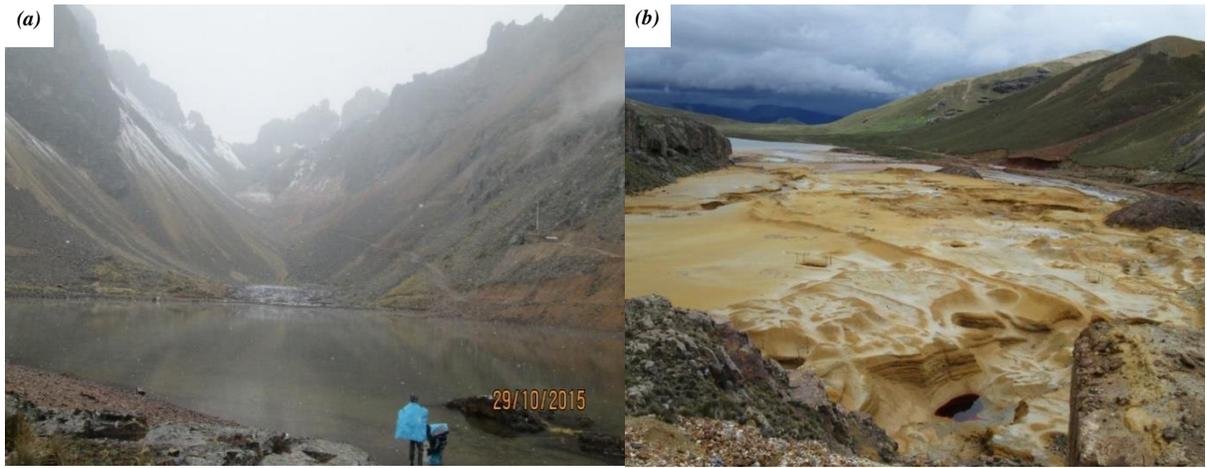


Fig. 11. (a) Laguna Sta. Catalina (4777 msnm), cabecera de cuenca del Rímac y (b) Pasivo Ambiental-Relavera Sillustani Puno (4600 y 4860 msnm).

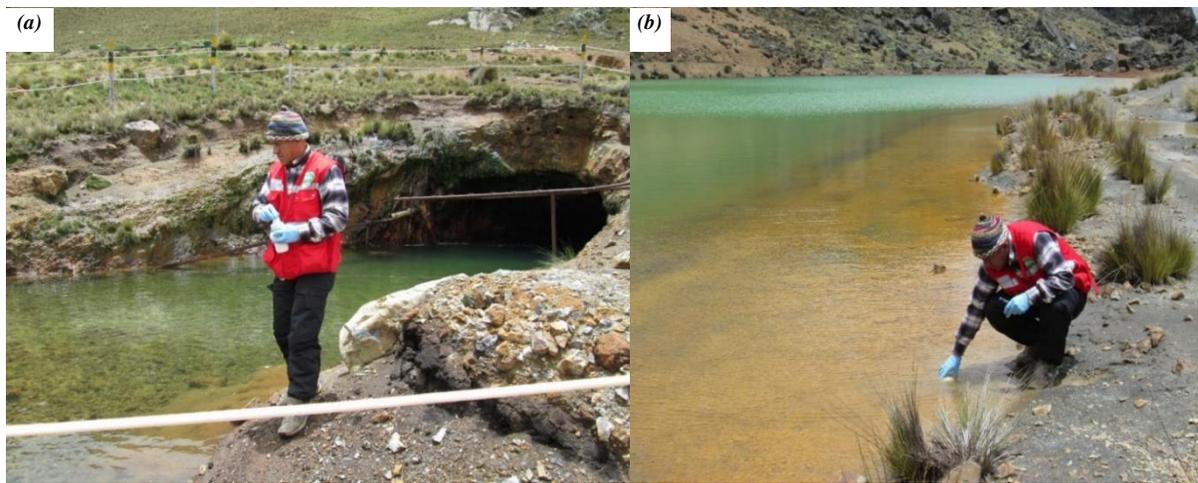


Fig. 12. (a) y (b) Monitoreo físico-químico y microbiológico en pasivo ambiental, boquerón Sillustani con aguas ácidas pH 2,5 Puno (4850 msnm).

4.1.2. Evaluación del crecimiento de las muestras a diferentes valores de pH

Las muestras fueron cultivadas en tubos con caldo YPG a pH de 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, y 6.0 e incubadas a 20 °C en agitación constante a 150 rpm, el crecimiento fue evaluado constantemente hasta 15 días. Los resultados se muestran en las Tablas N° 6, N° 7, N° 8, N° 9 y N° 10.

4.1.3. Selección de colonias

Los medios de cultivo que presentaron turbidez fueron sembrados por estriado en agar YPG bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo. Después fueron seleccionadas las colonias de levaduras, de acuerdo con su aspecto y morfología, siguiendo la metodología propuesta por Acosta, 2005; Lee et al., 1975. De acuerdo a las características culturales de las colonias de levaduras, se escogieron colonias para la realización de los ensayos de resistencia a diversos metales pesados. Las colonias de levaduras seleccionadas fueron criopreservadas en el cepario a -20 °C, en viales con medio YPG semisólido a pH 4.0, con glicerol al 10 %. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y guardados en nuestro laboratorio para su posterior evaluación (Figuras 13, 14, 15 y 16).

4.1.4. Preparación de la solución estándar de metales empleados

Las soluciones de iones metálicos se prepararon a partir de sales ($K_2Cr_2O_7$, $CoCl_2$, $HgCl_2$, $ZnCl_2$, $BaCl_2$, $CdCl_2$, Cu_2SO_4 , $(CH_3-COO)_2 Pb$), diluidos en agua destilada estéril, se tomó en consideración la concentración del ión metálico en cada sal. Las soluciones stock se enviaron al laboratorio USAQ de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM y al Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas de la Universidad Nacional Agraria La Molina, con la finalidad de cuantificar la concentración de los iones metálicos, en las soluciones stock preparadas. La metodología para la cuantificación de metales, fue realizada por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).

4.1.5. Resistencia a metales pesados y/o Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Para determinar la resistencia y/o tolerancia de las cepas seleccionadas a los metales pesados, se utilizó la técnica de resistencia en medio sólido y líquido, determinándose la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a los diferentes iones metálicos. Las cepas seleccionadas fueron resembradas en caldo YPG y en Agar YPG, pH 4.0 con diferentes concentraciones de iones metálicos, partiendo de una concentración inicial de 25 hasta 600 ppm, excepto para el mercurio fue menor, se trabajó hasta 200 ppm. Luego se incubaron a 20 °C, hasta por tres semanas (Tablas 15 a 21). La CMI en medio líquido se realizó con 4 metales (Cr^{+6} , Cd^{+2} , Cu^{+2} , y Hg^{+2}), tomando en consideración el peso equivalente de cada metal en la sal. Las cepas que mostraron crecimiento a altas concentraciones de metales fueron criopreservadas a -20 °C, en viales con medio YPG semisólido a pH 4.0, con glicerol al 10%. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Los resultados del crecimiento en estas concentraciones de metales se reportan en la Tabla N° 22.

4.1.6. Caracterización molecular de las cepas resistentes a metales pesados.

Se seleccionaron levaduras de diferentes cuerpos de agua altoandinos, contaminados con metales pesados, las mejores cepas con mayor resistencia a los iones metálicos y/o la mayor CMI, de diversas regiones: Huancavelica, Junín, Pasco y cabecera de cuenca del Rímac. Las cepas fueron procesadas y guardadas para evaluar la resistencia y biosorción de metales pesados y posterior identificación molecular. Estas fueron criopreservadas a -20 °C en viales con medio YPG semisólido a pH 4.0, con glicerol al 10%.

4.1.6.1. Extracción y purificación del ADN genómico

La extracción de DNA se cultivaron levaduras en caldo YPG por 48 horas, pH 4.0 y a 20 °C. Las cepas seleccionadas fueron lisadas mediante el siguiente protocolo modificado por el equipo del laboratorio (Doyle & Doyle, 1990).

A. Protocolo para la extracción de ADN en levaduras (Doyle & Doyle, 1990).

A.1. Colecta de células

Se centrifugaron los cultivos por 15 min a 5000 rpm., se eliminó el sobrenadante en un frasco con desinfectante. Posteriormente se resuspendió en 3 mL buffer TE (20:5) y se homogenizó el pellet con vortex. Se centrifugó el cultivo celular por 15 min x 5000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron los pellets en buffer TE (20:5) con vortex.

A.2. Etapa Lisis Celular:

Se alicuotó 0.5 mL del cultivo en tubos eppendorf, se centrifugó 10000 rpm x 10 min y descartó el sobrenadante. Luego se agregó buffer (v/v) CTAB 2X y homogenizaron las muestras e incubados a 60 °C x 1 día. Se observó el efecto de lisis (no se debe formar pellet). Se agregó SDS del (10% → 2%) del volumen total. Se observaron la formación de 2 fases (densidades).

A.3. Purificación del ADN:

Se agregó 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos. Se separó la fase superior del anillo de precipitación formado, luego se agregó NaCl (5M → 0.25M) equivalente al volumen total. Agregamos 0.5 mL de isopropanol y se homogenizó las muestras. Refrigeramos a -20 °C por un tiempo mínimo de 2 h y observamos la formación de precipitado color blanco. Las muestras positivas se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 min x 4 °C. Descartamos el sobrenadante, después el ADN precipitado de cada muestra, se conservó en eppendorf.

A.4. Lavado del ADN

Agregamos a cada tubo eppendorf con ADN 0.5 mL de alcohol al 70% (rebajado en TE 20:5). Invertimos de 4 a 5 veces el tubo, reposando por 5 min a temperatura ambiente. Centrifugamos a 10000 rpm por 15 min y eliminamos el sobrenadante. Repetimos el proceso de lavado (2 veces). Agregamos a cada tubo 0.5 mL de alcohol al 70%. Centrifugamos a 10000 rpm por 15 min y eliminamos el sobrenadante. Secar los tubos a temperatura ambiente o incubar a 40 a 60°C, mínimo 6 h. Volteamos los tubos si hay restos de etanol (spin down). Se resuspendió el ADN, en 200 µL de TE 20:1. Las muestras se guardaron a -80 °C para hacer realizar la PCR.

4.1.6.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región D1/D2 LSU

Se amplificó la región D1/D2 LSU de la subunidad 26S ribosomal de las cepas, se utilizó los iniciadores: **F63**: (5`-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3`) y el primer **LR3**: (5`-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3`) (Orbegozo et al., 2008). Utilizando el siguiente protocolo de PCR: 3 min, 95 °C; 30 ciclos por 30 s a 95 °C (desnaturalización), 30 ciclos por 30 s a 57 °C (alineamiento); 30 ciclos 2 min a 72 °C (extensión); y finalmente 5 min a 72 °C. El protocolo del mix de la PCR para las 6 muestras fue el siguiente: 6 µL del iniciador F63 y LR3, 6 µL de dNTP (10 mM), 60 µL de Buffer TAE (5X), 9 µL de MgCl₂ (25 mM), 133.5 µL de agua ultra pura, 10 µL DNA molde de cada muestra y 1.5 µL de *Taq* polimerasa, para un volumen final de 226 µL.

Los amplificados fueron guardados en refrigeración a -80 °C para su posterior secuenciamiento. Los productos de la PCR fueron revelados en gel de agarosa al 1 y 2 % en buffer TAE 1X, el gel fue teñido en bromuro de etidio al 0.25% y revelado en el transiluminador Labnet International, inc. UV.

4.1.6.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Se preparó el gel de agarosa a una concentración de 2%, se vertió sobre la cámara de electroforesis y se colocó las peinetas. Las muestras de DNA se mezclaron con el buffer de carga (0,25% azul de bromofenol, 40% sacarosa), en una relación de 2:8 µL. Como marcador de estándar se utilizó MassRuler™ DNA Ladder Mix –Fermentas. Se colocaron el buffer/DNA en cada pocillo del gel de agarosa (Difco BRL®) y se conectó la cámara de electroforesis a la fuente de poder. El DNA corrió a 100 V por 20-40 min, al finalizar la electroforesis, se colocó el gel, en bromuro de etidio por 10 a 15 min. El revelado del gel se realizó en el transiluminador Labnet, con luz ultravioleta de 320 nm de longitud.

4.1.6.4. Secuenciación e identificación molecular

Los amplificados de ADN de los aislados y los iniciadores F63 y LR3 se enviaron a la empresa MACROGEN USA (<http://www.macrogen.usa.com>) y a la empresa Molecular Cloning Laboratories (MCLAB), EEUU.

El análisis *in silico* se realizó mediante herramientas bioinformáticas empleando el programa Bioedit (Hall, 1999) para evaluar y obtener la secuencia consenso de los cromatogramas. Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron alineadas con otras secuencias nucleotídicas almacenadas en el GenBank usando el Blastn (Altschul et al., 1990) para su identificación. Posteriormente, se usó el programa CLUSTALW (Chenna et al., 2003) para los alineamientos múltiples y realizar el análisis filogenético de las cepas seleccionadas. Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron depositadas en la base de datos de genes y genomas (GenBank). El análisis filogenético fue realizado mediante el uso del programa MEGA v7 (Stecher et al., 2016) y para la determinación del mejor modelo evolutivo, se realizó el análisis Best DNA Model empleando el método Neighbor-Joining y el Modelo de Kimura 2 parámetros.

4.1.6.5. Cinética de crecimiento y concentración letal media (CL50)

Considerando la falta de información científica sobre levaduras, aisladas de zonas altoandinas y de relaves mineros en general, procedimos a realizar la cinética de crecimiento con las cepas AMJ3 y AMJ6. Para este ensayo se prepararon inóculos a una concentración inicial de 2.5×10^8 UFC/mL y 5.0×10^8 UFC/mL para la cepa AMJ3 y AMJ6, respectivamente. Un volumen de 30 mL (10%) de cada uno de los inóculos, fueron transferidos a matraces que contenían 270 mL de caldo YPG pH 4.0, e incubadas a 20 °C con agitación constante de 150 rpm. A partir del comienzo del cultivo, cada 6 h fue colectada una muestra de 2 mL para medir la densidad óptica (Bankar et al., 2018), realizar diluciones y sembrar 100 µL de las últimas diluciones en placas conteniendo agar YPG pH 4.0. Estos cultivos fueron incubados a 20 °C por 48 h para el conteo de UFC/mL y determinar la viabilidad celular y la cinética de crecimiento de las levaduras.

La determinación de la Concentración Letal Media (CL₅₀), se realizó exponiendo el inóculo, por 3 h, a diferentes concentraciones de cada ión metálico (Cd⁺², Cu⁺², Cr⁺⁶ y Hg⁺²), se determinó la muerte del 50% de la población de dos cepas de *Yarrowia lipolytica*. Los valores de la CL₅₀ de las cepas, fueron calculados mediante la viabilidad celular en placas conteniendo agar YPG, comparando con el control, sin metal, todos los ensayos fueron realizados en triplicado.

4.1.6.6. Biosorción de metales pesados

Para la biosorción de metales se tomó como referencia las cinéticas de crecimiento y los ensayos de CL50. Para la biosorción de los iones cromo (Cr^{6+}) se trabajaron con 15 ppm con la cepa AMJ3 y 50 ppm con la cepa AMJ6; para la biosorción del ión Co^{+2} se trabajó con 50 ppm; con el ión Zn^{+2} se trabajó con 50 ppm, y para la biosorción del ión Cu^{+2} se trabajaron a una concentración 80 ppm. Los ensayos de biosorción de los iones metálicos, se realizaron en matraces de 1 L con caldo YPG, pH 4.0, en el cual se incorporó cada metal por separado. Se inoculó el 10% (v/v) de cada cepa, con una concentración promedio de 10^7 UFC/ml. Se incubaron por 96 h a 20 °C a 150 rpm. Se tomaron 50 ml del cultivo cada 24 h, se centrifugaron a 4,500 rpm por 20 min y los sobrenadantes se utilizaron para medir la concentración del metal, mediante Espectroscopia de Emisión por Plasma-Método basado en EPA 200.7 - Rev.4.4-1994.

4.1.6.7. Obtención de biomasa y extracción de proteínas totales

Con la finalidad de realizar estudios proteómicos en *Y. lipolítica* cepa AMJ6, se cultivaron en matraces en medio mínimo de Vogel-Bonner, suplementados con diferentes iones metálicos (Cd^{+2} , Cu^{+2} y Cr^{+6}) y controles de medio mínimo, sin metal. Se obtuvieron células en fase exponencial de crecimiento de la cepa cultivadas en matraces de 500 mL con Medio Mínimo de Vogel-Bonner suplementado con extracto de levadura (1 g/L) y extracto de malta (1 g/L), pH 4.0. Se tomó 250 mL del cultivo de fase exponencial y transferido a tubos cónicos de 50 mL, previamente se pesaron los tubos para determinar la biomasa celular. Los tubos con los cultivos fueron centrifugados a 7500 rpm por 10 min a 4 °C, luego el sobrenadante fue descartado para obtener los pellets. Los tubos con el pellet (biomasa húmeda) fueron pesados, se restó el peso del tubo vacío y se obtuvo el peso húmedo del paquete celular (W_H). El pellet fue resuspendido en buffer Tris-HCl 10 mM (pH 8.8), conteniendo el inhibidor de proteasas Cocktail Inhibidor de Proteasas Set IV – Calbiochem (Merck), para luego realizar dos lavados con Buffer Tris-HCl 100 mM y 10 mM (pH 8.8) con los inhibidores de proteasas a 7000 rpm por 10 min. Los pellets resuspendidos buffer Tris-HCl 10 mM (pH 8.8), conteniendo el inhibidor de proteasas, fueron sonicados, usando el equipo Misonix Sonicator ®, modelo XL-2000-010, con potencia de 20 kHz por 40 s y descanso de 20 s en hielo, el sonicado se realizó en 20 ciclos. El lisado celular fue centrifugado a 14000 rpm a 4 °C y el sobrenadante se colectó y guardó a -80 °C. Se

tomó un volumen de 5 μ L de cada sobrenadante para observar el perfil proteico mediante electroforesis SDS-PAGE para proteínas en geles de poliacrilamida. Para la cuantificación de proteínas se utilizó un stock de albúmina de suero bovino (ASB) para graficar la curva estándar, a 280 nm, los ensayos de cuantificación de las proteínas obtenidas de nuestras levaduras se utilizó el reactivo de Bradford a 660 nm.

4.1.6.8. Digestión de proteínas y marcaje con iTRAQ-8-plex®

La muestra de proteína total de la cepa *Y. lipolítica* AMJ6 fue cuantificada usando el kit Protein assay kit (Pierce®), y la lectura realizada en un espectrofotómetro a 660 nm. Se colectó aproximadamente 500 μ g de proteínas totales de levadura sometida a estrés por iones metálicos (Cd^{+2} , Cu^{+2} y Cr^{+6}). Las Muestras fueron enviadas al laboratorio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)-Madrid España, para realizar el marcaje y cuantificación siguiendo sus procedimientos estandarizados; fueron precipitadas usando el método basado en la mezcla de metanol/cloroformo (5:1) (Fic et al., 2010). Las proteínas precipitadas fueron tratadas siguiendo la metodología de Oetiker (Oetiker et al., 2018), las cuales fueron resuspendidas y desnaturalizadas en 20 μ L de 7 M úrea/2M, Tiourea/100 mM, Triethylamonium bicarbonate-TEAB, pH 7.5. Posteriormente, fueron reducidas con 1 μ L de 50 mM de Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP, AB SCIEX) a pH 8.0 e incubado a 37 °C por 60 min, luego la alquilación de las cisteínas libres se realizó agregando 2 μ L de metil metanetiosulfonato (MMTS, Pierce®) por 10 min a temperatura ambiente. Por último, las muestras de proteínas desnaturalizadas fueron diluidas en un volumen de 120 μ L de TEAB 50 mM para reducir las concentraciones de urea/tiourea.

La digestión de las proteínas de cada muestra se realizó adicionando 2 μ g de tripsina (Grado secuenciamiento Sigma-Aldrich®) en una relación de 1/25 (masa/masa), incubadas a 37 °C *overnigth* bajo agitación, luego de la digestión las muestras fueron secadas, evaporando el disolvente en un rotavapor. Cada muestra digerida con Tripsina, fue reconstituida con 80 μ L de etanol 70%/TEAB 50 mM, luego marcada con iTRAQ-8-plex Kit (AB SCIEX) a temperatura ambiente por 2 horas siguiendo las indicaciones del fabricante y bajo el siguiente esquema: iTRAQ 113 reagent = control 1; iTRAQ 114 reagent: control 2; iTRAQ 115 reagent: Cd1;

iTRAQ 116 reagent: Cd²; iTRAQ 117: Cu¹; iTRAQ 118 reagent: Cu²; iTRAQ 119 reagent: Cr¹; iTRAQ 120 reagent: Cr²; iTRAQ 121 reagent. Después del marcaje, las muestras fueron combinadas y la reacción fue detenida por evaporación en un SpeedVac. Las sales de las muestras fueron removidas usando columna “SpePak C18”.

4.1.6.9. Cromatografía líquida y análisis de espectrometría de masas

Una alícuota de 2 µg de cada muestra fue inyectada a un sistema de Cromatografía Líquida de Alta Precisión-Espectrometría de Masas en Tándem de Ionización por Electropulverización HPLC-ESI-MSMS (Eksigent Technologies nanoLC Ultra 1D plus, AB SCIEX, Foster City, CA) acoplada a un espectrómetro de masas triple y una fuente de Nanospray III. El volumen de 5 µL fue inyectado al sistema LC ESI-MSMS que emplea una columna analítica de fase inversa. Con un suministro de la bomba de carga de una solución de ácido fórmico al 0,1% en agua con un flujo de 2 µL/min, con condiciones de gradiente usando el mismo ácido como fase móvil A y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo como fase móvil B realizando la elusión bajo las siguientes condiciones: condiciones isocráticas de 96% de A: 4 % de B por 5 min, luego aumento lineal hasta 40 % B con un tiempo de 205 min, luego aumento lineal hasta 90 % B con 15 min adicionales, luego condiciones isocráticas del 90 % B por 10 min y retorno de la condición inicial en 2 min, con un tiempo total de 250 min.

La adquisición de datos se realizó con un sistema Triple TOF 5600 con una ionización realizada bajo las siguientes condiciones: 2800 voltios de pulverización de iones flotantes (ISFV); gas de cortina (CUR) 20; temperatura del calentador (IHT) 150; fuente de iones de gas 1 (GS1) 20, potencial de desintegración (DP) 85 Voltios. Todos los datos fueron adquiridos usando el método de adquisición independiente (IDA) con el software de análisis TF 1.7 (AB SCIEX, USA), usando rango de masa de 350-1250 Da, con criterios de conmutación de iones de relación masa/carga (m/z) superiores a 350 y menores que 1250 con un estado de carga entre 2-5, y un umbral de abundancia de más de 90 conteos.

4.1.6.10 Análisis de los datos y estadística

Todos los espectros generados se exportaron en formato MGF (formato de imagen para representar gráficos 3D) usando Peak View v1.2.0.3 Para luego realizar la búsqueda en los

servidores MASCOT 2.5.1, OMSSA 2.1.9, X!TANDEN 2013.02.01.1 y Myrimatch 2.2.140 contra una base de datos construida a partir de 6454 secuencias del proteoma de *Y. lipolytica* cepa referencial (Strain CLIB 122/E150), secuencias obtenidas de Uniprot knowledgebase (<https://web.expasy.org>). Luego de la recalibración, los motores de búsqueda se configuran con la finalidad de coincidir con los candidatos peptídicos posibles con una tolerancia de error de masa de 10 ppm, y de fragmentos ionizados de 0,02 Da, considerando modificaciones de cisteína fija (MMTS) y la oxidación de la metionina como variable. Los modelos empleados en la distribución de puntajes para calcular los valores de p-values y espectros recuperados con un FDR (Tasa de falsos positivos, del inglés: *False Discovery Rate*).

V. RESULTADOS

5.1. Georreferenciación y determinación de parámetros fisicoquímicos de las lagunas muestreadas

Las lecturas de las mediciones de pH de las muestras de aguas y suelos de la laguna Pacococha, medidas *in situ*, presentaron un rango de pH de 2.13 a 5.50, evidenciando que los cuerpos de agua monitoreados estuvieron contaminados con efluentes mineros (Tabla N° 1). Las Tablas 2, 3, 4 y 5 reportan la georreferenciación y resultados de algunos parámetros fisicoquímicos medidos *in situ* de las lagunas altoandinas de Junín, Pasco y cabecera de cuenca del río Rímac.

Tabla N° 1. Medición del pH *in situ* de las muestras de aguas y suelos contaminados con efluentes mineros de la laguna Pacococha, Huancavelica (4400 msnm).

Muestra de agua	pH	Muestra de suelo	pH
AMP1	3.30	TMP1	3.60
AMP2	2.76	TMP2	3.00
AMP3	3.78	TMP3	4.00
AMP4	3.16	TMP4	5.00
AMP5	4.25	TMP5	5.50
AMP6	2.51	TMP6	2.80
AMP7	2.76	TMP7	3.00
AMP8	2.13	TMP8	2.50

AMP: Muestra de Agua de Pacococha

TMP: Muestra de Suelo o Tierra de Pacococha

En las Tablas 1, 2, 3, 4 y 5 se muestran los parámetros fisicoquímicos evaluados. Los pH más bajos corresponden a la relavera Yanamate (pH 2.4) y la laguna Quiulacocha (pH 2.49) y con altas conductividades correspondiente a 5200 μS y 3860 μS , respectivamente. Las demás lagunas presentaron pH entre 5.18 a 7.92, contaminados con relaves mineros, pero al ser tratados con sustancias neutralizantes de ácidos, los pH medidos estuvieron cercanos al neutro, como es el caso, del lago Junín (MINAM, 2011). De acuerdo a los resultados de análisis de metales por

el Instituto de Corrosión y Protección de la Católica (Informe ICP/INF-301-2016). En las estaciones 3 y 4 correspondientes a la relavera Huarón, el calcio estuvo alrededor de 272,4 ppm por lo que se presume que la relavera fue tratada con algún compuesto neutralizante (carbonato de calcio), en el caso de la Reserva Nacional del lago Junín el valor del calcio reportado fue de 235,5 ppm, los valores de metales en el lago Junín estuvieron dentro de los ECAs, excepto el hierro, cinc, calcio, cobre y el plomo los cuales estaban sobre los ECAs establecidos para estos cuerpos de agua. En el caso del hierro se obtuvo un valor de 41.5 ppm en el lago Junín. Sin embargo, en la legislación peruana no están reportados los ECAs del hierro y calcio (Decreto Supremo N° 014-2017-MINAM).

Tabla. 2 Parámetros fisicoquímicos de cuerpos de agua altoandinos de la Región Junín, Pasco y cabecera de cuenca del río Rímac (georreferenciados en junio, 2015)

N°	Estaciones de muestreo corregidas por GEOCADMIN - ANA	COORDENADAS UTM		ALTITUD (msnm)	Parámetros fisicoquímicos			
		18L GWS 84			pH	Temperatura (°C)	Conductividad (mS)	TDS (ppt)
		E	S					
1	Laguna Yuracmayo - represa – pto 1	374143.000	8690513.00	4326	6.80	10.8	0.15	0.07
2	L. Yuracmayo-represa- pto 2	374229.940	8690423.487	4320	6.42	11.7	0.15	0.07
3	L. Yuracmayo - represa – pto 3	376613.600	8687713.46	4325	6.77	10.5	0.10	0.07
4	Quebrada L. Cutay - Río Blanco	371210.336	8694259.05	4249	6.75	9.00	0.23	0.11
5	Centro Poblado Caruya - Puente	363457.000	8701184.00	3601	6.10	8.90	0.41	0.10
6	Laguna Ticticocha	368976.299	8716613.05	4684	6.34	8.00	0.24	0.12
7	Rebalse de laguna Leoncocha	370145.578	8716967.79	4821	5.60	7.60	0.14	0.07
8	Escorias de Huacracochoa - relave	373621.000	8717508.00	4651	5.67	15.0	0.33	0.16
9	Laguna Churuca	374384.271	8717265.86	4630	4.59	11.5	0.62	0.30
10	Laguna Huascocha - Represa	381373.936	8718326.91	4366	6.56	10.5	1.09	0.54
11	Laguna Pomacocha	377987.602	8704386.21	4279	6.56	10.5	0.41	0.20
12	Lago Junín - Pto 1	378916.313	8772988.85	4088	7.21	14.0	0.32	0.16
13	Lago Junín - Pto 2	374859.528	8778313.75	4084	7.49	16.0	1.05	0.52
14	Lago Junín - Pto 3	369824.632	8781884.24	4084	7.90	20.0	0.43	0.21
15	Lago Junín - Pto 4	363858.889	8790283.59	4083	7.72	19.1	0.26	0.13
16	Lago Junín - Puente Upamayo - Pto 5	362023.837	8792482.55	4087	8.44	9.60	0.43	0.21
17	Lago Junín - Puente Upamayo - Pto 6	361978.012	8792505.92	4087	7.46	11.2	0.42	0.21

Continuación

18	Relavera Yanamate - relave - Pto 1	363540.503	8814894.33	4346	2.58	10.7	4.04	2.12
19	Relavera Yanamate - relave - pto 2	363824.889	8815541.09	4345	2.18	13.6	12.32	6.27
20	Relavera Yanamate - relave - pto 3	363864.479	8815626.03	4345	3.32	12.5	2.77	1.40
21	Trocha Pasco - cuerpo de agua	362349.603	8815443.86	4349	6.97	11.3	0.08	0.10
22	Laguna Patarcocha	363119.000	8818278.00	4336	7.96	11.4	0.32	0.66
23	Laguna Quiulacocha - relave	359466.687	8816540.07	4257	2.58	6.90	9.20	4.57
24	Laguna Yananyacu	395770.219	8749059.92	4327	7.75	8.80	0.11	0.05
25	Laguna Bolsac	393434.450	8749619.42	4317	7.63	12.1	0.30	0.15
26	Laguna Marca	393451.951	8749829.31	4324	7.31	15.4	0.30	0.14
27	Laguna Azulmito	392014.376	8750366.72	4377	7.52	15.1	0.14	0.07
28	Laguna Huacra - Huacracocho	387897.210	8752887.95	4353	7.67	13.1	0.10	0.20
29	Quebrada - Minera Carhuacayan - Pto 1	356405.370	8762664.87	4203	6.95	14.6	1.65	0.83
30	Quebrada - Minera Carhuacayan - pto 2	356414.465	8762663.96	4204	3.27	13.2	1.32	0.66
31	Laguna Huaroncocha	345813.750	8778969.36	4591	7.76	12	0.16	0.06
32	Laguna Huay Huay	347619.980	8774994.16	4598	8.83	13.9	0.13	0.06
33	Laguna Huascacocho - Represa	349572.367	8771625.32	4506	9.12	9.5	0.10	0.05

TDS: Total de solidos disueltos;

UTM: Universal transversal Mercator (en inglés "Universal Transverse Mercator")

E : Este

S : Sur

Tabla. 3 Caracterización fisicoquímica de cuerpos de agua Altoandinos de la Región Junín, Pasco y cabecera de cuenca del río Rímac (georreferenciados en octubre, 2015)

N°	Estaciones de Muestreo corregidos por GEOADMIN ANA	Coordenadas en UTM GWS 84		Altitud (msnm)	Parámetros Fisicoquímicos			
		E	S		pH	Temperatura (°C)	Conductividad (µS)	TDS (ppt)
1	Represa Yurumayo PTO. 1	377903.5540	8730845.62	4310	7.76	12.2	160	0.08
2	Represa Yurumayo PTO. 2	293532.3240	8726631.49	4318	7.95	15.0	180	0.09
3	Represa Yurumayo PTO. 3	289915.1370	8727464.87	4263	7.88	16.8	1170	0.01
4	Laguna Canchis	328566.1931	8745190.78	4425	5.51	11.6	290	0.15
5	Laguna Yananyacu	328185.972	8762746.56	4332	7.90	14.0	250	0.12
6	Laguna Lilicocha	326772.6875	8763159.33	4341	6.92	11.15	320	0.15
7	Laguna Huascarcocha	372314.8917	8765190.01	4367	7.62	9.10	350	0.18
8	Lago Junín	374092.9836	8832622.70	4092	7.29	8.00	200	0.08
9	Lago Junín	372833.6365	8833173.21	4096	7.14	11.9	500	0.15
10	Puente Junín-Upumayo	361586.7132	8792459.10	4094	7.24	11.0	160	0.34
11	Puente Junín-Upumayo	373337.8040	8833252.49	4095	7.33	14.0	400	0.18
12	Relave Huarón Pto 1	364839.0265	8740830.12	4400	7.48	11.0	900	0.52
13	Relave Huarón Pto 2	364853.3017	8742599.77	4395	7.92	11.0	600	0.52
14	Relave Huarón Pto 3	362863.7986	8771988.44	4564	5.69	13.7	880	0.47
15	Laguna Huaroncocha	362405.1060	8756602.23	4555	7.11	19.0	130	0.06
16	Laguna Huaroncocha	360981.4120	8757104.84	4564	8.11	17.2	110	0.05
17	Laguna Huaroncocha	359533.0770	8759985.20	4558	7.47	17.0	120	0.06
18	Relavera Yanamate	374258.2510	8846693.59	4347	2.40	10.6	5200	2.65
19	Relavera Milpo Pto. 1	373736.1960	8848765.23	3903	6.82	11.4	420	0.70
20	Relavera Milpo	376318.9050	8853027.74	3900	7.14	14.0	1600	0.80
21	Cerro Pasco	370780.7300	8851300.13	4395	7.49	11.0	170	0.10
22	Laguna Alcacocho	370327.9991	8851301.76	4310	7.96	12.0	70	0.03
23	Laguna Quiulacocho	371988.6060	8847669.52	4273	2.49	13.0	3860	2.60
24	Laguna Huascacocho	372980.3400	8847696.39	4337	7.14	13.4	1150	0.56
25	Laguna Huascacocho	319373.2960	8744742.73	4346	7.59	13.6	1210	0.60
26	Laguna Huacracocho	290397.4610	8743546.86	4557	5.18	12.5	630	0.31
27	Laguna Santa Catalina	379457.3860	8743577.71	4777	4.60	8.40	90	0.04
28	Laguna Ticticocha	378447.1010	8743514.13	4640	6.62	9.90	340	0.17
29	Laguna Ticticocha	300301.1210	8743209.15	4644	7.27	13.6	360	0.18

Tabla 4. Caracterización fisicoquímica de relaveras altoandinas de la Región Junín, Pasco y cabecera de la cuenca del río Rímac impactadas con relaves mineros (georeferenciados en junio, 2015)

N°	Zonas de muestreo	Coordenadas UTM		Parametros Fisicoquimicos			
		GWS 84		pH	Temperatura (°C)	Conductividad (µS)	TDS (ppt)
		E	S				
01	Relavera Yanamate - Relave - Pto 1	363540	8814894	2.58	10.7	4040	2.12
02	Relavera Yanamate - Relave - Pto 2	363824	8815541	2.18	13.6	12320	6.27
03	Relavera Yanamate - Relave - Pto 3	363864	8815626	3.32	12.5	2770	1.40
04	Relavera Quiulacocha	359466	8816540	2.58	6.9	9200	4.57
05	Quebrada-Minera Carhuacayan – Relave- Pto 2	356414	8762663	3.27	13.2	1320	0.66

Tabla 5. Condiciones fisicoquímicas del lago Junín y lagunas impactadas de la Región Junín, Pasco y cabecera de cuenca del río Rímac (georreferenciadas en octubre, 2015)

PUNTO	Zonas de muestreo	Coordenadas UTM		Parámetros Fisicoquímicos			
		GWS 84		pH	Temperatura (°C)	Conductividad (µS)	TDS (ppt)
		E	S				
01	Laguna Canchis	353127	8720541	5.50	11.6	290	0.15
02	Lago Junín	372833	8833173	7.14	11.9	500	0.15
03	Relavera huarón pto. 1	364676	8779450	7.48	11.0	900	0.52
04	Relavera Huarón pto. 2	346913	8782988	7.92	11.0	600	0.52
05	Camino Junín-Cerro de Pasco.	362863	8771988	5.69	13.7	880	0.47
06	Relavera Yanamate	374258	8846693	2.40	10.6	5200	2.65
07	Relavera Milpo Pto. 1	366563	8826073	6.82	11.4	420	0.70
08	Relavera Quiulacocha	339358	8816496	2.49	13.0	3860	3.86
09	Laguna Huacracocho	290397	8743546	5.18	12.5	630	0.31
10	Laguna Santa Catalina	379457	8743577	4.60	8.40	90	0.04
11	Relavera Yanamate	363875.47	8815870.03	1.30	10.20	6360	5.28

5.2. Crecimiento de las muestras en caldo YPG a diferentes pH

Las muestras de suelos y aguas de la laguna Pacococha fueron cultivadas en caldo YPG con diferentes valores de pH, incubadas a 20 °C hasta por 3 semanas, la evaluación del crecimiento se realizó cada día. A pH 2.0 no crecieron, a pH 3.0 varias muestras sembradas presentaron colonias, y todas presentaron crecimiento a pH 4.0, 5.0 y 6.0. Los resultados se muestran en las tablas N° 6, 7, 8, 9 y 10.

Tabla N° 6. Resultados del cultivo de las muestras de la laguna Pacococha en caldo YPG a pH 2.

Muestra de agua	Crecimiento	Muestra de tierra	Crecimiento
AM P1	Negativo	TMP1	Negativo
AM P3	Negativo	TMP3	Negativo
AM P4	Negativo	TMP4	Negativo
AM P5	Negativo	TMP5	Negativo
AM P6	Negativo	TMP6	Negativo
AM P7	Negativo	TMP7	Negativo
AM P8	Negativo	TMP8	Negativo

Tabla N° 7 Resultados del cultivo de las muestras de la laguna Pacococha en caldo YPG a pH 3.

Muestra de agua	Crecimiento	Muestra de tierra	Crecimiento
AM P1	Negativo	TMP1	Negativo
AM P2	Negativo	TMP2	Negativo
AM P3	Positivo	TMP3	Positivo
AM P4	Positivo	TMP4	Positivo
AM P5	Positivo	TMP5	Positivo
AM P6	Positivo	TMP6	Positivo
AM P7	Positivo	TMP7	Positivo
AM P8	Positivo	TMP8	Positivo

Las 16 muestras de agua y suelo sembradas en caldo glucosado a pH 2.0 no crecieron levaduras en estas condiciones de pH (Tabla 6), 12 muestras de agua y suelo evaluados presentaron crecimiento en caldo YPG a pH 3.0 (Tabla N° 7).

Tabla N° 8. Resultados del cultivo de las muestras de la laguna Pacococha en caldo YPG a pH 4.0.

Muestra de agua	Crecimiento	Muestra de tierra	Crecimiento
AM P1	Negativo	TMP1	Negativo
AM P2	Negativo	TMP2	Negativo
AM P3	Positivo	TMP3	Positivo
AM P4	Positivo	TMP4	Positivo
AM P5	Positivo	TMP5	Positivo
AM P6	Positivo	TMP6	Positivo
AM P7	Positivo	TMP7	Positivo
AM P8	Positivo	TMP8	Positivo

Tabla N° 9. Resultados del cultivo de las muestras de la laguna Pacococha en caldo YPG a pH 5.0.

Muestra de agua	Crecimiento	Muestra de tierra	Crecimiento
AM P1	Negativo	TMP1	Negativo
AM P2	Negativo	TMP2	Negativo
AM P3	Positivo	TMP3	Positivo
AM P4	Positivo	TMP4	Positivo
AM P5	Positivo	TMP5	Positivo
AM P6	Positivo	TMP6	Positivo
AM P7	Positivo	TMP7	Positivo
AM P8	Positivo	TMP8	Positivo

Tabla N° 10 Resultados del cultivo de las muestras de la laguna Pacococha en caldo YPG a pH 6.0.

Muestra de agua	Crecimiento	Muestra de tierra	Crecimiento
AM P1	Negativo	TMP1	Negativo
AM P2	Negativo	TMP2	Negativo
AM P3	Positivo	TMP3	Positivo
AM P4	Positivo	TMP4	Positivo
AM P5	Positivo	TMP5	Positivo
AM P6	Positivo	TMP6	Positivo
AM P7	Positivo	TMP7	Positivo
AM P8	Positivo	TMP8	Positivo

De las muestras de agua (AMP1 y AMP2) y suelo (TMP1 y TMP2) no hubo crecimiento de levaduras ni mohos a pH 3.0 y pH 4.0. Las demás muestras de agua y suelo sembradas en caldo glucosado YPG, crecieron antes de la semana (Tabla N°8). Similares resultados se obtuvieron en el caso de la siembra de las muestras de agua y suelo en caldo glucosado YPG a pH 5 y pH 6 (Tablas N°9 y N°10), lo que indicó que en las muestras no hay presencia de levaduras ni mohos.

5.3. Aislamiento de levaduras extremófilas en agar YPG

5.3.1. Aislamiento de levaduras de la laguna Pacococha Castrovirreina, Huancavelica

Los cultivos positivos en medio líquido de YPG fueron sembrados por estría en medio sólido YPG a pH 3.5, temperatura 20 °C por un lapso de 2 semanas. Se evaluó el crecimiento cada 24 horas para determinar la presencia de colonias levaduriformes. En los medios sólidos se evidenciaron colonias de diferente aspecto, tamaño, densidad y color. Las muestras que presentaron crecimiento tanto de agua como de suelos fueron: AMP3, AMP4, TMP5, AMP6, TMP7 y TMP8. La mayoría de muestras cultivadas en medio sólido presentaron colonias mucoides características de levaduras. También crecieron mohos en la muestra AMP5 y TMP7 (Tabla N° 11). La morfología y aspecto de las colonias se muestran en las Figuras N° 13 a la N° 16.

Los cultivos de las muestras aisladas tuvieron aspectos similares, algunas colonias fueron ovaladas o redondas con bordes lisos y/o arrugadas, como las cepas AMP4, TMP5 y AMP6 (*Meyerozyma guilliermondii*), las cepas TMP7 y TMP8 (*Gonochaeta volutina*) fueron opacas y la cepa AMP3 (*Rhodospiridium torulooides*) colonias redondas, borde ovalado y mucoides. Las cepas seleccionadas fueron procesadas para extraer el ADN y realizar la PCR para el posterior secuenciamiento e identificación molecular. Las colonias de las cepas cultivadas de las muestras de la laguna Pacococha, se muestran en las figuras 13, 14 15 y 16.

Tabla N° 11. Desarrollo de levaduras de muestras de agua y suelo de Pacococha en agar YPG a pH 3.5

Muestra de agua	Crecimiento de levaduras	Muestra de tierra	Crecimiento de levaduras
AM P3	Crecieron levaduras	TMP3	Negativo
AM P4	Crecieron levaduras	TMP4	Negativo
AM P5	Crecieron mohos y levaduras	TMP5	positivo
AM P6	Crecieron levaduras	TMP6	Negativo
AM P7	Negativo	TMP7	positivo
AM P8	Negativo	TMP8	positivo



Figura N°13. Características macroscópicas de la Cepa AMP3 (*Rhodosporidium toruloides*), colonias mucoides ovaladas, convexas, superficie lisa, blanquecinas, borde entero, cultivo 72 h a 20 °C.



Figura N°14. Características macroscópicas de la cepa AMP4 (*Meyerozyma guilliermondii*) colonias opacas planas, redondas, butirosa, borde ondulado-lobulado, cultivo 72 h a 20 °C.



Fig. N° 15 Características macroscópicas de la cepa AMP6 (*Meyerozyma guilliermondii*) colonias esféricas, mucoides brillantes, convexas, cultivo 72 h a 20 °C.

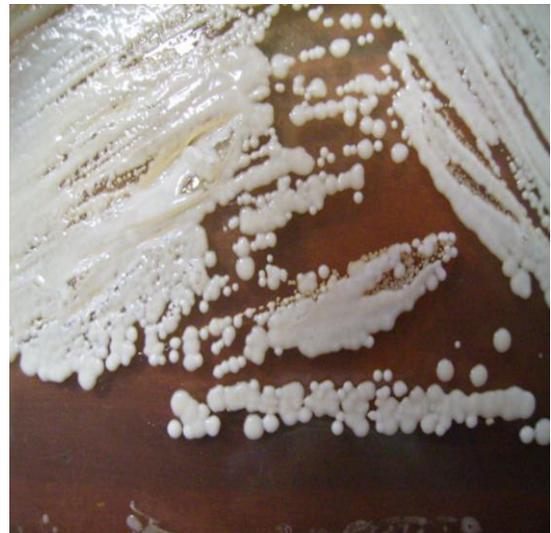


Figura N° 16. Características macroscópicas de la cepa AMP5 (*Meyerozyma guilliermondii*) colonias mucoides, aplanadas, borde entero lobulado, cultivo 72 h a 20 °C.

5.3.2. Coloración Gram de las colonias aisladas de la laguna Pacocochoa

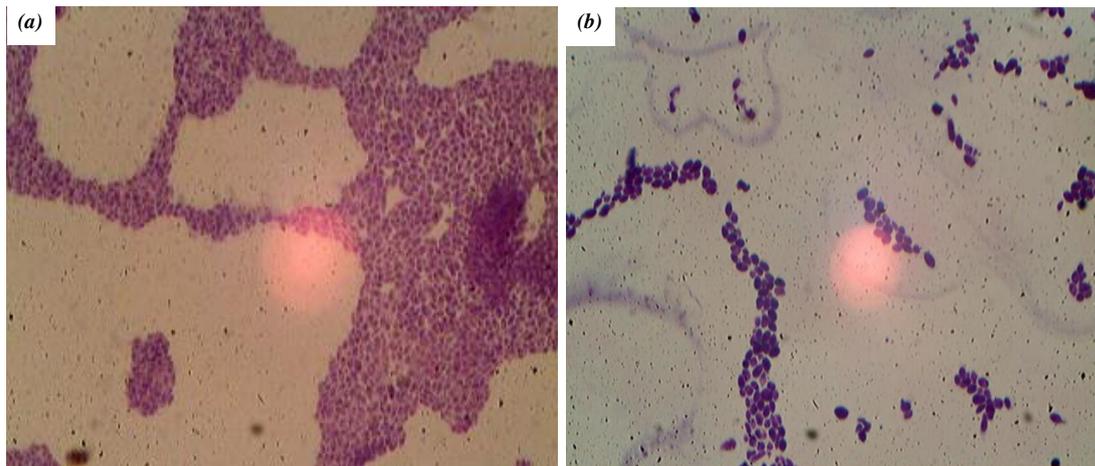


Figura N° 17: Coloración Gram de *Meyerozyma guilliermondii* cepas (a) AMP4 y (b) AMP6 tomada de un medio YPG sin metal, cultivo de 72 h (aumento 1000X).

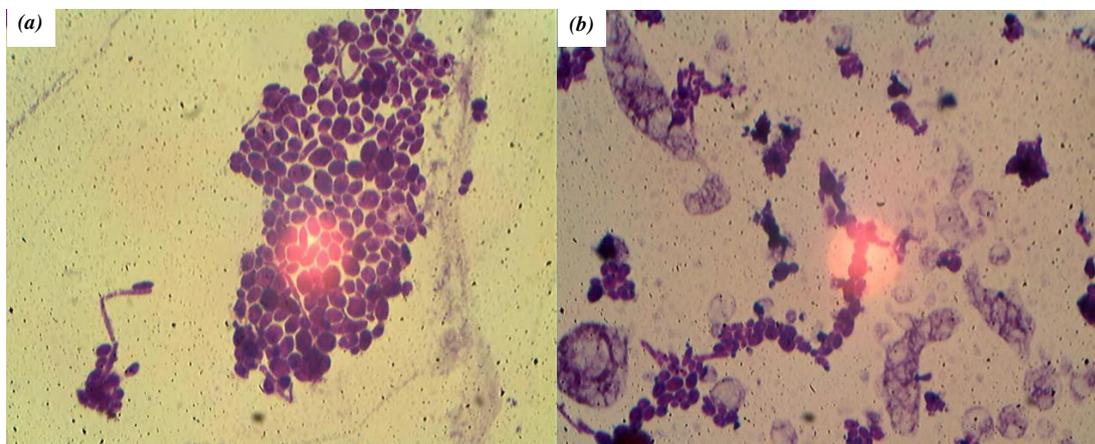


Figura N° 18: Coloración Gram de *Meyerozyma guilliermondii* cepa AMP5 tomada de un caldo YPG de 72 h (a) sin metal, (b) con 100 ppm de Zn^{+2} , cultivo de 72 h (1000X).

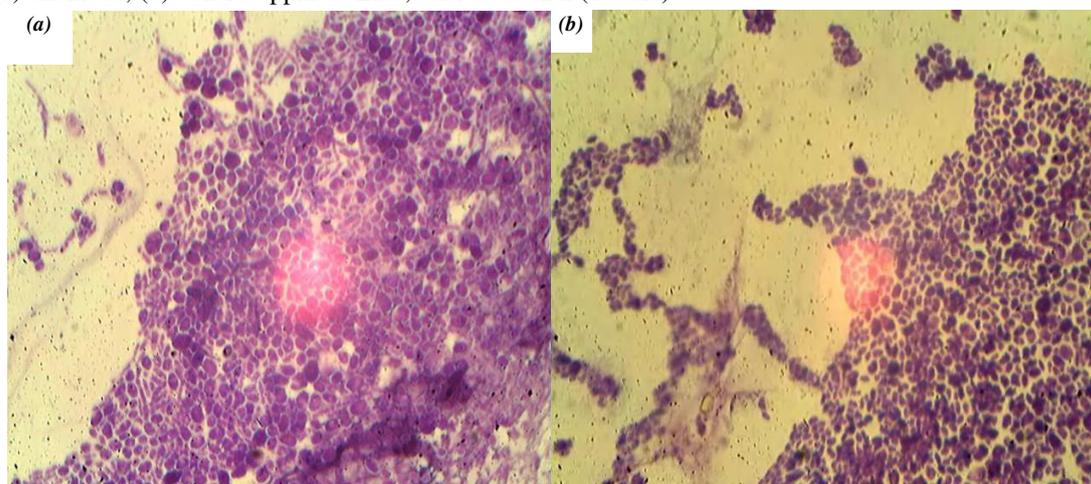


Figura N° 19: Coloración Gram de *Meyerozyma guilliermondii* cepa AMP6 tomada de dos medios YPG (a) cobalto 50 ppm y (b) cromo 100 ppm, cultivo de 72 h (1000X).

Los resultados de las coloraciones de *Meyerozyma guilliermondii* a partir del medio YPG con 100 ppm de ion Zn^{+2} , se evidencia células deformadas en la coloración Gram, por la exposición al metal a las 72 horas (Fig. 18), similar alteración se evidencia en la exposición a iones Co^{+2} y Cr^{+6} . También se puede evidenciar la deformación celular al término de la fase exponencial (Fig. 19).

Tabla N° 12. Microorganismos aislados de relaveras ubicadas en Cerro de Pasco (junio, 2015)

Análisis microbiológico exploratorio de las cepas aisladas					
ESTACIÓN	CEPAS	TINCIÓN GRAM	Medio de cultivo	pH	Reino
Relavera Yanamate Pto. 1	1LYCP1	Negativo	FeO (pH= 2.5)	2.5	Bacteria
	1LYCP2	Positivo	Agar Nutricio	4.5	Bacteria
	1LYCP3	Mohos	FeO (pH= 2.5)	2.5	Fungí
Relavera Yanamate Pto. 2	1LYCP4	Positivo	Agar nutricio	4.5	Bacteria
	1LYCP5	Levaduriforme	Agar nutricio	4.5	Fungí
	1LYCP6	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
Relavera Minera Carhuacayan	1RCCP1	Positivo	Agar nutricio	4.5	Bacteria
	1RCCP2	Positivo	Agar nutricio	4.5	Bacteria
	1RCCP3	Negativo	Agar nutricio	4.5	Bacteria
	1RCCP4	Negativo	Agar YPG	3.5	Bacteria
	1RCCP5	Negativo	Agar YPG	3.5	Bacteria
	1RCCP6	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	1RCCP7	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	1RCCP8	Mohos	Agar YPG	3.5	Fungí
	1RCCP9	Mohos	Agar YPG	3.5	Fungí
	1RCCP10	Negativo	Agar YPG	3.5	Bacteria
	1RCCP11	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	1RCCP12	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	1RCCP13	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	1RCCP14	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	1RCCP15	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	1RCCP16	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
Relavera Quiulacocha	1RQCP1	Negativo	FeO (pH= 2.5)	2.5	Bacteria

Tabla N° 13. Microorganismos aislados de lagunas altoandinas de cabecera de cuenca de Junin, Pasco y Lima (octubre, 2015)

Análisis microbiológico exploratorio de las cepas aisladas					
ESTACIÓN	cepas	Tinción Gram	Medio de cultivo	pH	Reino
Laguna Canchis	2LCL2	Levaduriforme	Agar Acinetobacter	4.5	Fungí
Lago Junín	2LJJ1	Levaduriforme	Agar Acinetobacter	4.5	Fungí
	2LJJ2	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	2LJJ3	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	2LJJ4	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
Relave Huarón Pto 1	2RHP1	Levaduriforme	Agar Acinetobacter	4.5	Fungí
Relave Huarón Pto 2	2RHP2	Levaduriforme	Agar Acinetobacter	4.5	Fungí
	2RHP3	Levaduriforme	Agar Acinetobacter	4.5	Fungí
Relavera Yanamate	2RYP1	Levaduriforme	Agar Acinetobacter	4.5	Fungí
	2RYP2	Levaduriforme	Agar Acinetobacter	4.5	Fungí
	2RYP3	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	2RMP2	Mohos	Agar YPG	3.5	Fungí
Laguna Huacracocha	2LHJ1	Levaduriforme	Agar Nutricio+ Ácido cítrico 1 (g/L)	4.5	Fungí
Laguna Santa Catalina	2LSCL1	Levaduriforme	Agar Acinetobacter	4.5	Fungí

En las Tablas 12, 13 y 14 se muestran los microorganismos aislados de cabecera de cuenca de la región central de Perú (Pasco, Junín y Lima), de acuerdo al medio empleado. En la Tabla 12 se muestran los microorganismos aislados de lagunas y relaves, en el mes de junio del 2015, en la Tabla 13 se muestran los microorganismos aislados en el mes de octubre del 2015. Incubados en caldo YPG a 20 °C, por 2 semanas. Estos cultivos son estudios microbiológicos exploratorios de las muestras seleccionadas con la finalidad de aislar microorganismos.

Tabla 14. Microorganismo aislados de relaveras y lago Junín en la segunda salida de campo octubre del 2016. Cultivados a 10 °C por 2 semanas

Análisis microbiológico exploratorio de las cepas aisladas					
Zonas de muestreo	CEPAS	Tinción Gram	Medio de cultivo	pH	Reino
Laguna Canchis	2LCL3	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	2LCL4	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	2LCL5	Levaduriforme	Agar nutricio + Ácido cítrico*	3.5	Fungí
	2LCL6	Levaduriforme	Agar nutricio + ácido Cítrico*	3.5	Fungí
Lago Junín	2LJJ5	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	2LJJ6	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
Relave Huarón Estación1	2RHCP4	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	2RHCP5	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	2RHCP6	Levaduriforme	Agar nutricio + Ácido cítrico*	3.5	Fungí
	2RHCP7	Levaduriforme	Agar nutricio + Ácido cítrico*	3.5	Fungí
Relavera Yanamate Estación1	2RYCP4	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	2RYCP5	Mohos	Agar YPG	3.5	Fungí
	2RYCP6	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	2RYCP7	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
Relavera Yanamate Estación2	2RYCP8	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	2RYCP9	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	2RYCP10	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	2RYCP11	Mohos	Agar nutricio + Ácido cítrico*	3.5	Fungí
Relavera Milpo Estación1	2RMCP3	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	2RMCP4	Mohos	Agar YPG	3.5	Fungí
Relavera Quiulacocha	2LQCP1	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	2LQCP2	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	2LQCP3	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	2LQCP4	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	2LQCP5	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
Laguna Huacracocha	2LHJ2	Levaduriforme	Agar YPG	3.5	Fungí
	2LHJ3	Mohos	Agar YPG	3.5	Fungí
Laguna Santa Catalina	2LSCL2	Mohos	Agar YPG	3.5	Fungí
	2LSCL3	Mohos	Agar YPG	3.5	Fungí

* Ácido cítrico 1g/L

5.3.3 Características macroscópicas y microscópicas de levaduras extremófilas de la región central del Perú

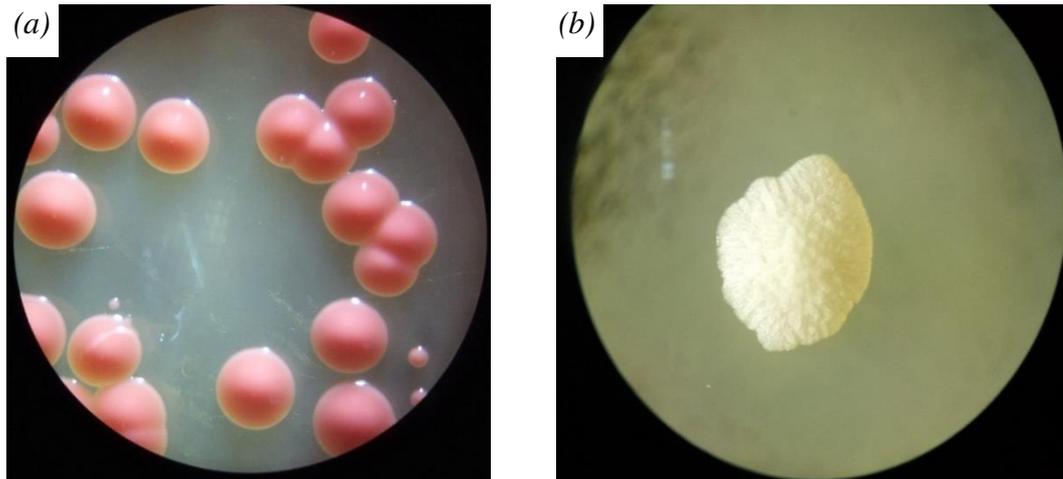


Fig. 20. Morfología macroscópica de levaduras aisladas de la laguna Canchis, Lima. Aumento 10X. (a) cepa 2LCL2 (*Rhodotorula mucilaginosa*): pequeñas, rosadas mucoides, cremosa, brillante, superficie lisa, convexa y borde entero. (b) cepa 2LCL1 (*Yarrowia lipolytica*): grande, color crema, superficie granular, elevada, borde ondulado-lobulado.

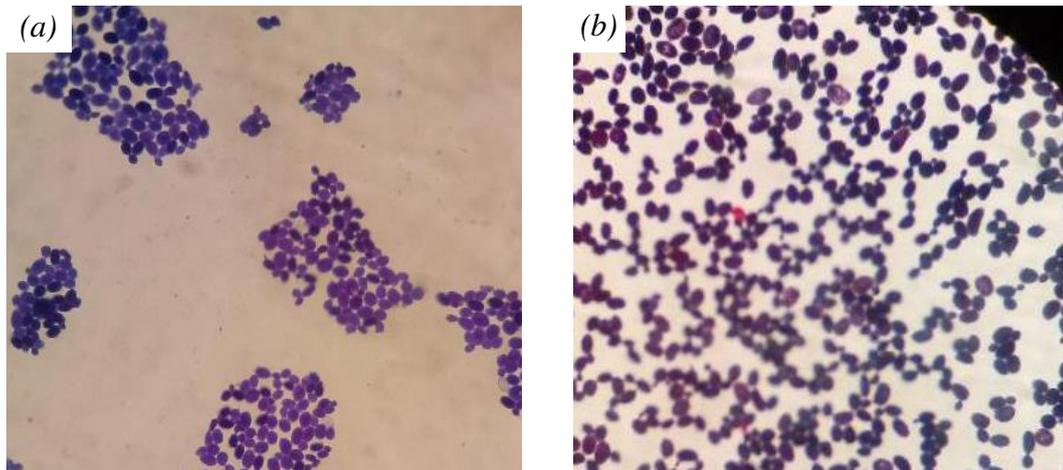


Fig. 21. Morfología microscópica 1000X-Tinción Gram: (a) cepa 2LCL2 (*Rhodotorula mucilaginosa*): células ovaladas, en gemación polar. (b) Cepa 2LCL1 (*Y. lipolytica*): células ovaladas y forma de raqueta, estado en gemación polar.

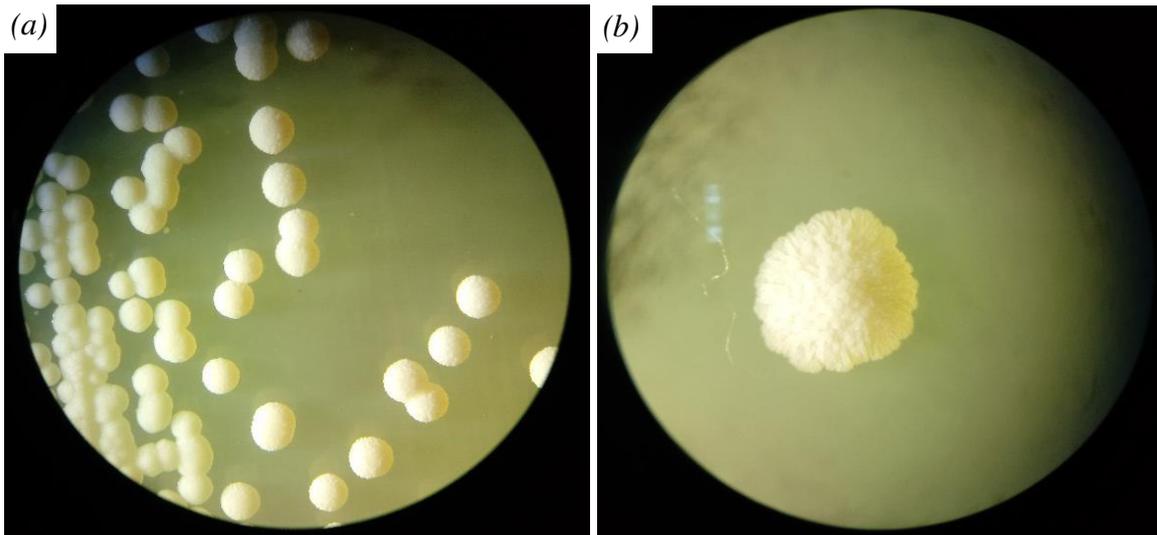


Fig. 22. Morfología macroscópica de levaduras aisladas del lago Junin. Aumento 10X. (a) cepa AMJ3 (*Yarrowia lipolytica*): pequeñas perladas, apariencia mucoide, color crema, elevada, superficie granular. (b) cepa AMJ4 (*Pichia fermentans*): colonias grandes, color crema, superficie granular, elevada, borde irregular.

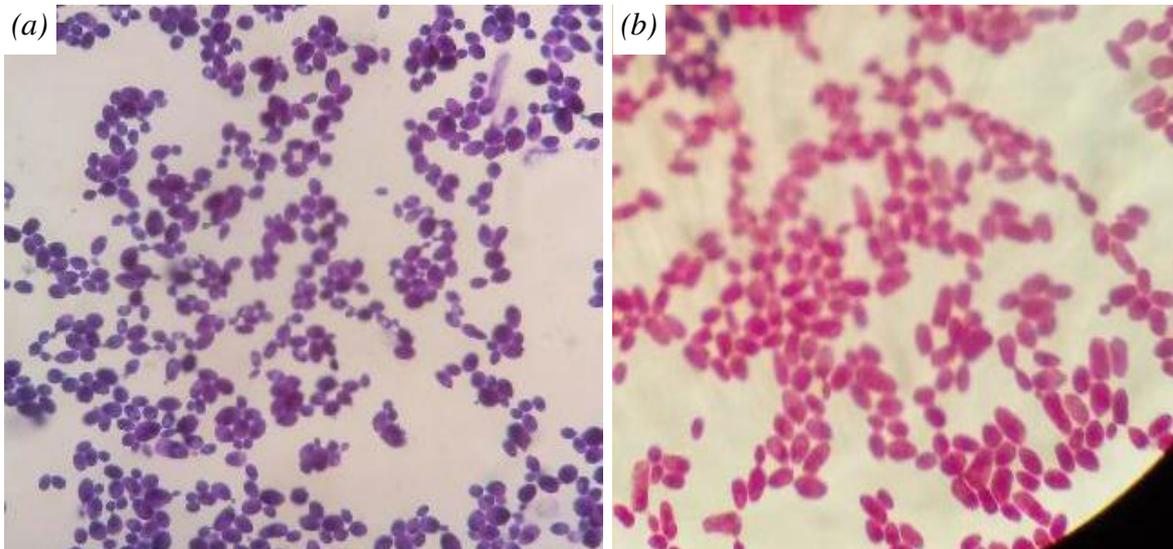


Fig. 23. Morfología microscópica 1000X-Tinción Gram: (a) cepa AMJ3 (*Y. lipolytica*): células ovaladas, gemación polar, formando pequeñas cadenas. (b) cepa AMJ4 (*P. fermentans*): células ovaladas, alargadas, estado de gemación polar.

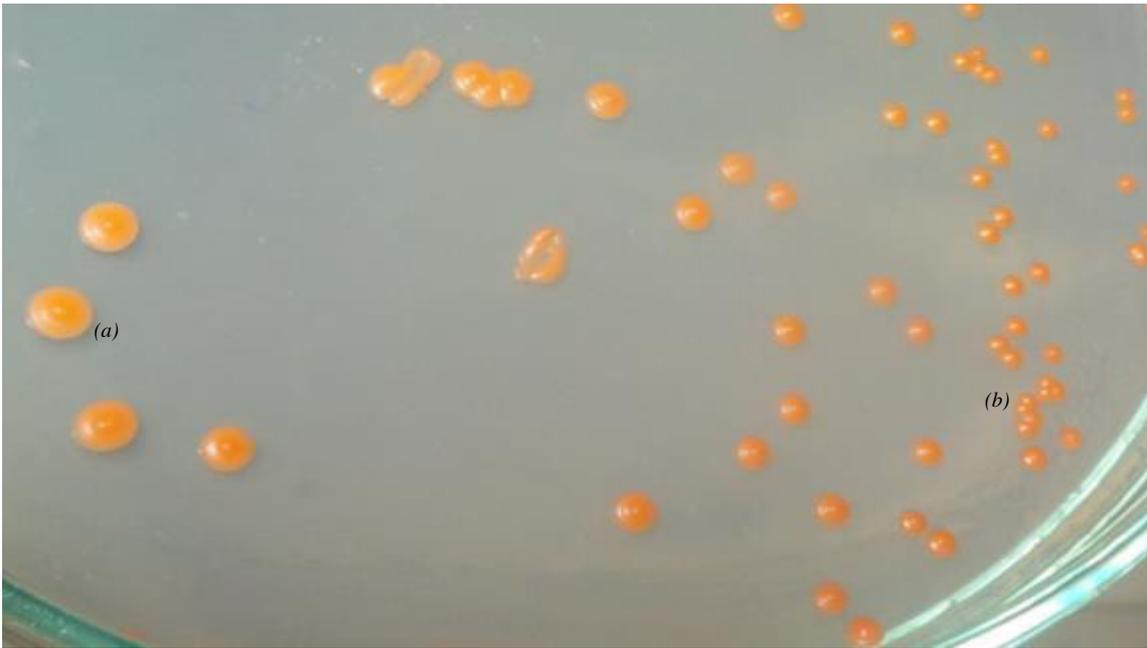


Fig. 24. Morfología macroscópica de las levaduras aisladas del lago Junín. (a) cepa 2LJJ5 (*Rhodotorula mucilaginosa*): grande, naranja, cremosa, lisa, semiconvexa y borde entero. (b) cepa 2LJJ1 (*R. mucilaginosa*) colonias más pequeñas, brillosas, borde entero.

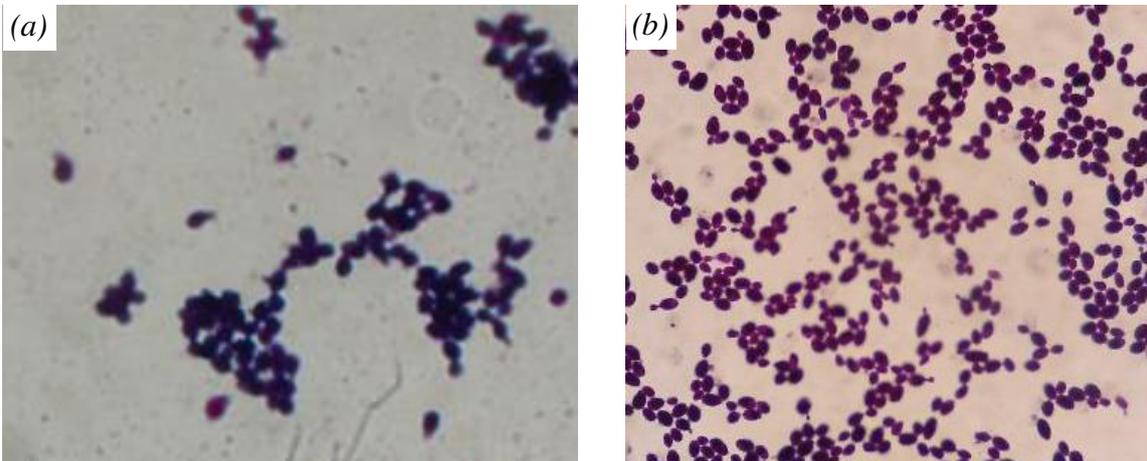


Fig. 25 Morfología microscópica 1000X-Tinción Gram: (a) cepa 2LJJ5 (*R. mucilaginosa*): célula ovalada, estado en gemación polar. (b) cepa 2LJJ1 (*R. mucilaginosa*): célula redondas, algunas en estado de gemación.

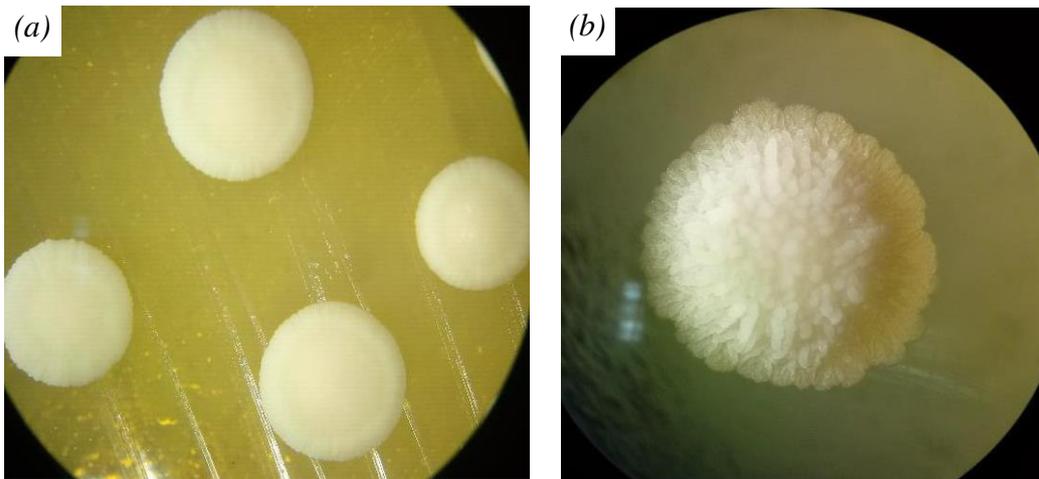


Fig. 26. Morfología macroscópica de las levaduras aisladas de la relavera Huaron-Pasco. Aumento 10X: (a) cepa 2RHP4 (*Y. lipolytica*), colonias grandes, color crema, superficie aterciopelada, apariencia esponjosa, aplanada-convexa, borde entero-ondulado. (b) cepa 3PUP2 (*Y. lipolytica*) aislada de puente Upumayo-Junin, colonia grande, elevada convexa, borde ondulado-lobulado, superficie granular-lanosa.

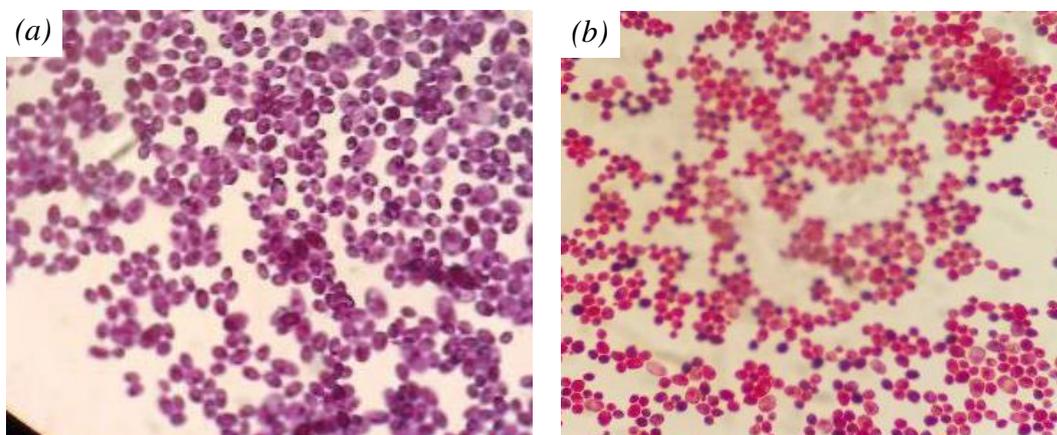


Fig. 27. Morfología microscópica 1000X-Tinción Gram: (a) cepa 2RHP4 (*Y. lipolytica*): célula ovalada, algunas en estado de gemación polar. (b) cepa 3PUP2 (*Y. lipolytica*): células redondas, algunas en estado de gemación polar.

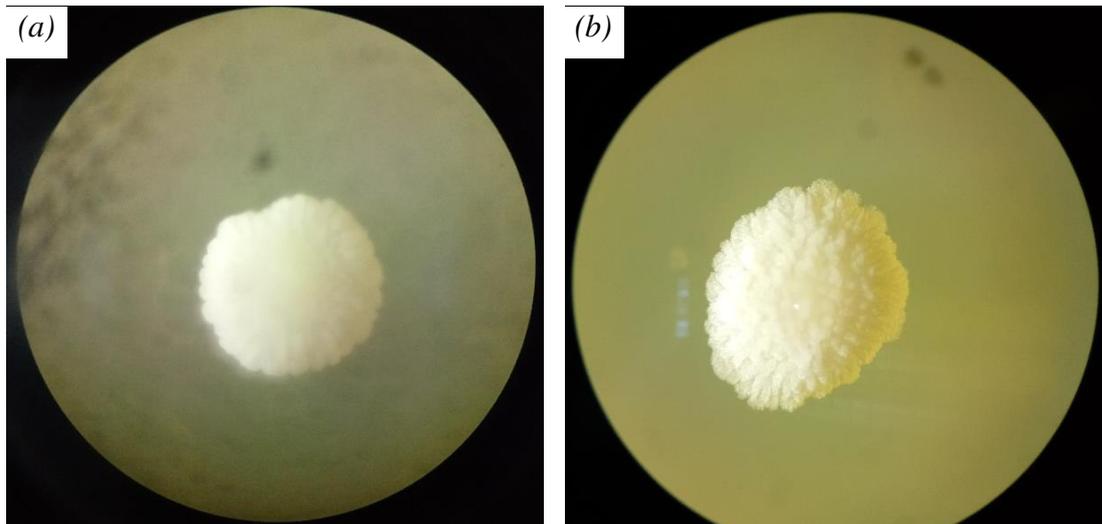


Fig. 28. Morfología macroscópica de las levaduras aisladas del lago Junín. Aumento 10X. (a) cepa AMJ5 (*Yarrowia lipolytica*) colonia lobulada, color crema, borde irregular lobulado, elevada convexa perlada. b) cepa AMJ6* (*Y. lipolytica*) colonia color crema intenso, elevada, borde ondulado-lobulado, superficie perlada.

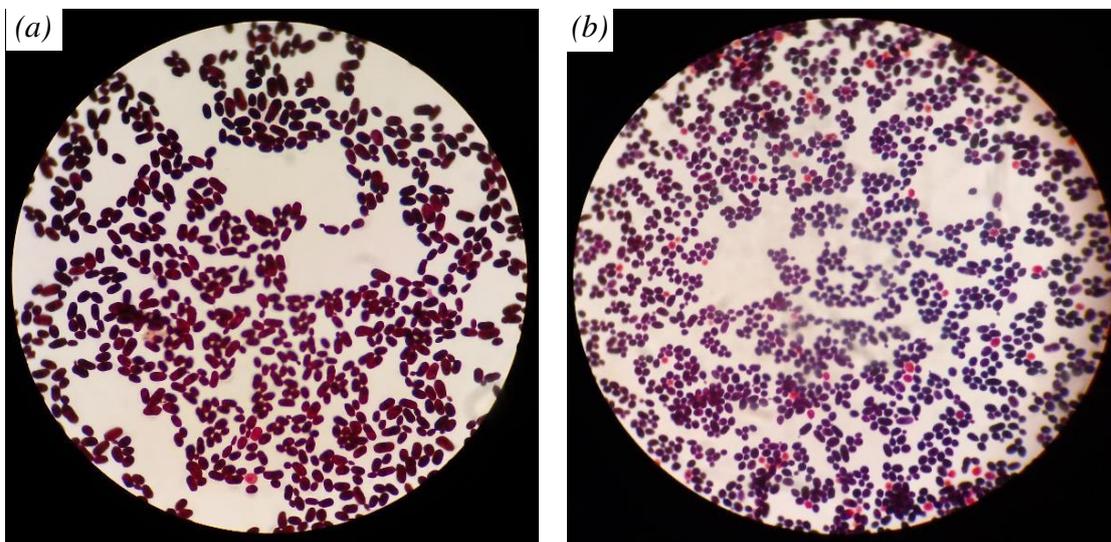


Fig. 29. Morfología microscópica 1000X-Tinción Gram: (a) cepa AMJ5 (*Yarrowia lipolytica*): células alargadas ovaladas, algunas en estado de gemación polar. (b) cepa AMJ6* (*Y. lipolytica*): células redondas ovaladas, con gemación polar.

*AMJ6(*Y. lipolytica*): cepa empleada para hacer estudios de expresión de proteínas (proteómica), cultivada en condiciones normales y en estrés con iones metálicos Cd^{+2} , Cr^{+6} , y Cu^{+2} .



Fig. 30. Morfología macroscópica de las levaduras aisladas de la relavera Yanamate-Pasco. Sembrada en placas con agar YPG, por 15 días, pH 3.5, a 10 °C. (a) cepa 2RYP4: grande, color crema, cremosa, brillante, aplanada, con elevación central (umbonada) y borde ondulado. (b) cepa 2RYP5: color blanca-crema, pequeña, mucoide, convexa, borde liso-entero. (c) cepa 2RYP6: colonia grande, color blanca-crema, aspecto cremosa, brillante, convexa, borde liso-entero.

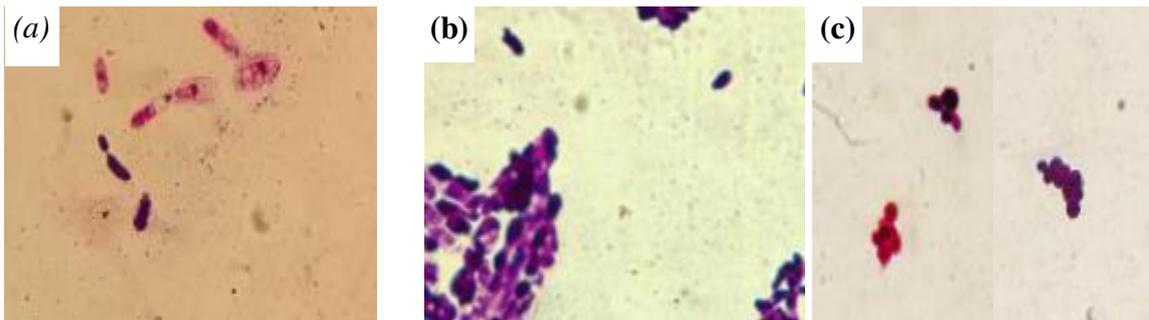


Fig. 31 Morfología microscópica 1000X-Tinción Gram: (a) cepa 2RYCP4: células alargadas, en estado de gemación polar. (b) cepa 2RYP5 células ovaladas. (c) cepa 2RYCP6: células redondas.

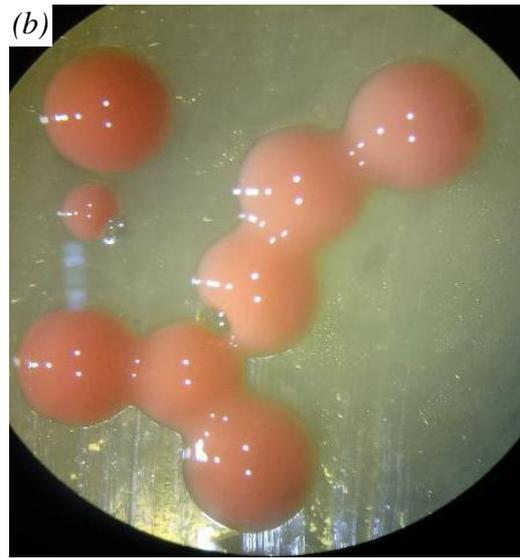
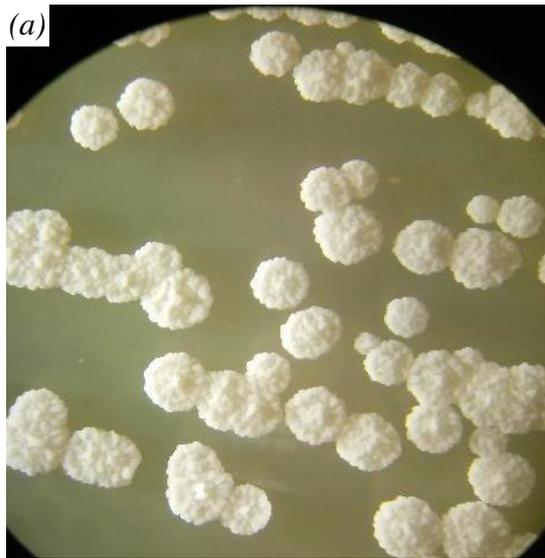


Fig. 32. Morfología macroscópica de las levaduras aisladas Aumento 10X. (a) cepa 8JSAL1 (*P. fermentans*) colonias circulares, bordes lobulados, elevación umbonada, aspecto seca, superficie granular, color crema. (b) cepa 2LJJ1 (*R. mucilaginosa*): Colonias mucoides cremosas brillante, elevada convexa, borde liso, color melon.

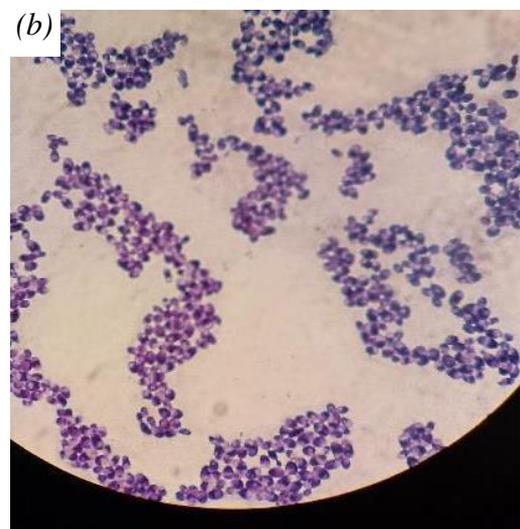
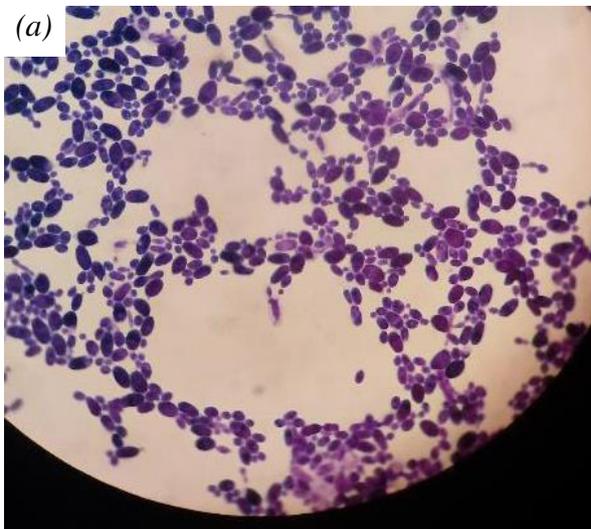


Fig. 33. Morfología microscópica 1000X-Tinción Gram: (a) cepa 8JSAL1 (*P. fermentans*): células ovaladas alargadas, en estado de gemación polar. (b) cepa 2LJJ1 (*R. mucilaginosa*): células ovaladas, algunas en estado de gemación.

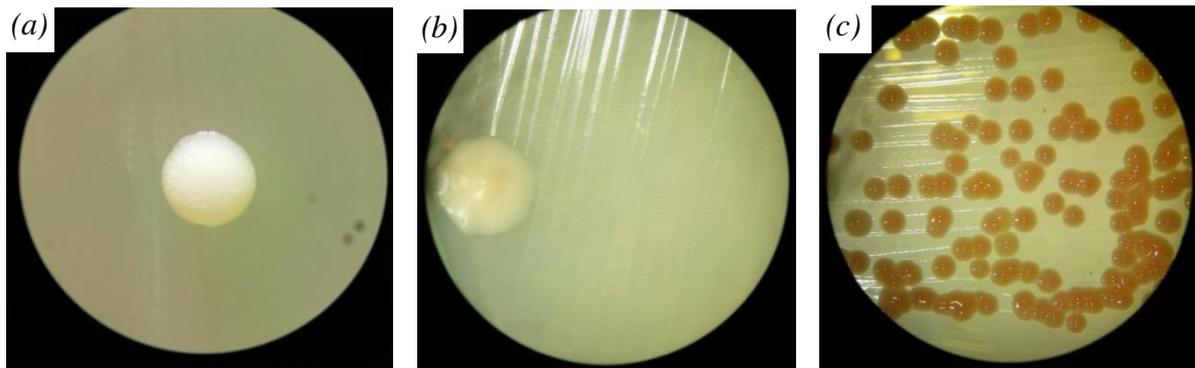


Fig. 34. Morfología macroscópica de las colonias de levaduras aisladas de la relavera Milpo-Pasco. Aumento 10X, se observan (a) cepa 2RMCP0 (*Pichia sp.*) colonia redonda, elevada, color crema, superficie ligeramente granular, convexa, (b) cepa 3RMP1 (*M. guilliermondii*) cremosa, color crema-canela clara, mucóide, (c) cepa 2RMP2 (*R. mucilaginosa*) colonias pequeñas, mucóide, color marrón claro, brillante, elevada ligeramente convexo y borde entero.

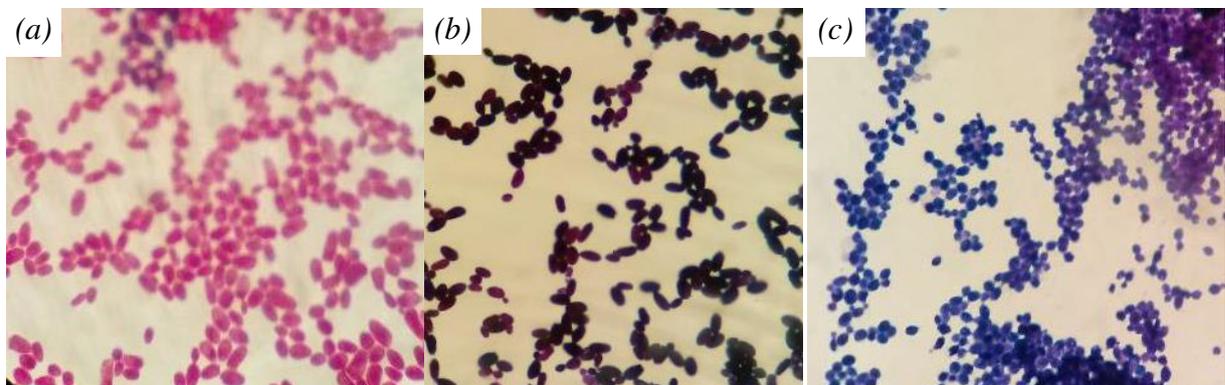


Fig. 35. Morfología microscópica 1000X-Tinción Gram: (a) cepa 2RMCP0 (*Pichia sp.*) Levaduras ovaladas, con gemación polar, (b) Cepa 3RMP1 (*M. guilliermondii*) células ovaladas en gemación, (c) cepa 2RMP2 (*R. mucilaginosa*): células redondas y ovalada, algunas en estado de gemación.

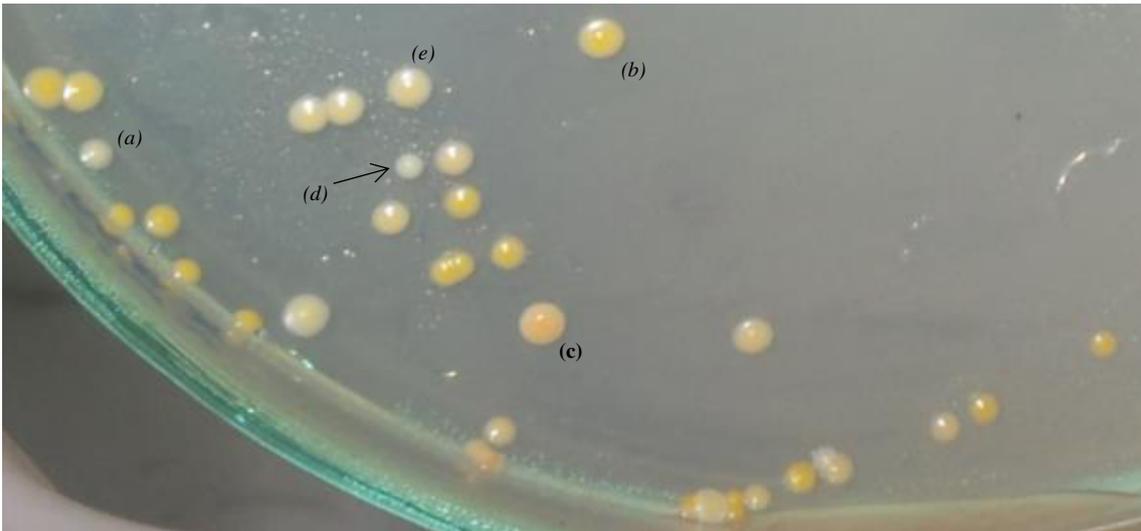


Fig. 36. Morfología macroscópica de las colonias de levaduras extremófilas aisladas de la relavera Quiulacocha, Pasco. (a) cepa 2RQP1: colonia mediana, color blanquecina-crema, cremosa, brillante, elevada y borde entero. (b) cepa 2RQP2: colonia grande, amarillenta-naranja, cremosa, brillante, elevada, borde entero (c) cepa 2RQP3: colonia grande, naranja, cremosa, brillante, elevada y borde entero. (d) cepa 2RQP4 (*R. mucilaginosa*): colonia pequeña, color crema palido, cremosa, convexa y borde entero. (e) La colonia 2RQP5: grande, amarillo-pálido, convexa y borde entero.

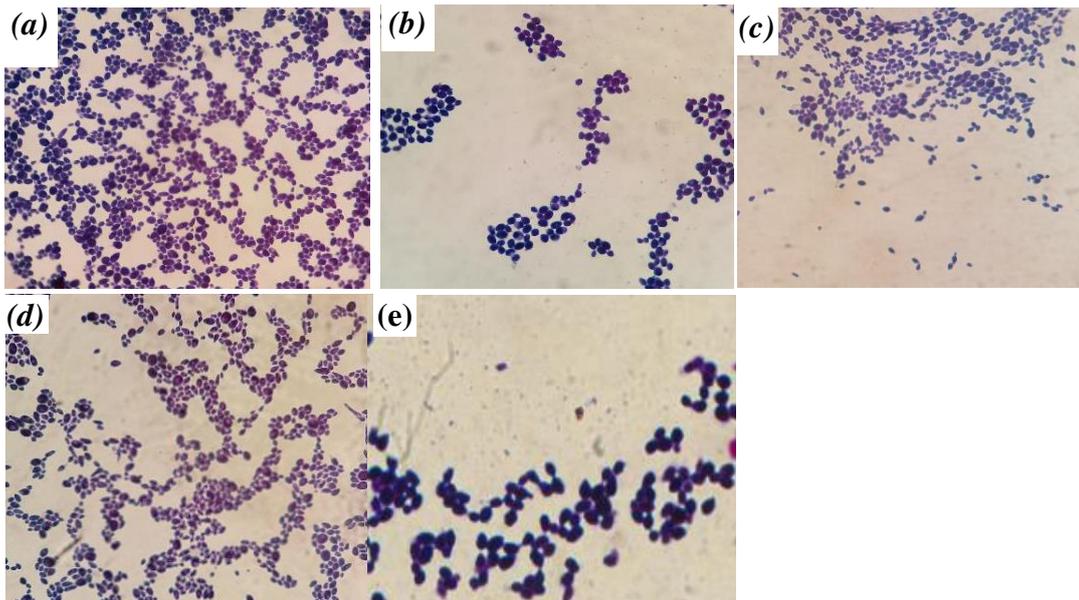


Fig. 37. Morfología microscópica 1000X-Tinción Gram: Levaduras: (a) cepa 2RQCP1: células ovaladas, en estado de gemación polar. (b) cepa 2RQCP2: células ovaladas, en estado de gemación. (c) cepa 2RQCP3: células redondas y ovaladas, en estado de gemación. (d) cepa 2RQCP4: células alargadas, algunas en estado de gemación. (e) cepa 2RQCP5: células ovaladas, en estado de gemación.

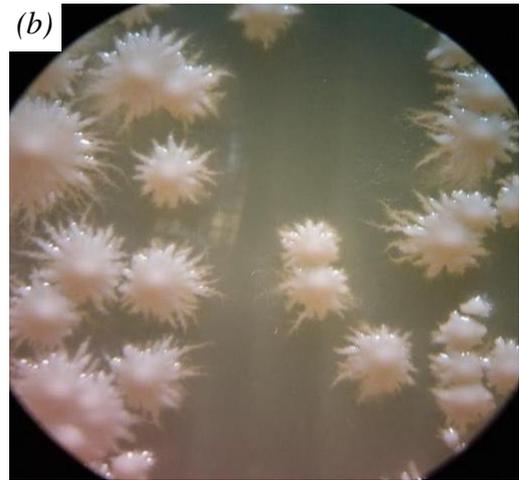
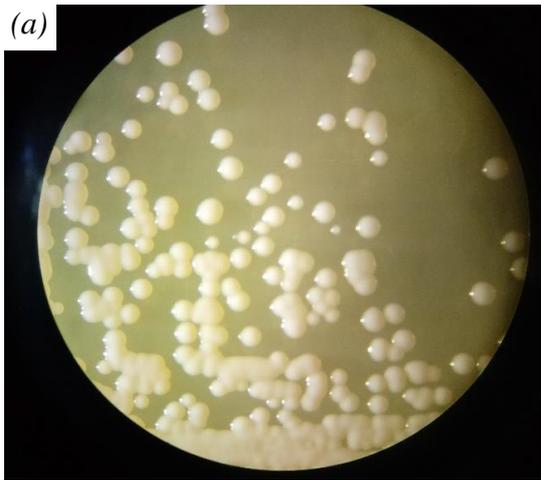


Fig. 38. Morfología macroscópica de las colonias de levaduras aisladas. Aumento 10X. (a) cepa 2LHJ2 (*M. guilliermondii*): Colonias medianas, color crema, superficie lisa, mucóide cremosa, perlada, convexa y borde entero. (b) cepa 4LYP4 (*Coniochaeta fodinicola*): Colonias grandes cremosas-mucoides, color crema-rosadas, bordes filiformes, formas irregulares a estrelladas.

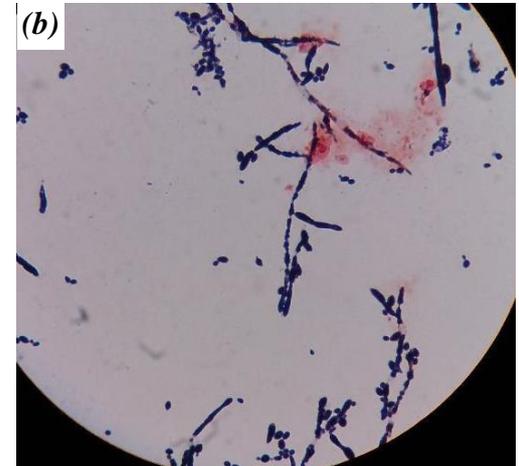
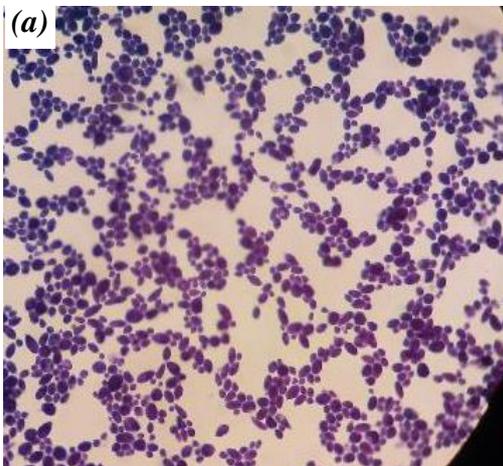


Fig.39. Morfología microscópica 1000X-Tinción Gram: Levaduras: (a) cepa 2LHJ2 (*M. guilliermondii*): células ovaladas, algunas en estado de gemación polar. (b) cepa 4LYP4 (*C. fodinicola*): células ovaladas y formando seudomicelios, propio de levaduras dismórficas.

5.4. Crecimiento de levaduras en agar YPG con diferentes concentraciones de metales

Los resultados del crecimiento para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias CMI en los iones metálicos de las levaduras procedentes de la laguna Pacococha, sembradas en medio sólido YPG a 20 °C, con las diversas sales metálicas ($K_2Cr_2O_7$, $CoCl_2$, $HgCl_2$, $ZnCl_2$, $BaCl_2$, $VaSO_4$ y $(CH_3-COO)_2 Pb$), están reportados como iones metálicos. Los valores de CMI en medio YPG con estos iones metálicos se muestran en las Tablas (N° 15 al N° 22).

Crecimiento de las cepas en agar YPG con iones Cr^{+6}

El crecimiento en el agar YPG con iones Cr^{+6} , la mayoría de las cepas de levaduras crecieron entre las 48 y 96 h, antes de los 7 días en 25, 50 y 100 ppm con ión Cr^{+6} , excepto la TMP5 que creció después de los 7 días. Todas crecieron a 150 ppm después de la primera semana, excepto la TMP5 que creció después de 14 días, 5 cepas crecieron hasta 300 ppm después de 14 días, la cepa TMP5 no creció a esta concentración (Tabla N° 15). Estas concentraciones permitieron determinar la CMI, a los diversos iones metálicos.

Tabla N° 15. Evaluación del crecimiento de levaduras en agar YPG con Cr^{+6}

Cepas	AMP3	AMP4	AMP5	AMP6	TMP7	TMP8
Cr^{+6} pmm	<i>Rhodotorula toruloides</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Coniochaeta velutina</i>	<i>Coniochaeta velutina</i>
25	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
50	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
100	Positivo	Positivo	Positivo*	Positivo	Positivo	Positivo
150	Positivo*	Positivo*	Positivo**	Positivo	Positivo*	Positivo*
200	Positivo*	Positivo*	Positivo**	Positivo*	Positivo*	Positivo*
300	Positivo**	Positivo**	Negativo	Positivo**	Positivo**	Positivo**

*Crecimiento después de los 7 días. ** Crecimiento después de los 14 días

Tabla N° 16. Evaluación del crecimiento de levaduras en agar YPG con iones Zn^{+2}

Cepas	AMP3	AMP4	AMP5	AMP6	TMP7	TMP8
Zn^{+2} ppm	<i>Rhodotorula toruloides</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Coniochaeta velutina</i>	<i>Coniochaeta velutina</i>
25	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
50	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
100	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
150	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
200	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
300	Positivo*	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo**	Positivo*
400	Positivo**	Positivo*	Positivo*	Positivo*	Negativo**	Positivo**

* Crecimiento después de los 7 días. ** Crecimiento después de los 14 días

Crecimiento de las cepas en Agar YPG con iones Zn^{+2}

Todas las cepas tuvieron buen crecimiento con 200 ppm de iones Zn^{+2} entre las 48 y 96 horas, 2 cepas crecieron a 300 ppm después de la primera semana y la cepa TMP7 después de la segunda semana, la mayoría creció a 400 ppm después de los 7 y 14 días, excepto la TMP7.

Tabla N° 17. Evaluación del crecimiento de levaduras en agar YPG con iones Hg^{+2}

Cepas	AMP3	AMP4	AMP5	AMP6	TMP7	TMP8
Hg^{+2} ppm	<i>Rhodotorula toruloides</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Coniochaeta velutina</i>	<i>Coniochaeta velutina</i>
20	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
40	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
80	Positivo*	Positivo	Positivo*	Positivo*	Positivo*	Positivo*
100	Negativo	Positivo**	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
200	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

* Crecimiento después de los 7 días. ** Crecimiento después de los 14 días

Crecimiento de las cepas en Agar YPG con iones Hg⁺²

El ion Hg⁺² resultó ser mucho más tóxico que todos los metales, las cepas son inhibidas a menores concentraciones, el mercurio es un elemento muy tóxico en general para todos los organismos. En la Tabla N° 17 se evidencia que ninguna cepa creció a 200 ppm con iones Hg⁺², sola la cepa AMP4 creció a 100 ppm, después de dos semanas, 5 cepas crecieron hasta 80 ppm después de los 7 días, excepto la cepa AMP4 que creció a 80 ppm antes del término de la primera semana. Todos crecieron a 40 ppm antes de los 7 días. Lo cual refleja una marcada sensibilidad por las cepas al mercurio.

Tabla N° 18. Evaluación del crecimiento de levaduras en agar YPG con iones Co⁺²

Cepas	AMP3	AMP4	AMP5	AMP6	TMP7	TMP8
Co ⁺² ppm	<i>Rhodotorula toruloides</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Coniochaeta velutina</i>	<i>Coniochaeta velutina</i>
25	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
50	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo*	Positivo
80	positivo*	Positivo*	Positivo*	Positivo	Positivo*	Positivo*
120	Positivo**	Positivo**	Positivo**	Positivo	Positivo**	Positivo*
200	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo*	Negativo	Positivo**
300.	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo*	Negativo	Positivo**
350	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo**	Negativo	Negativo

* Crecimiento después de los 7 días. ** Crecimiento después de los 14 días

Crecimiento de las cepas a en agar YPG con iones Co⁺²

En el crecimiento con iones Co⁺² se determinó que solo la cepa AMP6 creció a 350 ppm después de los 14 días, la cepa AMP6 también creció a 300 ppm después de la primera semana, y la cepa TMP8 después de la segunda semana, ambas cepas (AMP6 y TMP8) crecieron a 200 ppm al término de la primera y segunda semana respectivamente, y todas las cepas crecieron a 120 ppm después de la primera y segunda semana. La sensibilidad a este metal también fue notoria, la CMI para algunas cepas fue menor a 200 ppm.

Tabla N° 19. Evaluación del crecimiento de levaduras en agar YPG con iones Ba⁺²

Cepas	AMP3	AMP4	AMP5	AMP6	TMP7	TMP8
Ba ⁺² ppm	<i>Rhodotorula toruloides</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Coniochaeta velutina</i>	<i>Coniochaeta velutina</i>
25	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
50	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
100	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
150	Positivo	Positivo	Positivo*	Positivo	Positivo	Positivo
200	Positivo*	Positivo*	Positivo**	Positivo*	Positivo*	Positivo*
300	Positivo*	Positivo*	Negativo	Positivo**	Negativo	Positivo**
400	Positivo**	Positivo**	Negativo	Positivo**	Negativo	Negativo

* Crecimiento, después de los 7 días. ** Crecimiento, después de los 14 días

Crecimiento de las cepas a en agar YPG con iones Ba⁺²

El ion Ba⁺² no es considerado tóxico ni es un elemento esencial para los organismos, la mayoría creció a 150 ppm antes de la primera semana, todas las cepas hasta 200 ppm, la mayoría después de los 7 días, 4 cepas crecieron a 300 ppm antes y después de los 14 días, las demás cepas no crecieron a esta concentración, solamente 3 cepas (AMP3, AMP4 Y AMP6) crecieron a 400 ppm después de los 14 días.

Tabla N° 20. Evaluación del crecimiento de levaduras en agar YPG con iones Va⁺²

Cepas	AMP3	AMP4	AMP5	AMP6	TMP7	TMP8
Va ⁺² ppm	<i>Rhodotorula toruloides</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Coniochaeta velutina</i>	<i>Coniochaeta velutina</i>
25	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
50	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
80	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
120	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
200	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
250	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
300	Positivo**	Positivo*	Negativo	Negativo	Positivo**	Positivo**

* Crecimiento después de los 7 días. ** Crecimiento después de los 14 días

Crecimiento de las cepas a en agar YPG con iones Va^{+2}

Todas las cepas tuvieron buen crecimiento con el ion Va^{+2} a 250 ppm de antes de los 7 días y 4 cepas crecieron hasta 300 ppm después de la primera y segunda semana. Las cepas AMP5 y AMP6 no crecieron a esta concentración., en concentraciones mayores a 300 ppm, inhiben el crecimiento de las levaduras.

Tabla N° 21. Evaluación del crecimiento de levaduras en agar YPG con iones Pb^{+2}

Cepas	AMP3	AMP4	AMP5	AMP6	TMP7	TMP8
Pb^{+2} ppm	<i>Rhodotorula toruloides</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Coniochaeta velutina</i>	<i>Coniochaeta velutina</i>
25	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
100	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
200	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
300	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
400	Positivo	Positivo*	Positivo*	Positivo	Positivo	Positivo

* Crecimiento después de los 7 días. ** Crecimiento después de los 14 días

Crecimiento de las cepas a en agar YPG con iones Pb^{+2}

El plomo es un metal tóxico para todos los organismos. Sin embargo, el crecimiento de las cepas en Agar YPG con Pb^{+2} se evidenció en menor tiempo y a mayor concentración. Las cepas APM3 y AMP6 crecieron a 400 ppm antes de la primera semana y, todas las demás cepas crecieron después de la primera semana a esta misma concentración. El crecimiento de las levaduras con el ion plomo presento mayor resistencia, a pesar de ser un metal toxico.

Tabla N° 22. Crecimiento de levaduras en caldo YPG a diferentes concentraciones de iones metálicos, sembradas a 20 °C, 150 rpm, pH 4 por 2 semanas*

Cepas	Iones metálicos	Concentraciones de iones metálicos en ppm o mg/L							
		50	100	150	200	250	300	350	400
AMP3 <i>Rhodotorula toruloides</i>	Cd ⁺²	+	+	-	-	-	-	-	-
	Cu ⁺²	++++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
	Cr ⁺⁶	+	-	-	-	-	-	-	-
	Hg ⁺²	-	-	-	-	-	-	-	-
AMP4 <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Cd ⁺²	+	-	-	-	-	-	-	-
	Cu ⁺²	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
	Cr ⁺⁶	+	-	-	-	-	-	-	-
	Hg ⁺²	-	-	-	-	-	-	-	-
AMP5 <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Cd ⁺²	+++	+++	++	-	-	-	-	-
	Cu ⁺²	+++	-	-	-	-	-	-	-
	Cr ⁺⁶	+	-	-	-	-	-	-	-
	Hg ⁺²	-	-	-	-	-	-	-	-
TMP7 <i>Coniochaeta velutina</i>	Cd ⁺²	+++	++	+	-	-	-	-	-
	Cu ⁺²	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-
	Cr ⁺⁶	+	-	-	-	-	-	-	-
	Hg ⁺²	-	-	-	-	-	-	-	-
AMP6 <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Cd ⁺²	+++	+++	+	-	-	-	-	-
	Cu ⁺²	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
	Cr ⁺⁶	+	+	-	-	-	-	-	-
TMP8 <i>Coniochaeta velutina</i>	Cd ⁺²	+++	-	-	-	-	-	-	-
	Cu ⁺²	+++	+++	-	-	-	-	-	-
	Cr ⁺⁶	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Coniochaeta velutina</i>	Cd ⁺²	+++	-	-	-	-	-	-	-
	Cu ⁺²	+++	+++	-	-	-	-	-	-
	Cr ⁺⁶	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Coniochaeta velutina</i>	Cd ⁺²	+++	-	-	-	-	-	-	-
	Cu ⁺²	+++	+++	-	-	-	-	-	-
	Cr ⁺⁶	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Coniochaeta velutina</i>	Cd ⁺²	+++	-	-	-	-	-	-	-
	Cu ⁺²	+++	+++	-	-	-	-	-	-
	Cr ⁺⁶	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Presencia de turbidez. ++: Buena turbidez. +++: Excelente turbidez.

*Las lecturas se realizaron a partir del 2do día, hasta 2 semanas.

5.5. Crecimiento de muestras de agua y tierra en medio YPG del lago Junín (Región Junín) y mina San Cristóbal (Región Ancash).

Tabla N° 23. Crecimiento en caldo YPG de muestras de suelos y agua del lago Junín y mina San Cristóbal, sembradas a 20 °C, 150 rpm, pH 4 por 2 semanas*

Muestras de suelos	Crecimiento	Turbidez	Muestras de aguas	Crecimiento	Turbidez
Lago Junín y afluentes					
1JS	+	Moderada	AMJ1	+	Baja
2JS	-	-	AMJ2	++	Buena
3JS	++	Buena	AMJ3	+	Regular
4JS	++	Buena	AMJ4	++	Buena
6JS	++	Buena	AMJ5	++	Buena
7JS	++	Buena	AMJ6	++	Buena
7JS	++	Buena	AMJ7	+	leve
8JS	+	Moderado	AMJ8	-	-
9JS	++	Buena	AMJ9	+/-	Leve
10JS	+	Moderado	AMJ10	-	-
12JS	-	-	Minera San Cristóbal-Ancash		
13JS	++	abundante	1SCL	++	buena
14JS	++	Buena	2SCL	+++	excelente
15JS	+	Moderado	3SCL	+++	excelente
16S	+	Moderado	4SCL	++	buena

*Las lecturas se realizaron a partir del 2do día, hasta 2 semanas.

Crecimiento: +/- Leve; + moderado; ++bueno; +++ excelente. JS: Junín, SC: San Cristóbal

La mayoría de cepas de las muestras crecieron en caldo YPG a pH 4, en los primeros días con buen y excelente crecimiento por la turbidez presentada, otras muestras tuvieron crecimiento lento, esta característica se evidencio una turbidez de leve a moderado. Lo que nos demostró, la presencia de hongos en las muestras de aguas y suelos sembradas.

Tabla N° 24. Características culturales de las colonias de levaduras aisladas de las muestras de suelos del lago Junín y afluentes sembradas en agar YPG a pH 4 a 20 °C por 2 semanas*

Muestra de Suelos	Presencia colonias	Aspecto de las colonias
1JS	+	Pequeñas, mucoides, blanquecinas
2JS	+	Colonias grandes y pequeñas mucoides
3JS	+	Escaso, agrupadas blanquecinas
4JS	+++	Colonias abundantes, mucoides cremosas
5JS	-	No crecieron
6JS	++	colonias regulares, mucoides
7JS	++	Buen crecimiento, aspecto mucoide
8JS	++	Colonias Grandes mucoides
9JS	++	Presencia de levaduras y mohos
10JS	++	Colonias grandes y pequeñas
11JS	++	Colonias abundantes, mucoides
12JS	++	Colonias claras y cremosas oscuras
13JS	++	Colonias abundantes, olor a frutas
14JS	++	Colonias grandes escasas
15JS	++	Colonias mucoides abundantes
16S	+	Colonias escasas mucoides

*Las lecturas se realizaron a partir del 2do día de sembrado, hasta las 2 semanas.

Tabla N° 25. Características culturales de las colonias de levaduras aisladas de las muestras de aguas del lago Junín y afluentes sembradas en caldo YPG a pH 4 a 20 °C por 2 semanas*

Muestra	Presencia colonias	Aspecto de las colonias
Aguas		
AMJ1	++	Buen crecimiento, colonias mucoides
AMJ2	++	colonias regulares, mucoides
AMJ3	++	Colonias grandes opacas
AMJ4	++	Buen crecimiento, colonias mucoides
AMJ5	++	Buen crecimiento, diferente aspecto
AMJ6	++	Colonias grandes opacas
AMJ7	++	Colonias grandes escasas
AMJ8	++	Colonias regulares cremosas
AMJ9	+/-	Algunas colonias, color melón mucoide
AMJ10	-	negativo

*Las lecturas se realizaron a partir del segundo día de sembrado hasta las 2 semanas.

Tabla N° 26. Crecimiento de levaduras aisladas del lago Junín y afluentes, sembradas en agar YPG con diferentes metales a una concentración de 100 ppm, por 3 semanas

Cepas aisladas de muestras de suelos	Concentración de iones metálicos 100 ppm			
	Cr ⁺⁶	Cd ⁺²	Hg ⁺²	Cu ⁺²
4JSL1	++	++	+**	+++
4JSL2	+++	+++	+**	+++
6JSL1	NC	+	+**	+++
6JSL2	+++	+++	-	+++
7JSL1	NC	NC	+**	+++
8JSL1	+	+	+**	+++
9JSL1	++	++	+*	+++
10JSL1	NC	++	NC	+
10JSL2	NC	++	+*	+++
11JSL1	+++	+++	+*	+++
11JSL2	NC	+	+*	+++
13JSL1	++	+++	+*	++
14JSL1	+++	+++	+*	+++
15JSL1	NC	+++	NC	+
Cepas aisladas de aguas	Concentración de iones metálicos 100 ppm			
	Cr ⁺⁶	Cd ⁺²	Hg ⁺²	Cu ⁺²
AMJ1	++	+++	+*	+++
AMJ2	NC	+	+*	++
AMJ3	+	++	+*	+++
AMJ4	+++	+++	+*	+++
AMJ5	+	+	+*	+++
AMJ6	++	++	+*	+++

* Crecimiento después de la primera semana. Colonias de aspecto variable.

** Crecimiento después de la segunda semana. Colonias de aspecto variable.

+: Creció, ++: buen crecimiento, +++: excelente crecimiento, NC: no creció

Tabla N° 27. Crecimiento de levaduras aisladas del lago Junín y afluentes, sembradas en agar YPG con diferentes metales a una concentración de 200 ppm, por 3 semanas

Cepas aisladas de suelos	Concentración de iones metálicos 200 ppm			
	Cr ⁺⁶	Cd ⁺²	Hg ⁺²	Cu ⁺²
4JSL1	+	+	NC	++
4JSL2	++*	++	NC	++
6JSL1	NS	NC	NC	++
6JSL2	+	+	NC	++
7JSL1	NS	NS	NC	++
8JSL1	NC	NC	NC	++
9JSL1	++*	+	NC	++
10JSL1	NS	NC	NS	NC
10JSL2	NS	+	NC	++
11JSL1	NC	+	NC	++
11JSL2	NC	+*	NC	++
13JSL1	++	+*	NC	+
14JSL1	NC	+*	NC	++
15JSL1	NC	++	NS	NC
Cepas aisladas de aguas	Concentración de iones metálicos 200 ppm			
	Cr ⁺⁶	Cd ⁺²	Hg ⁺²	Cu ⁺²
AMJ1	NC	+*	NC	++
AMJ2	NS	NC	NC	NC
AMJ3	NC	+	NC	++
AMJ4	++*	+	NC	++
AMJ5	NC	+*	NC	++
AMJ6	+	+	NC	++

* Crecimiento después de la primera semana, colonias de aspecto variable.

** Crecimiento después de la segunda semana, colonias de aspecto variable.

NC: No crecieron. NS: No se sembró.

Los resultados que se reportan en las tablas referente a la CMI de las cepas levaduriformes, sometidos a tratamientos con metales, están reportados como iones metálicos (Cd⁺², Cu⁺², Cr⁺⁶ y Hg⁺²) y no como sales metálicas, las cepas fueron cultivadas en caldo YPG a pH 4 a 20 °C hasta por tres semanas. Las cepas aisladas tanto de agua como de suelo presentaron crecimiento variable, algunas tuvieron buen crecimiento en 100 ppm, Tabla 26, antes de la primera semana, otras cepas crecieron después de la primera semana; otro grupo de cepas

no crecieron (NC) en 200 ppm, ninguna de las cepas crecieron con iones Hg^{+2} a esta concentración, incluso al término de las 02 semanas. El crecimiento fue más lento en 200 ppm, algunas cepas como la cepa 4JSL y AMJ6 tuvieron el mejor crecimiento en las 3 sales metálicas, otras cepas no crecieron a esta concentración y las demás no se sembraron a mayores concentraciones.

Tabla N° 28. Crecimiento de levaduras aisladas del lago Junín y afluentes, sembradas en agar YPG con diferentes metales a una concentración de 400 ppm, por 3 semanas

Cepas aisladas de muestras de suelos	Concentración de iones metálicos 400 ppm			
	Cr^{+6}	Cd^{+2}	Hg^{+2}	Cu^{+2}
4JSL1	+*	NC	NS	+*
4JSL2	+*	+	NS	+*
6JSL1	NS	NS	NS	+*
6JSL2	NC	NC	NS	+*
7JSL1	NS	NS	NS	NC
8JSL1	NS	NS	NS	+*
9JSL1	+*	NC	NS	+*
10JSL2	NS	NC	NS	+*
11JSL1	NS	NC	NS	NC
11JSL2	NS	NC	NS	+*
13JSL1	+*	NC	NS	NC
14JSL1	NS	NC	NS	+
15JSL1	NS	NC	NS	NS
Cepas aisladas de muestras de aguas	Concentración de iones metálicos 400 ppm			
	Cr^{+6}	Cd^{+2}	Hg^{+2}	Cu^{+2}
AMJ1	NS	NC	NS	+
AMJ2	NS	NS	NS	NS
AMJ3	NS	NC	NS	NC
AMJ4	NC	NC	NS	NC
AMJ5	NS	NC	NS	+
AMJ6	NC	NC	NS	+

NC: No crecieron. NS: No se sembró.

* Crecimiento después de la primera semana, colonias de aspecto variable.

En estas concentraciones de iones metálicos (400 ppm), la mayoría de las cepas no fueron sembradas, debido a que no crecieron a menores concentraciones de Cd^{+2} y Hg^{+2} , solamente fueron sembradas las cepas que crecieron en los otros iones metálicos a menores concentraciones. Algunas cepas crecieron después de la primera semana en 400 ppm con

iones Cr^{+6} y en iones Cu^{+2} determinándose su CMI (Tabla 28). Ninguna de las cepas sembradas a 600 ppm crecieron, fueron sembradas a esta concentración para determinar si las cepas que crecieron en la anterior concentración, con los iones Cr^{+6} y Cu^{+2} podían crecer a 600 ppm, ninguna de las cepas crecieron (Tabla 29).

Tabla N° 29. Crecimiento de levaduras aisladas del lago Junín y afluentes, sembradas en agar YPG con diferentes metales a una concentración de 600 ppm, por 3 semanas

Cepas aisladas de muestras de suelos	Concentración de iones metálicos 600 ppm			
	Cr^{+6}	Cd^{+2}	Hg^{+2}	Cu^{+2}
4JSL1	NC	NS	NS	NC
4JSL2	NC	NC	NS	NC
6JSL1	NS	NS	NS	NC
6JSL2	NS	NS	NS	NC
8JSL1	NS	NS	NS	NC
9JSL1	NC	NS	NS	NC
13JSL1	NC	NS	NS	NC
14JSL1	NS	NS	NS	NC
Cepas aisladas de aguas	Concentración de iones metálicos 600 ppm			
	Cr^{+6}	Cd^{+2}	Hg^{+2}	Cu^{+2}
AMJ1	NS	NS	NS	NC
AMJ5	NS	NS	NS	NC
AMJ6	NS	NS	NS	NC

Tabla N° 30. Muestras de aguas de la mina San Cristóbal Huaraz, Ancash, sembradas en agar YPG a pH 4, por 2 semanas.

Muestra Aguas	Presencia de colonias	Aspecto de las colonias
1SCL	+	Buen crecimiento, colonias mucoides
2SCL	+	Buen crecimiento, colonias mucoides
3SCL	+	Buen crecimiento, colonias mucoide cremosas
4SJL	+	Buen crecimiento, colonias mucoide brillantes

Tabla N° 31. Crecimiento de las levaduras aisladas de aguas de la mina San Cristóbal, sembradas en medio sólido YPG con diferentes concentraciones de iones metálicos

Cepas aisladas de relaves líquidos	Concentración de iones metálicos 100 ppm			
	Cr ⁺⁶	Cd ⁺²	Hg ⁺²	Cu ⁺²
1SCL	+++	+++	+	+++
2SCL	+++	++	+	++*
3SCL	+++	++	+	+++
4SCL	+++	++	+	+++
Cepas aisladas de relaves líquidos	Concentración de iones metálicos 200 ppm			
	Cr ⁺⁶	Cd ⁺²	Hg ⁺²	Cu ⁺²
1SCL	+++	+++*	NC	+++
2SCL	+++*	NC	NC	+*
3SCL	+++	+*	NC	++*
4SCL	+++*	+++*	NC	+
Cepas aisladas de relaves líquidos	Concentración de iones metálicos 400 ppm			
	Cr ⁺⁶	Cd ⁺²	Hg ⁺²	Cu ⁺²
1SCL	+*	NC	NS	++*
2SCL	NC	NS	NS	+*
3SCL	-	NC	NS	+*
4SCL	-	NC	NS	NC
Cepas aisladas de relaves líquidos	Concentración de iones metálicos 600 ppm			
	Cr ⁺⁶	Cd ⁺²	Hg ⁺²	Cu ⁺²
1SCL	+*	NS	NS	+*
2SCL	NC	NS	NS	NS
3SCL	NS	NS	NS	NS
4SCL	NS	NS	NS	NS

* Crecimiento después de la primera semana, colonias de aspecto variable.

Solamente las cepas 1SCL y 2SCL crecieron en 400 ppm con Cr⁺⁶ y Cu⁺², la cepa 1SCL presento un ligero crecimiento después de la primera semana en Cr⁺⁶ y Cu⁺² a 600 ppm. En medio YPG con 400 ppm de Cd⁺² no creció ninguna de las 04 cepas. En agar YPG más el ión Hg⁺², solo crecieron hasta 100 ppm, lo cual evidencia la sensibilidad a este metal de la mayoría de cepas evaluadas, sin embargo, la CMI para el Cr y Cu fueron más altas.

5.6. Resultados de identificación molecular

5.6.1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los amplicones secuenciados

Los amplificadores de la región D1/D2 LSU de la sub unidad ribosomal 26S, de las muestras de levaduras aisladas de la laguna Pacocochoa (AMP3, AMP4, TMP5, AMP6, AMP7 y AMP8) fueron visualizados mediante electroforesis en agarosa al 1% (Figura N° 40), en la cual se evidencia el tamaño esperado (600 pb aproximadamente). Como marcador de estándar de peso molecular se utilizó el marcador MassRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas).

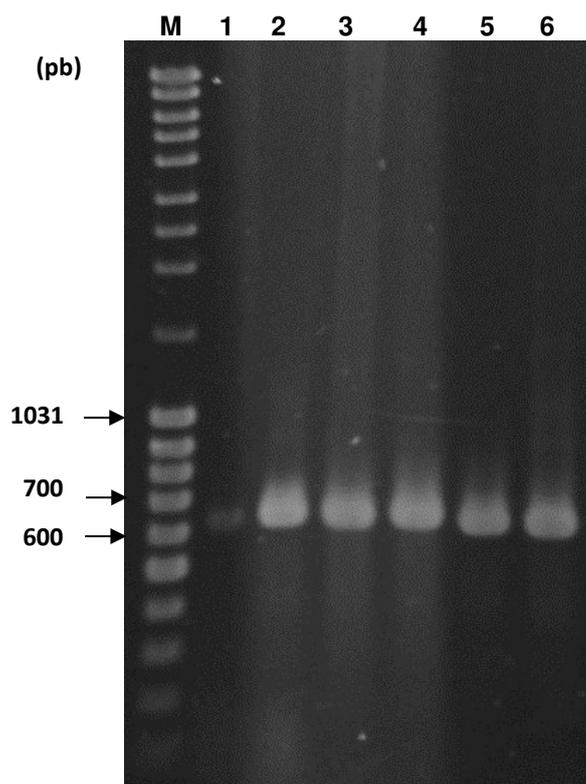


Figura N° 40: Electroforesis del ADN (región D1/D2 LSU), obtenidos de 06 cepas de levaduras de la laguna Pacocochoa: **1:** AMP3, **2:** TMP4, **3:** AMP5, **4:** AMP6, **5:** TMP7 y **6:** TMP8. M: Marcador utilizado Mass Ruler™ DNA Ladder Mix.

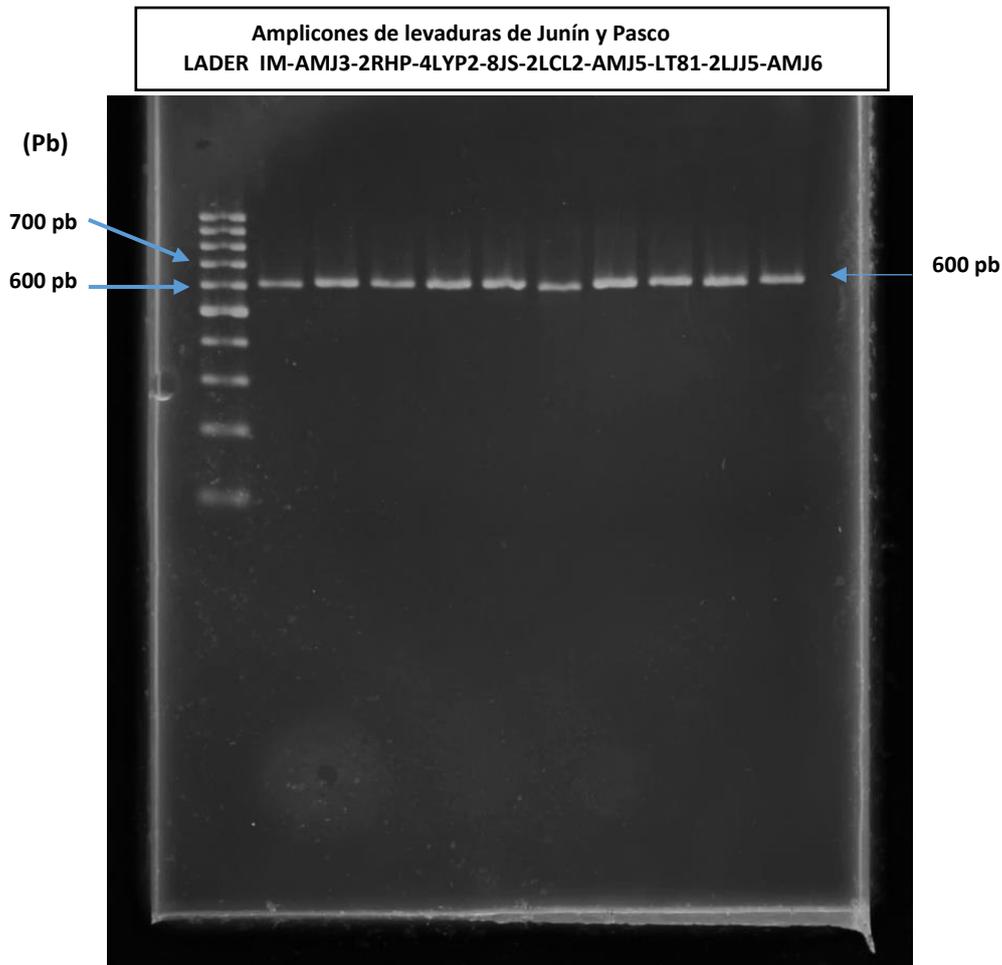


Figura 41. Electroforesis en gel de agarosa (2 %) de amplicones de levaduras región D1/D2 LSU de la subunidad 26S ribosomal. El primer carril (ladder), indica el tamaño de los amplicones, alrededor de 600 pb. Muestras aisladas de Junín y Pasco.

Los productos de la PCR esperados, de 10 cepas de Junín y Pasco (IM, AMJ3, 2RHCP, 4LYP2, 8JS, 2LCL2, AMJ5, LT81, 2LJJ5, AMJ6), corresponden al domino D1/D2 de la región LSU de la subunidad ribosomal 26S, de aproximadamente 600pb tal como se muestran en la electroforesis realizada en el gel de agarosa al 2% (Figura N° 41). Como marcador de estándar de peso molecular se utilizó el marcador MassRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas).

5.6.2. Identificación molecular y filogenia

Los estudios filogenéticos se trabajaron con 10 cepas (IM, AMJ3, 2RHCP, 4LYP2, 8JS, 2LCL2, AMJ5, LT81, 2LJJ5, AMJ6) de levaduras aisladas de Junín y Pasco, y 06 cepas (AMP3, AMP4, TMP5, AMP6, TMP7 y TMP8) de levaduras aisladas de la laguna Pacococha Castrovirreyna (Huancavelica). El primer grupo de levaduras fueron aisladas y

procesadas bajo las condiciones de cultivo en laboratorio. Se evaluaron las levaduras que tuvieron buen crecimiento y resistencia a metales pesados. La cepa AMJ6 fue la elegida para realizar estudios de expresión de proteínas (proteómica) en condiciones normales y en estrés por iones metálicos. Las secuencias nucleotídicas de las cepas del género *Yarrowia* se agruparon en un clúster relacionado filogenéticamente a *Y. lipolytica*, como se observa en la Figura 42, nuestros resultados del Blastn confirmaron una identidad de 100% con secuencias nucleotídicas de *Y. lipolytica* con número de acceso MH656398, con una cobertura en promedio de 90%, aproximadamente 550 pb, presentes en la base de datos del NCBI.

Los amplicones de estas 10 cepas se muestran en el gel de agarosa de la Figura 41, los amplicones muestran un tamaño molecular de 620 Pb. Para la amplificación de las regiones divergentes que permiten la identificación molecular de las levaduras, se utilizaron cebadores F63 y LR3. Todas las reacciones enviadas tuvieron 25 μ L del producto de la PCR a una concentración aproximada de 70 ng, para su secuenciamiento. La filogenia realizada con 10 cepas fue inferida a partir de 550-620 bases nucleotídicas, se aplicó el método de Kimura 2 parámetros con 1000 réplicas (bootstrap) para la inferencia filogenética. Todas las cepas forman un clado con *Y. lipolytica*, incluyéndose las cepas AMJ3 y AMJ6, cepas de estudio para la biosorción de metales y expresión de proteínas (proteómica).

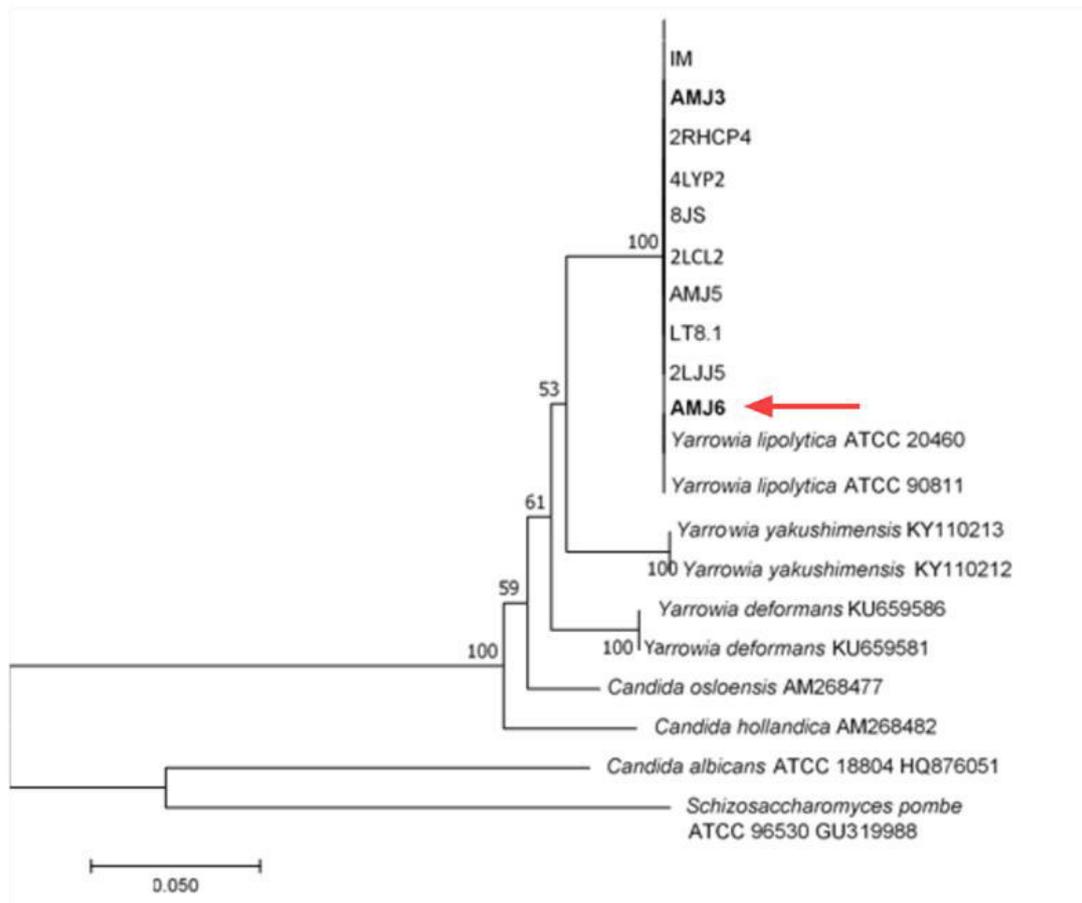


Figura 42: Árbol filogenético basado en la región D1/D2 LSU de la subunidad 26S ribosomal. Los 10 aislados de levaduras resistentes a metales pesados, se relacionan filogenéticamente con *Yarrowia lipolytica*, la fecha en rojo señala el aislado AMJ6 cepa evaluada con la que se realizó el estudio proteómico. Se utilizó el modelo Kimura 2 parámetros y bootstrap de 1000 repeticiones.

En el segundo grupo de levaduras, la identificación molecular y análisis filogenético de las cepas: *Rhodotorula toruloides* (AMP3), *Meyerozyma guilliermondii* (AMP4, TMP5 y AMP6), *Coniochaeta velutina* (TMP7 y TMP8), se muestra en la Figura 43. La región D1/D2 del extremo 5' del gen de la subunidad mayor (LSU) del ADNr. El LSU es parte del complejo de genes del ADNr y está constituido por secuencias repetidas en tándem, organizándose en grupos los genes ribosomales en el genoma nuclear. Los genes ribosomales son altamente conservados, actualmente se sabe que están compuestos de una mezcla de regiones conservadas y divergentes, éstas últimas son llamadas “regiones divergentes -D” y tienen una orientación que va de 5' a 3' del ARNr maduro (Sonnenberg et al., 2007). Actualmente también se sabe que están compuestos de una mezcla de regiones conservadas y divergentes, estas últimas llamadas “regiones divergentes D tienen una orientación que va de 5' a 3' del ARNr maduro”, estos genes son altamente conservados (Sonnenberg et al., 2007).

La región ha sido secuenciada en la mayoría de los hongos ascomicetos, es común en todas las levaduras, lo que permite su reconocimiento intraespecífico. En algunas levaduras y hongos se utilizan otros cebadores, como las secuencias intergénicas ITS, también en las especies fuertemente relacionadas es recomendable para la identificación (Hall et al., 2003).

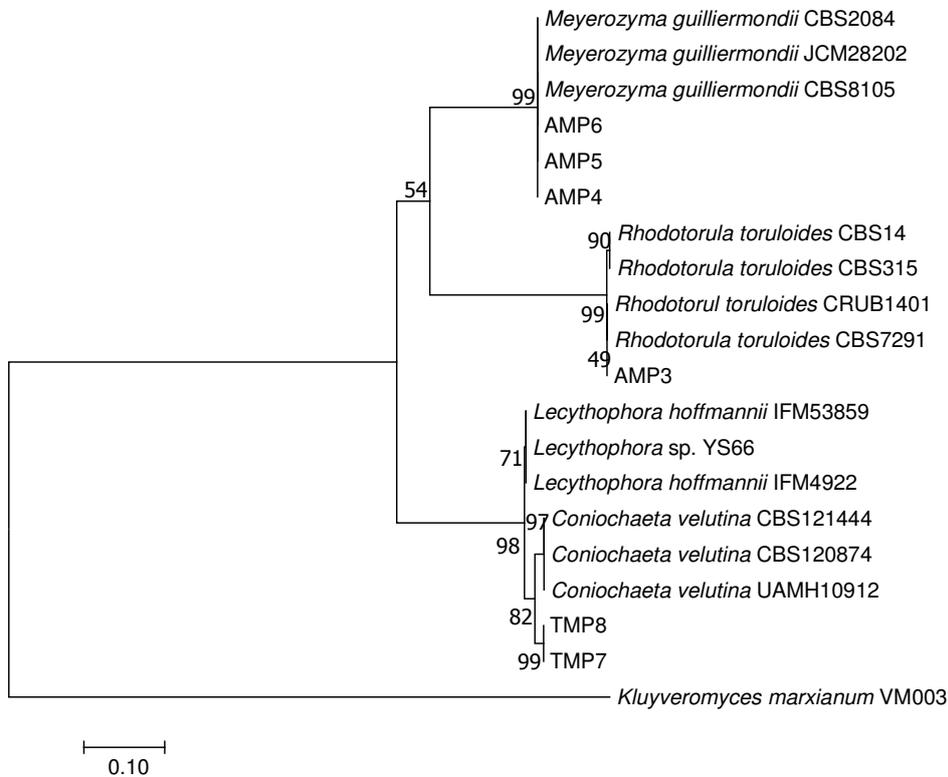


Figura N° 43. Árbol filogenético construido por el método de Neighbor joining utilizando la región D1/D2 LSU de las levaduras *Rhodospiridium toruloides* (AMP3) y *Meyerozyma guilliermondii* (AMP4, AMP5 y AMP6) resistentes a metales. Se utilizó el modelo Kimura 2 parámetros y un análisis de bootstrap de 1000 repeticiones.

Los amplificadores de la PCR, de las levaduras *Rhodotorula toruloides* (AMP3), *Meyerozyma guilliermondii* (AMP4, AMP5 y AMP6), *Coniochaeta velutina* (TMP7 y TMP8), aisladas de la laguna Pacococha, fueron enviados a MacroGen USA para su secuenciamiento, se ensamblaron utilizando el programa CAP3. Luego, se realizó un BlastN para compararlas con otras secuencias de levaduras de la base de datos del GenBank. El programa BlastN permitió comparar las secuencias de la región D1/D2 LSU de otras levaduras identificadas y reportadas en el Genbank, nuestros resultados se muestran en la Figura 43 y Tabla 32. El secuenciamiento de los amplificadores de las muestras de ADN, presentaron variación en cuanto al número de pb. La cepa AMP3 correspondiente a *Rhodospiridium toruloides*,

presentó 598 pb, las cepas AMP4, TMP5 Y AMP6, presentaron 614, 543 y 601 pb respectivamente, estas tres cepas corresponden a la misma especie *Meyerozyma guilliermondii* (antes *Pichia guilliermondii*), ubicados filogenéticamente en un mismo clado con un valor de bootstrap de 1000 repeticiones. La identificación molecular de estas cepas se debe a la presencia de las “regiones divergentes D” mencionadas anteriormente por Sonnenberg et al. (2007). Región secuenciada en la mayoría de las levaduras, por ser una región altamente variable y conservada en cada levadura, ayuda a una mejor identificación de las especies y cepas dentro de una misma especie. Similares resultados se obtuvieron con el ADN secuenciadas de las cepas TMP7 y TMP8 con 583 pb y 578 pb, pertenecientes a una misma especie *Coniochaeta velutina*, con un valor de bootstrap de 100% y una identidad del 97%.

Tabla N° 32: Resultados del análisis de 06 secuencia según el programa BLAST de levaduras ambientales de la laguna Pacococha Castrovirreyna, Huancavelica.

Cepa aislada	Tamaño del amplificado D1/D2 LSU (pb)	Especie relacionada	N° de Accesoión	% Identidad
AMP3	598	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	EF585193	99
AMP4	614	<i>Pichia guilliermondii</i>	EU250053	100
TMP5	543	<i>Pichia guilliermondii</i>	AM160625	100
AMP6	601	<i>Pichia guilliermondii</i>	FJ515260	100
TMP7	583	<i>Coniochaeta velutina</i> o <i>Lecythophora hoffmannii</i>	AY346275 / AB100627	97
TMP8	578	<i>Coniochaeta velutina</i> o <i>Lecythophora hoffmannii</i>	EU999180 / AM397869	97

Para hallar las relaciones filogenéticas con otras levaduras se realizó un alineamiento múltiple (Figura N° 44) y se evaluó el modelo evolutivo utilizando el programa Dambe (<http://dambe.bio.uottawa.ca/dambe.asp>), se utilizó el modelo Kimura 2-parámetros, para ver la divergencia evolutiva (Figura N° 45).

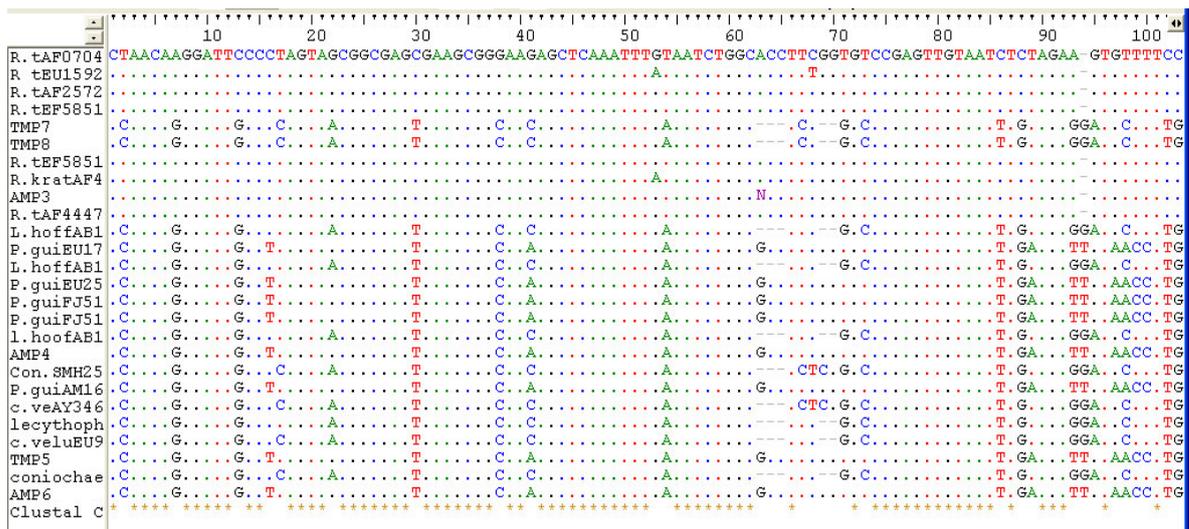


Figura N° 44. Alineamiento de las secuencias obtenidas de la laguna Pacococha, aplicando el programa Bioedit. (.): Sitios conservados, (letras): sitios variables.

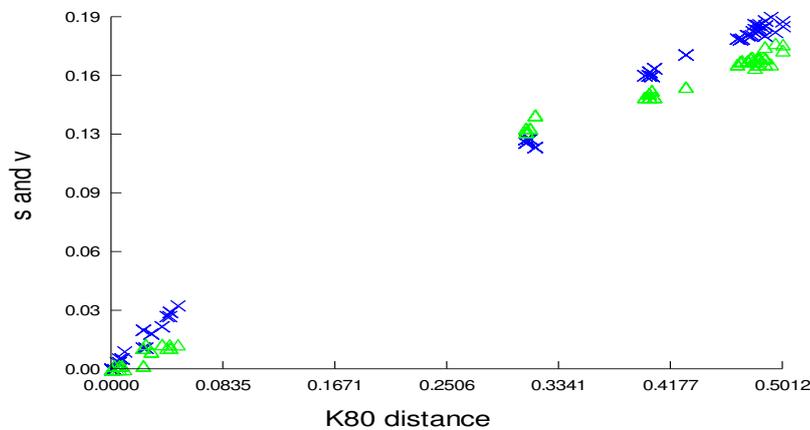


Figura N° 45. Modelo evolutivo: Kimura 2-parámetros evaluado con el programa Dambe.

Las muestras TMP5, AMP4 y AMP6 están agrupadas con la especie de *Pichia guilliermondi* (ahora *Meyerozyma guilliermondi*) con valor de bootstrap de 100%, con lo cual se concluye que los aislados pertenecen a esta especie. Por otro lado, el aislado *Rhodospodium toruloides* forma un clado con la especie *R. toruloides* (valor de Bootstrap de 77%), con lo cual se asume que los aislados pertenecen a esta especie. Las levaduras aisladas y seleccionadas de los diversos cuerpos de agua altoandinos, fueron identificadas molecularmente y accesadas al Centro Nacional de Información Biotecnológica “National Center for Biotechnology Information (NCBI) del GenBank, las cepas accesadas se reportan en la Tabla N° 33.

Tabla 33. Levaduras nativas aisladas de cuerpos de agua altoandinos de Junín, Pasco y Pacococha, identificadas con el marcador ribosomal de la subunidad mayor 26S LSU, accesadas al NCBI del GenBank.

Nº	CÓDIGO	LEVADURAS	LUGAR*	Código Acceso**
1	1RYL1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Represa Yuracmayo	MH656369
2	2LCL1	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Laguna Canchis	MH656376
3	2LCL2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Laguna Canchis	MG018361
4	2LCL3	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Laguna Canchis	MH656376
5	2LJJ2	<i>Rhodotorula toruloides</i>	Lago Junín	MH656364
6	2LJJ4	<i>Pichia fermentans</i>	Lago Junín	MH656370
7	2LJJ5	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Lago Junín	MH656362
8	2LJJ6	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Lago Junín	MH656368
9	2SNP2	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Lago Junín	MH656365
10	2LJJ1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Lago Junín	MH656393
11	AMJ6	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Lago Junín	MH656398
12	AMJ5	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Lago Junín	MH656374
13	AMJ4	<i>Pichia fermentans</i>	Lago Junín	MH656375
14	AMJ3	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Lago Junín	MH656399
15	IM	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Lago Junín	MG018377
16	LT81	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Lago Junín	MG018364
17	9JS	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Lago Junín	MH656381
18	8JS	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Lago Junín	MG018378
19	3LCJ2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	laguna churuca	MH656387
20	3LCJ1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Laguna Churuca	MH656388
21	2LHJ1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Laguna Huacracocha	MH656378
22	2LHJ2	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Laguna Huacracocha	MH656367
23	2RHP4	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Relavera Huarón	MH656397
24	2RHP5	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Relavera Huarón	MH656371
25	2RHP6	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Relavera Huarón	MH656360
26	2RYP3	<i>Rhodotorula toruloides</i>	Relavera Yanamate	MH656372
27	2RYP8	<i>Pichia fermentans</i>	Relavera Yanamate	MH656377
28	2RYP9	<i>Rhodotorula toruloides</i>	Relavera Yanamate	MG018358
29	2RMCP0	<i>Pichia sp</i>	Relavera Yanamate	MG018375
30	4LYP0	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Relavera Yanamate	MH656384
31	4LYP1	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Relavera Yanamate	MH656400
32	4LYP2	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Relavera Yanamate	MH656395
33	4LYP3	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Relavera Yanamate	MH656392
34	4LYP4	<i>Coniochaeta fodinicola</i>	Relavera Yanamate	MH656394
35	1LYP3	<i>Cystobasidium sp o Pucciniomycotina</i>	Relavera Yanamate	MH656394
36	2LQP4	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Relavera Quiulacocha	MG018366
37	3RMP1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Milpo	MH656385
38	2RMP1	<i>Pichia fermentans</i>	Milpo	MG018374
39	2RMP2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Milpo	MH656361
40	2RPM5	<i>Pichia fermentans</i>	Milpo	MH656366
41	3RSJJ1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Río San Juan	MH656386
42	AMP3	<i>Rhodotorula toruloides</i>	Laguna Pacococha	MG015937
43	AMP4	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Laguna Pacococha	MG015938
44	AMP5	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Laguna Pacococha	MG015939
45	AMP6	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Laguna Pacococha	MG015940
46	TMP7	<i>Coniochaeta velutina</i>	Laguna Pacococha	MG015941
47	TMP8	<i>Coniochaeta velutina</i>	Laguna Pacococha	MG015942

*Lago Junín y lagunas de la sierra central del Perú contaminadas con metales pesados sobre los 4000 msnm

** Código de acceso de levaduras identificadas subidas a la base de datos "National Center for Biotechnology Information" (NCBI).

5.7. Cinética de crecimiento

5.7.1 Cinética de crecimiento de *Yarrowia lipolytica* AMJ3 y AMJ6

Para nuestras cepas de *Y. lipolytica* AMJ6 y AMJ3 aisladas de zonas altoandinas, observamos que estas presentaron una curva de crecimiento similar. La fase exponencial de crecimiento comenzó a las 30 h después del cultivo inicial y esta fase terminó a las 44 h aproximadamente, comenzando posteriormente la fase estacionaria, siendo mayor esta fase en la cepa AMJ3, como se observa en la Figura 46.

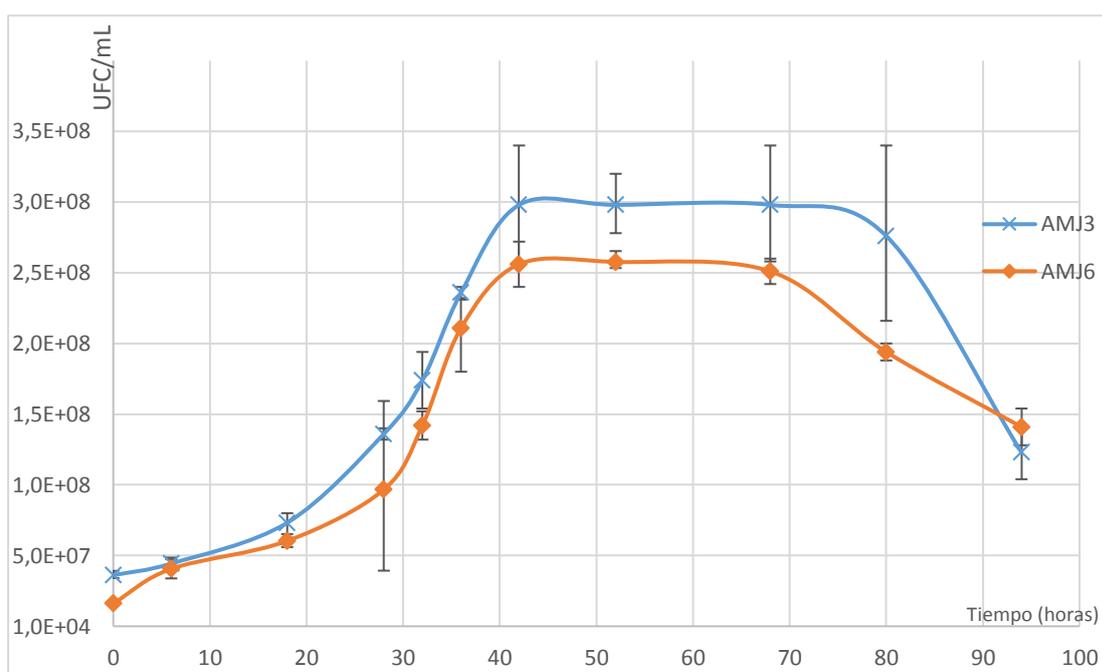


Figura 46. Cinética de crecimiento de las cepas de *Y. lipolytica* AMJ6 (-♦-), y AMJ3 (-x-) en medio YPG pH 4.0, temperatura 20 °C y agitación constante de 150 rpm. La cinética fue medida hasta las 96 h.

5.7.2 Cinéticas de crecimiento con cobre y cromo de las cepas de *Yarrowia lipolytica* (AMJ3 y AMJ6)

Se observa que en la cepa AMJ6, la fase exponencial para todos los ensayos (control, Cu⁺² y Cr⁺⁶), se inició a partir de las 20 h, hasta las 50 h aproximadamente. El crecimiento de la cepa control sin metal es superior en todos los tiempos a los cultivos con metales, le sigue la cepa cultivada con cobre y de menor crecimiento la cepa cultivada con cromo. Asimismo, se observa que la cepa AMJ3 tiene una curva de crecimiento con pendiente más pronunciada,

la fase exponencial para los ensayos control y Cu^{+2} se inicia a las 15 h, hasta 60 h, y para el Cr^{+6} la fase exponencial se inicia a las 25 h hasta a las 60 h. Los ensayos con la cepa AMJ3 entraron a la fase estacionaria a partir de las 60 h. La Figura 47, muestra las cinéticas de crecimiento para ambas cepas en caldo YPG a pH 4.0, 20 °C, 150 rpm y 96 h de cultivo. La cinética de la cepa AMJ6 cultivada con Cu^{+2} fue ligeramente inferior al cultivo sin metal, pero superior al cultivo con Cr^{+6} (Figura 47). La cinética de la cepa AMJ3 cultivada en las mismas condiciones con Cu^{+2} fue superior al cultivo sin metal y con Cr^{+6} .

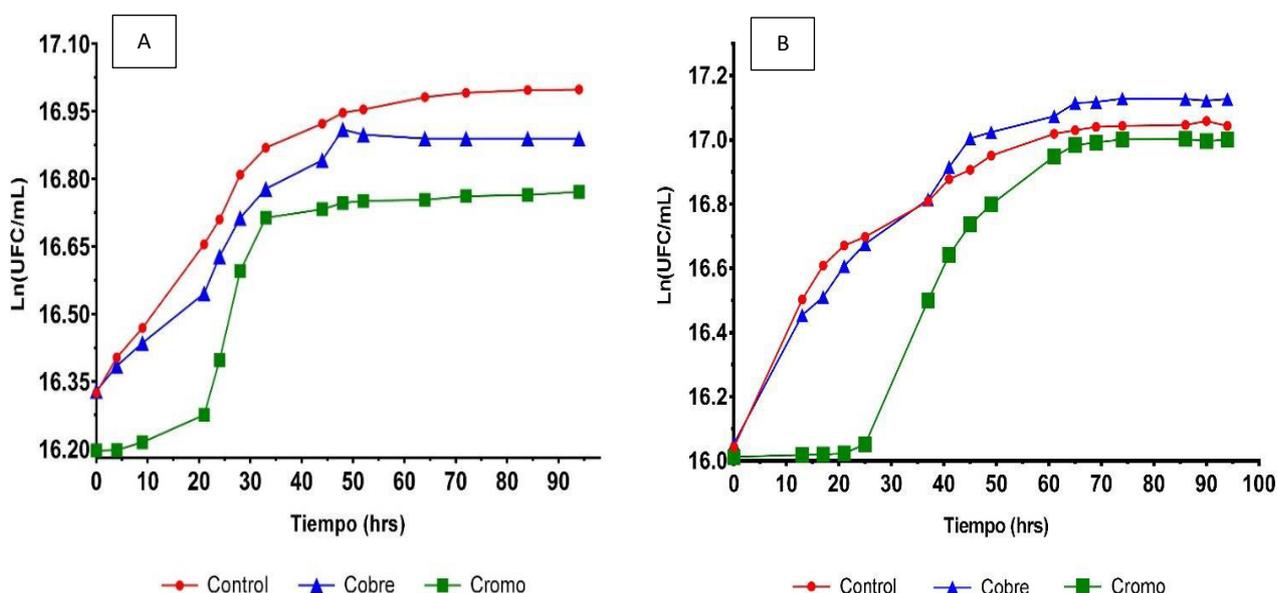


Figura 47. Cinéticas de crecimiento de las cepas de *Yarrowia lipolytica*. Cepa AMJ6 (A): control sin metal (-●-), 80 ppm (1.26 mM) de Cu^{+2} (-▲-) y 15 ppm (0.144 mM) de Cr^{+6} (-■-). Cepa AMJ3 (B): control sin metal (-●-), 80 ppm (1.26 mM) de Cu^{+2} (-▲-) y 10 ppm (0.096 mM) de Cr^{+6} (-■-). Las condiciones de cultivo en medio YPG fueron pH: 4.0, temperatura: 20 °C, agitación: 150 rpm y 96 h. de cultivo.

5.8. Ensayo de Citotoxicidad-Concentración Letal Media (CL50)

El análisis de citotoxicidad se realizó con cuatro iones metálicos: Cr^{+6} , Cu^{+2} , Cd^{+2} y Hg^{+2} . El resultado de la CL50 aproximada de *Y. lipolytica* AMJ3 para el ion Cr^{+6} fue de 12.5 ppm (0.06 mM), para el ion Cu^{+2} fue de 85 ppm (1.34 mM), para el ion Cd^{+2} fue de 60 ppm (0.54 mM) y para el ion Hg^{+2} fue de 7.5 ppm (0.04). El valor de p, fue menor a 0.0001, indicador que demuestra que el ensayo es significativo (Figura 48). (0.04 mM)

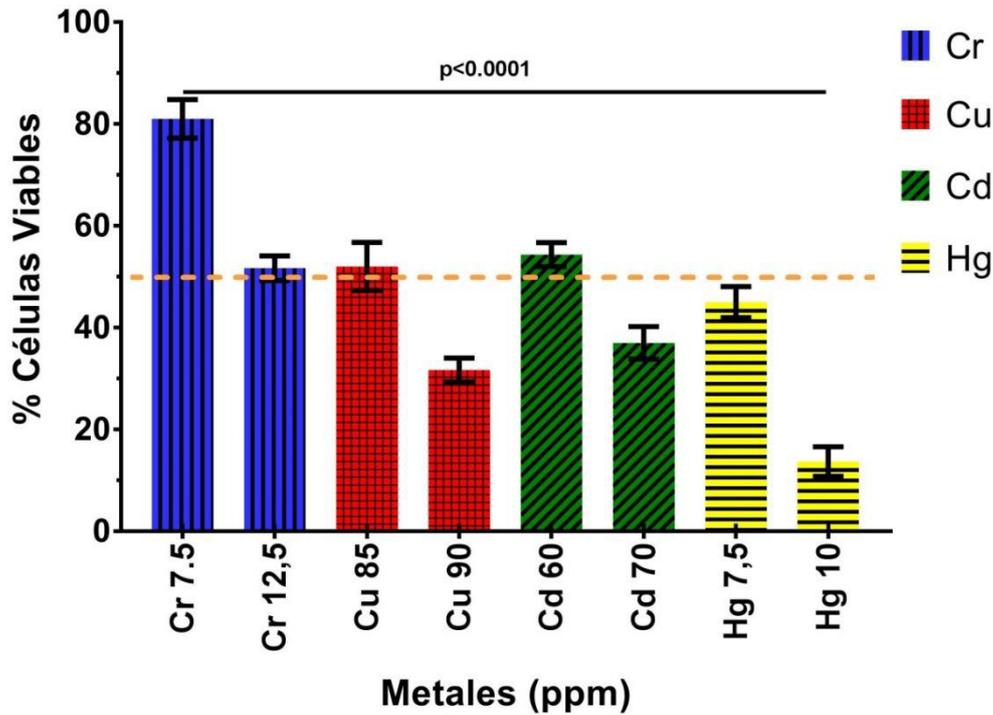


Figura N° 48. Concentración Letal Media CL50 con los metales (Cr^{+6} , Cu^{+2} , Cd^{+2} y Hg^{+2}) para *Yarrowia lipolytica* cepa AMJ3, en caldo YPG, pH 4.0, tiempo de enfrentamiento: 3 h.

En tanto que la CL50 aproximada de *Yarrowia lipolytica* AMJ6 fue de 55 ppm (0.53 mM) para el ion Cr^{+6} , 90 ppm (1.42 mM) para el ion Cu^{+2} , 55 ppm (0.49 mM) para el ion Cd^{+2} y 10 ppm (0.05 mM) para el ion Hg^{+2} . La desviación estándar promedio para los metales evaluados fue de 2.83 en AMJ6 (Figura 49), menor al de la cepa AMJ3. Los resultados de la CL50 muestran que el metal más letal para ambas cepas fue el ión Hg^{+2} , seguido del Cd^{+2} , Cr^{+6} y Cu^{+2} . Estos valores indican que el 50% de la población de levaduras mueren al ser expuestas por 3 h en estas concentraciones de estos metales.

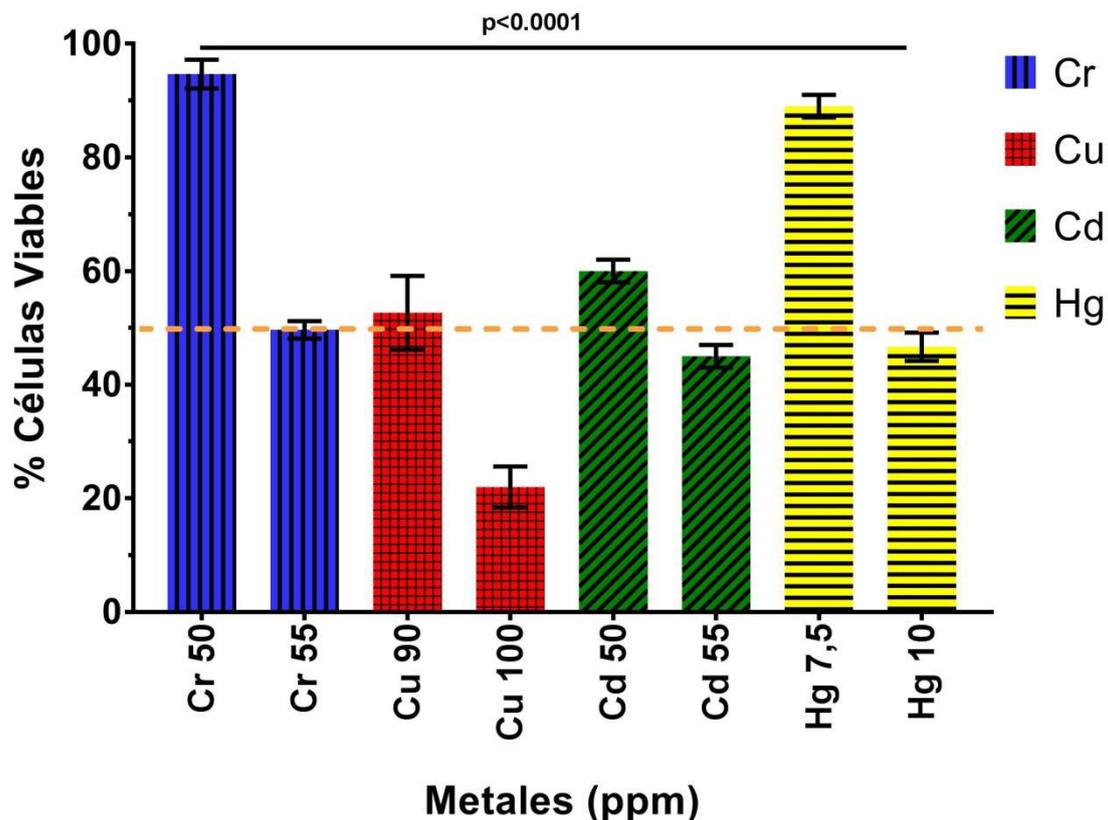


Figura N° 49. Concentración letal media CL50 con los metales (Cr^{+6} , Cu^{+2} , Cd^{+2} y Hg^{+2}) para *Yarrowia lipolytica* cepa AMJ6, en caldo YPG, pH 4.0, tiempo de enfrentamiento: 3 h.

5.9. Biosorción de metales

Se trabajó con los siguientes iones metálicos (Cr^{+7} , Cu^{+2} , Co^{+2} y Zn^{+2}), con 4 cepas de levaduras, las primeras cuatro fueron aisladas de la laguna Pacococha, departamento Huancavelica: *Rhodospiridium toruloides* cepa (AMP3), *Meyerozyma guilliermondii* cepas (AMP3, AMP5 y AMP6), y dos cepas correspondientes a *Yarrowia lipolytica* (AMJ3 y AMJ6) aisladas de la relavera Yanamate-Cerro de Pasco.

Para determinar la biosorción del ion Co^{+2} se trabajó con 50 ppm, se obtuvo una máxima biosorción promedio de 42 % con la cepa *Rhodospiridium toruloides* (AMP3) a las 72 h, disminuyendo drásticamente al 8 % a las 96 h (Tabla 34 y Figura 50), debido probablemente saturación del metal y/o a la ruptura y deterioro celular, esta alteración se verificó cuando se hizo coloración Gram, de un cultivo con metales después de las 72 y 96 h, se visualizó células rotas, deformes y de tamaño variable. La biosorción promedio de cobalto con la cepa

Meyerozyma guillermondii (AMP5) fue de 39% a cercano a las 72 h, y con la cepa *Meyerozyma guillermondii* (AMP6) la biosorción fue de 42%, ligeramente superior a la anterior cepa. Igualmente, en la coloración Gran realizada, se pudo visualizar que, en las tres cepas, a las 72 h comienza a variar su morfología celular, en todas las coloraciones, se visualiza células rotas y deformes. Los análisis de biosorción se realizaron en los laboratorios de USAQ de la facultad de Ingeniería química de la UNMSM (Método: Metales FAAS. Espectroscopia de emisión por plasma-EPA 200.7-Rev.44-1994). Para el estudio de biosorción del zinc, se trabajó con *Rhodospiridium toruloides* (AMP3) y *Meyerozyma guillermondii* (AMP6). La cepa AMP3 presentó la mejor biosorción promedio de 98.33%, y con la cepa AMP6 fue 97.67 % alrededor de las 72 h, en caldo YPG con 50 ppm (Tabla 35 y Figura 51).

Para la biosorción del ión Cu^{+2} se trabajó con dos cepas de *Y. lipolytica* (AMJ3 y AMJ6). En los resultados de biosorción se evidenció que las dos cepas presentan alto porcentaje de biosorción del ión Cu^{2+} a una concentración de 80 ppm (1.26 mM). Siendo la cepa AMJ6 la que presentó la mayor biosorción promedio de 91.90 %, entre las 48 a 72 h de cultivo y con la cepa AMJ3 fue de 90.25 % en similares tiempos. La varianza promedio para la cepa AMJ6 fue de 13.69, y de la cepa AMJ3 fue de 8.18 respectivamente (Tabla 36). Estas medidas de tendencia central demostraron una ligera dispersión de los tres ensayos realizados para los cuatro tiempos de medición. La Figura 52 muestra las repeticiones de los experimentos con cada una de las cepas. Se evidencia que en la cepa AMJ6, la biosorción fue ligeramente mayor en comparación con la cepa AMJ3.

En la biosorción del ion Cr^{+6} se obtuvieron resultados relativamente buenos. Se trabajaron con *Y. lipolytica* cepas AMJ3 y AMJ6. Las concentraciones de trabajo con la cepa AMJ3 fueron de 15 ppm (0.145mM), y con la cepa AMJ6 se trabajó con 50 ppm (0.49 mM). Los resultados se muestran en la Tabla 37 y Figura 53. La cepa AMJ3 presentó la mayor biosorción promedio alrededor de las 72 h con un valor promedio de 42 %; con la cepa AMP6 se obtuvo una biosorción promedio de 39 % a las 72 h. La biosorción del ión Cr^{+6} con la cepa AMJ6 fue a la concentración de 50 ppm (0.481 mM), la concentración ión Cr^{+6} con la cepa AMJ3 fue de 15 ppm (0.145 mM). La varianza promedio con la cepa AMJ3 fue de 3.73 para los cuatro tiempos de medición, con la cepa AMJ6 se obtuvo una varianza promedio de 2.35, lo que refleja repetibilidad y baja dispersión de los ensayos que se realizaron con este ión metálico (Tabla 37).

Tabla 34. Porcentaje de biosorción de Cobalto a 50 ppm en 3 ensayos (E1, E2 y E3) con las cepas (AMP6), (AMP5) y (AMP3); promedios (X), desviaciones estándar (S) y varianzas (S²)

Cepas	Tiempo (h)	E1 %	E2 %	E3 %	X%	(S)	(S ²)	(S ²) Promedio Varianza
AMP3	24	24.50	22.80	27.2	25	2.22	4.92	AMJ3 = 3.72
	48	38.24	32.39	35.6	35	2.93	8.58	
	72	42.18	42.60	40.48	42	1.12	1.26	
	96	8.24	7.64	8.40	8	0.40	0.16	
AMP5	24	26.8	26.8	25.8	26	0.58	0.33	AMP5 = 4.85
	48	28.24	34.24	32.7	32	3.12	9.71	
	72	37.60	40.24	38.7	39	1.33	1.76	
	96	16.60	12.40	11.4	13	2.76	7.61	
AMP6	24	24.50	22.80	27.2	25	2.22	4.92	AMP6 = 3.73
	48	38.24	32.39	35.6	35	2.93	8.58	
	72	42.18	42.60	40.48	42	1.12	1.26	
	96	8.24	7.64	8.40	8	0.40	0.16	

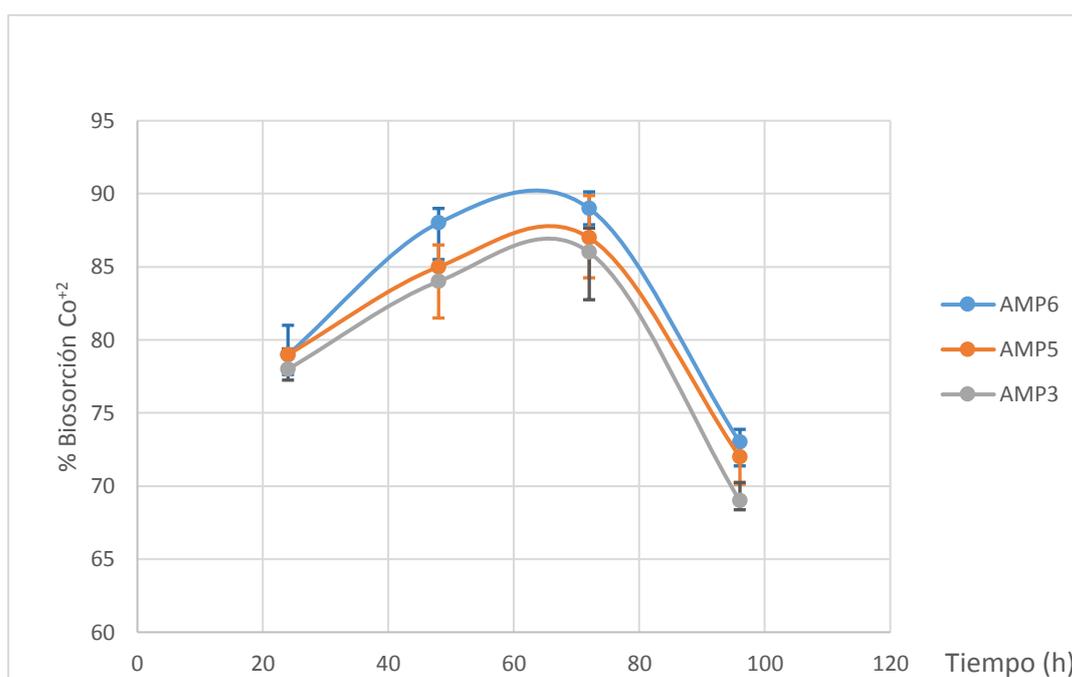


Fig. 50. Biosorción de Co⁺² en caldo YPG (50 ppm) con cepas: *Rhodospiridium toruloides*, (AMP3), *Meyerozyma guilliermondii* cepas AMP5 y AMP6.

Tabla 35. Porcentaje de biosorción de Zinc a 50 ppm en 3 ensayos (E1, E2 y E3) con las cepas (AMP3) y (AMP6); promedios (X), desviaciones estándar (S) y varianzas (S ²)								
Cepas	Tiempo (h)	E1%	E2%	E3%	X%	(S)	(S ²)	(S ²) Promedio varianza
AMP3	24	67	69	65	67.00	2.00	4.00	AMP3 = 5.42
	48	90	84	85	86.33	3.21	10.33	
	72	99	100	96	98.33	2.08	4.33	
	96	95	95	98	96.00	1.73	3.00	
AMP6	24	69	70	67	68.67	1.53	2.33	AMJ6 = 6.50
	48	84	91	92	89.00	4.36	19.00	
	72	99	98	96	97.67	1.53	2.33	
	96	99	97	96	97.33	1.53	2.33	

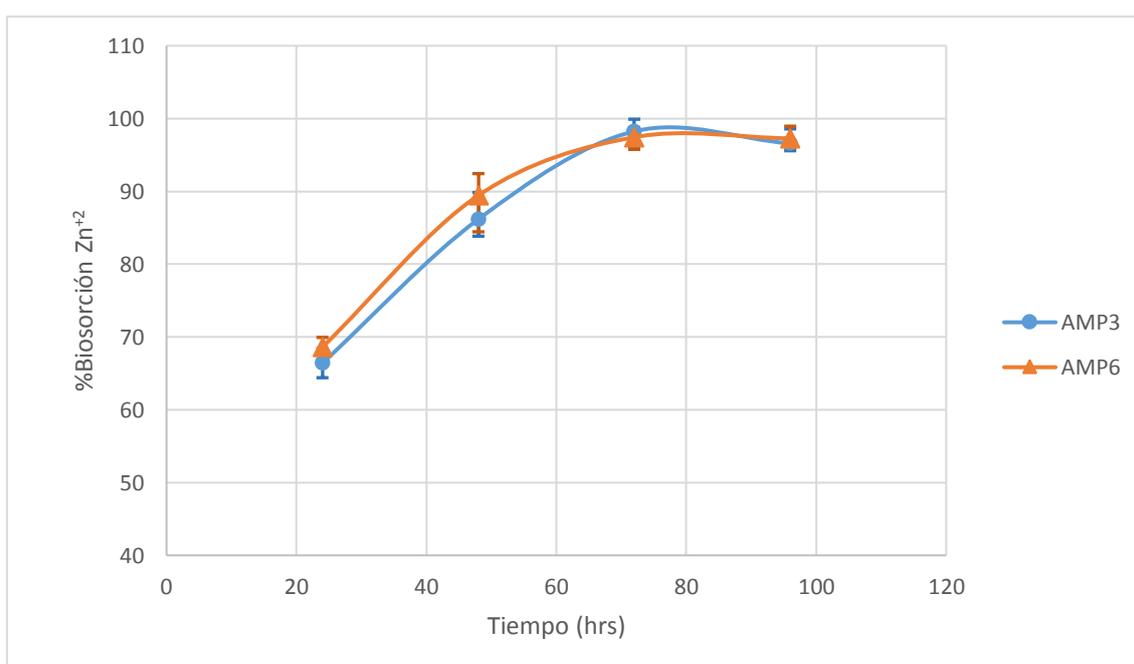


Fig. 51. Biosorción de Zn²⁺ en caldo YPG (50 ppm) con *Rhodospiridium toruloides* cepa AMP3 y *Meyerozyma guilliermondii* cepa AMP6.

Tabla 36. Porcentaje de biosorción de Cobre a 80 ppm en 3 ensayos (E1, E2 y E3) con las cepas (AMJ3) y (AMJ6); promedio (X) desviaciones estándar (S) y varianzas (S ²)								
Cepas	Tiempo (h)	E1%	E2%	E3%	X%	(S)	(S ²)	(S ²) promedio
AMJ3	24	80.0	83.6	85	82.87	2.58	6.65	AMJ3 = 8.18
	48	89.0	90.48	91.26	90.25	1.15	1.32	
	72	86.4	90.34	92.34	89.69	3.02	9.13	
	96	83.6	89.18	91.24	88.01	3.95	15.62	
AMJ6	24	78.4	80.16	87.6	82.05	4.88	23.85	AMJ6 = 13.69
	48	87.04	90.3	93.1	90.15	3.03	9.20	
	72	91.16	90.6	93.94	91.90	1.79	3.20	
	96	83.0	87.08	91.6	87.23	4.30	18.51	

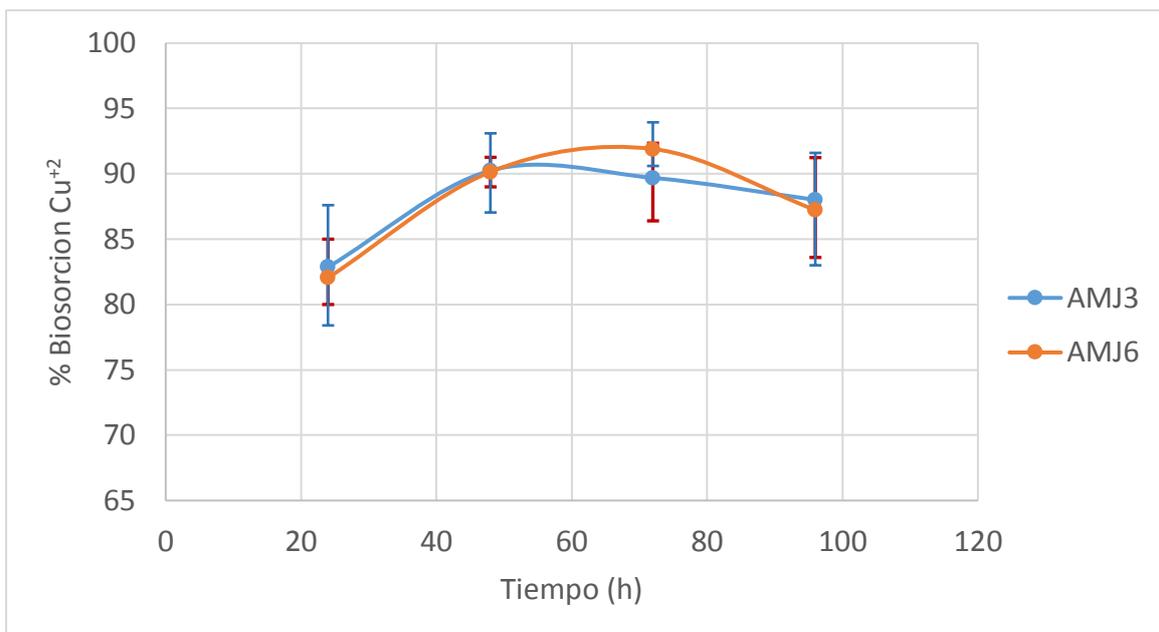


Fig. 52. Biosorción de Cu²⁺ en caldo YPG (80 ppm) con *Yarrowia lipolytica*, cepas AMJ3 y AMJ6.

Tabla 37. Porcentaje de biosorción de Cromo en 3 ensayos (E1, E2 y E3) con las cepas (AMJ3) y (AMJ6); promedio (X) desviaciones estándar (S) y varianzas (S ²)									
Cepas	Cr ⁺⁶ (ppm)	Tiempo (h)	E1 %	E2 %	E3 %	X%	(s)	(S ²) %	(S ²) promedio
AMJ3	15 ppm	24	24.50	22.8	27.2	25	2.22	4.92	AMJ3 = 3.73
		48	38.24	32.39	35.6	35	2.93	8.58	
		72	42.18	42.6	40.48	42	1.12	1.26	
		96	8.24	7.64	8.40	8	0.40	0.16	
AMJ6	50 ppm	24	30.0	33.5	32	32	1.76	3.08	AMJ6 = 2.35
		48	36.02	38.04	34.2	36	1.92	3.69	
		72	38.04	40.4	38.4	39	1.27	1.62	
		96	6.40	8.4	7.2	7	1.01	1.01	

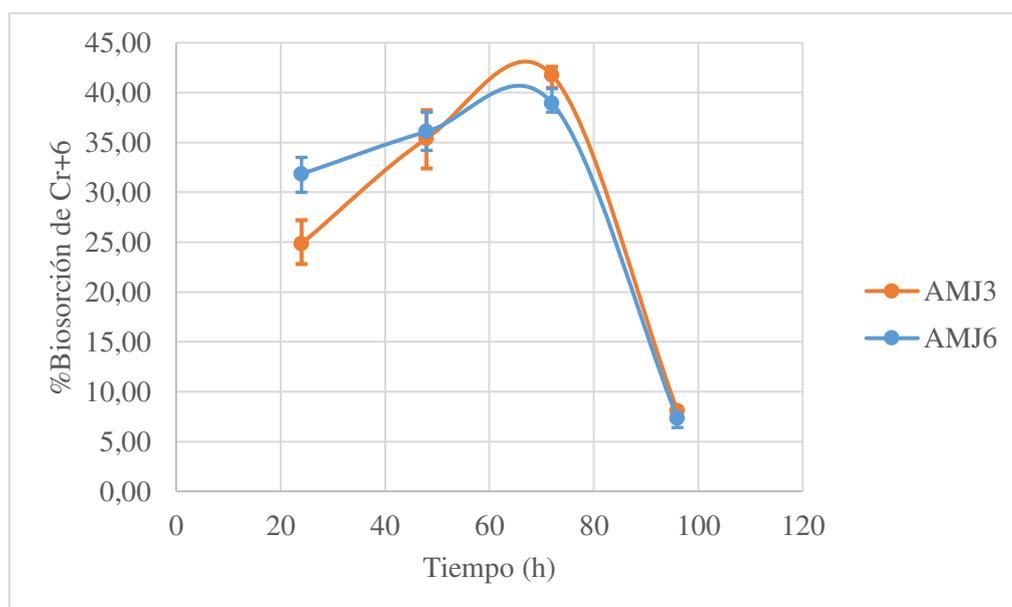


Fig. 53. Biosorción de Cr⁺⁶ (15 y 50 ppm) en caldo YPG con *Yarrowia lipolytica*, cepas AMJ3, y AMJ6.

5.10 Electroforesis en SDS-PAGE de las proteínas totales obtenidas de *Y. lipolytica* AMJ6 sometida al tratamiento con metales pesados

La CL50 de *Y. lipolytica* AMJ6 nos sirvió para hacer el estudio de expresión de proteínas de esta levadura frente a los diferentes metales pesados, con la finalidad de evaluar bandas de proteínas que puedan estar presentes o ausentes bajo ciertos metales, con relación a un control negativo, sin metales pesados (Figura 54).

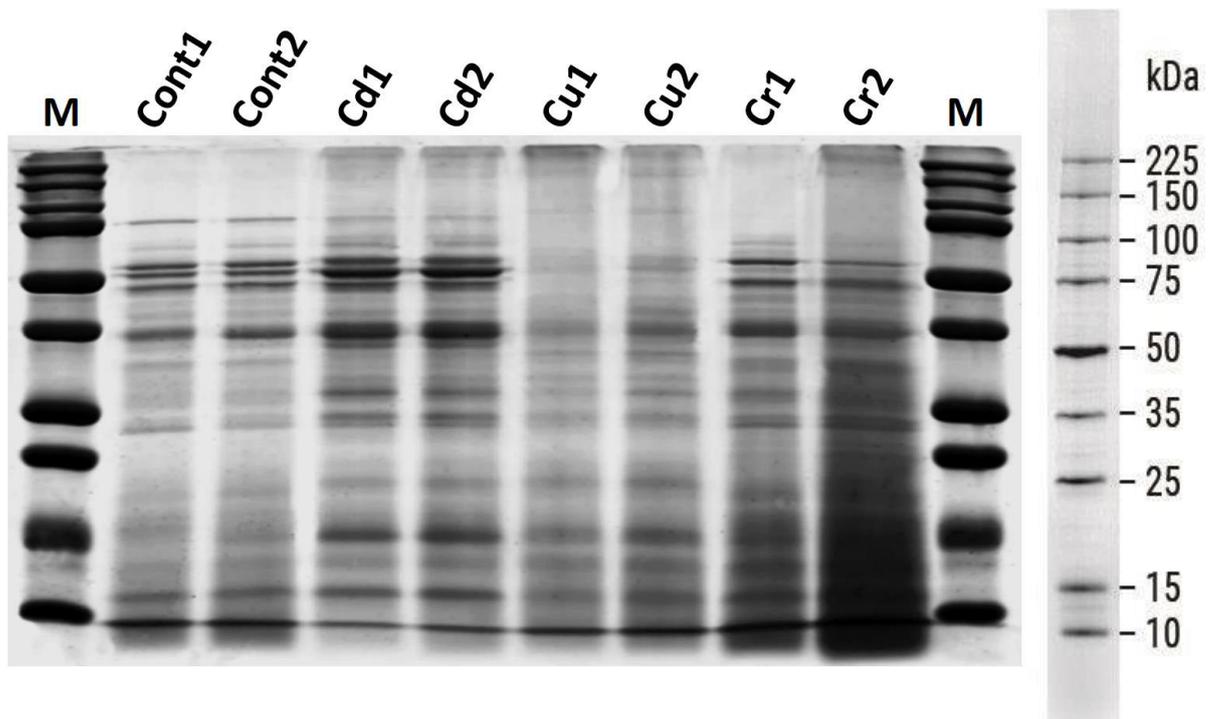


Figura 54. Electroforesis de proteínas de *Yarrowia lipolytica* AMJ6. Se muestra el perfil proteico en SDS-PAGE de los tratamientos a metales pesados: Cd1 y Cd2 = Réplicas del tratamiento con cadmio; Cu1 y Cu2 = Réplicas del tratamiento con cobre; Cr1 y Cr2 = Réplicas del tratamiento con cromo; Cont1 y Cont2 = Proteínas sin tratamiento con metal, M= Ladder de proteínas, de 10-225kDa

5.11 Proteínas reguladas encontradas bajo el tratamiento con iones metálicos

Encontramos diferencias en las proteínas reguladas en *Y. lipolytica* AMJ6 cultivada *in vitro* con metales pesados. El ensayo con el ión cromo mostró que 118 proteínas fueron reguladas tanto positiva y negativamente con relación al control sin tratamiento. En el ensayo con iones cobre, la regulación de proteínas fue más de tres veces comparado con la del cromo, encontrando 390 proteínas reguladas. El valor de proteínas reguladas para el ión cadmio fue de 252 (Figura 55 y Anexo 7).

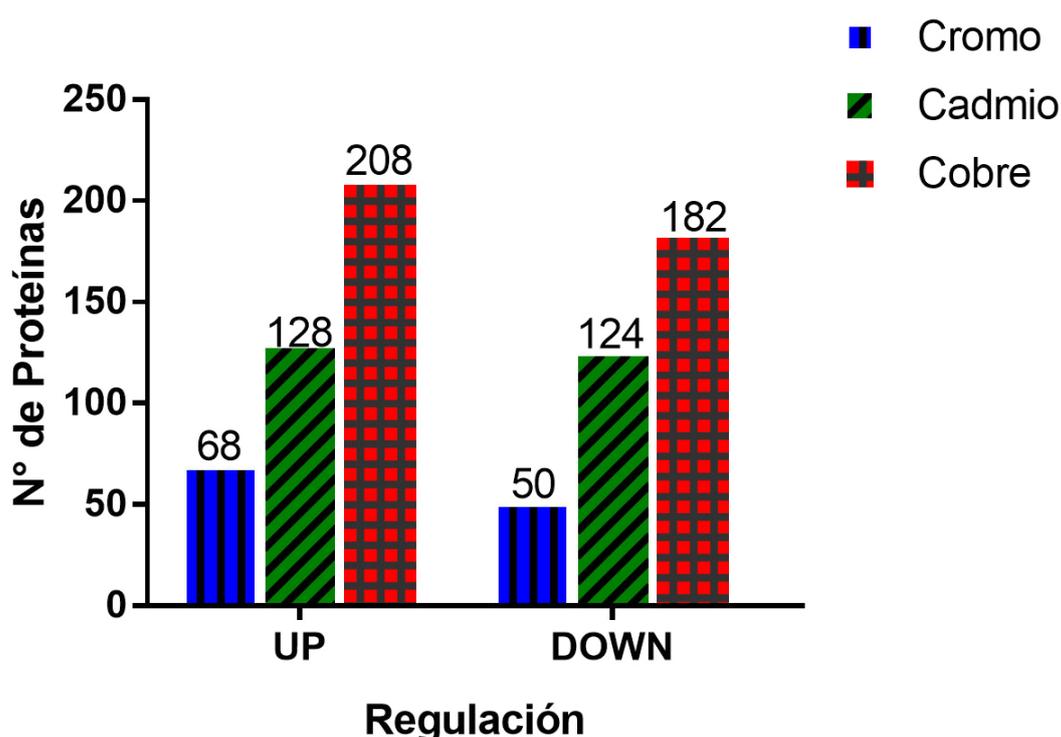


Figura 55. Proteínas reguladas bajo el tratamiento con el ion cromo, cadmio y cobre: 118 proteínas reguladas con cromo, 252 con cadmio y 390 con cobre. Las barras indican el número de proteínas encontradas bajo cada metal.

5.11.1 Proteínas expresadas bajo el tratamiento con iones cromo (Cr^{+6})

Un total de 118 proteínas fueron encontradas con regulación diferenciada con mayor y menor expresión (Up and Down) en relación al control sin tratamiento, como se muestra en la Figura 55 y Anexo 1. Estas proteínas fueron clasificadas de acuerdo con sus funciones biológicas, encontrando que más del 23 % sobreexpresan proteínas (Up-reguladas), cuya

función es el metabolismo global de proteínas, y un 10 % bajan su expresión (Down-reguladas) para la misma función. En el caso de proteínas relacionadas al metabolismo de carbohidratos se encontró un mayor porcentaje para proteínas que bajan su expresión, siendo del 18 %. Las proteínas de respuesta al estrés oxidativo sobreexpresan (Up-reguladas) en 11.76 %, y bajan su expresión (Down-reguladas) en 8 % (Figura 56). Estos resultados sugieren que el tratamiento con este metal, fue nocivo para la cepa, debido que se encontró pocas proteínas reguladas frente al control (562 proteínas no reguladas) (Anexo 7). Del mismo modo, las bandas de proteínas del perfil proteico de las levaduras tratadas con cromo no fueron muy evidentes con relación al control (Figura 53). Para la identificación y cuantificación de proteínas se empleó Log2 y se calcularon las medias de las réplicas biológicas, determinando el valor P. La cuantificación relativa de los cambios en la abundancia de proteínas de *Y. lipolytica* frente al tratamiento con cromo, se evidencia en la Figura 55 y Anexo 2.

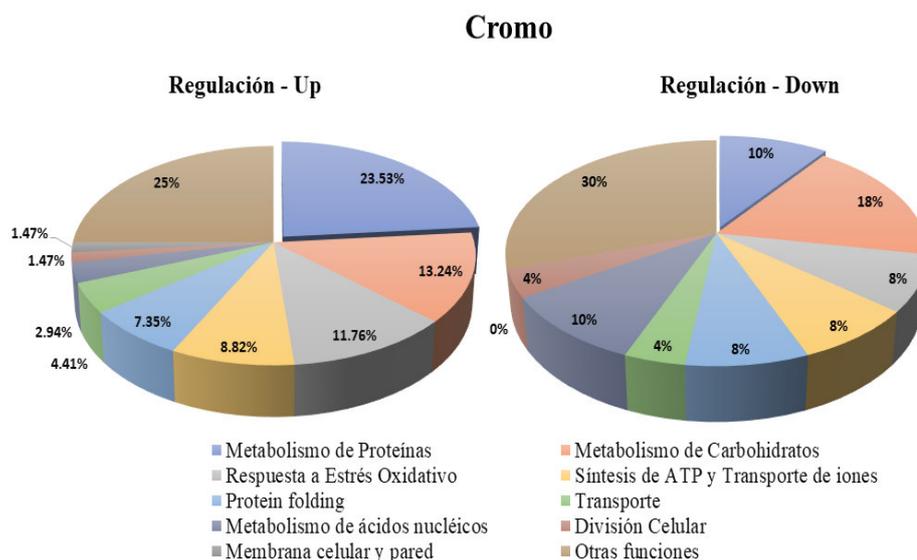


Figura 56: Clasificación de las 118 proteínas reguladas en el tratamiento con cromo en *Y. lipolytica* AMJ6. La distribución corresponde a su función biológica.

5.11.2 Proteínas expresadas bajo el tratamiento con iones cadmio (Cd²⁺)

Bajo el tratamiento con cadmio, encontramos 252 proteínas reguladas (Up and Down) con relación al control (384 no reguladas) (Anexo 7). Estos resultados sugieren que el tratamiento con este metal reguló más proteínas en comparación con el cromo. Clasificándolas de acuerdo a su función biológica, encontramos del mismo modo un porcentaje mayor de proteínas involucradas en el metabolismo global de proteínas que se sobreexpresan (Up-reguladas) en 21.09%, en comparación con el 12.10% que disminuye su expresión (Down-reguladas) (Figura 57). Para la identificación y cuantificación de proteínas se empleó Log₂ y se calcularon las medias de las réplicas biológicas, determinando el valor P. La cuantificación relativa de los cambios en la abundancia de proteínas de *Y. lipolytica* frente al tratamiento con cadmio, tal como se evidencia en la Figura 57 y Anexo 4.

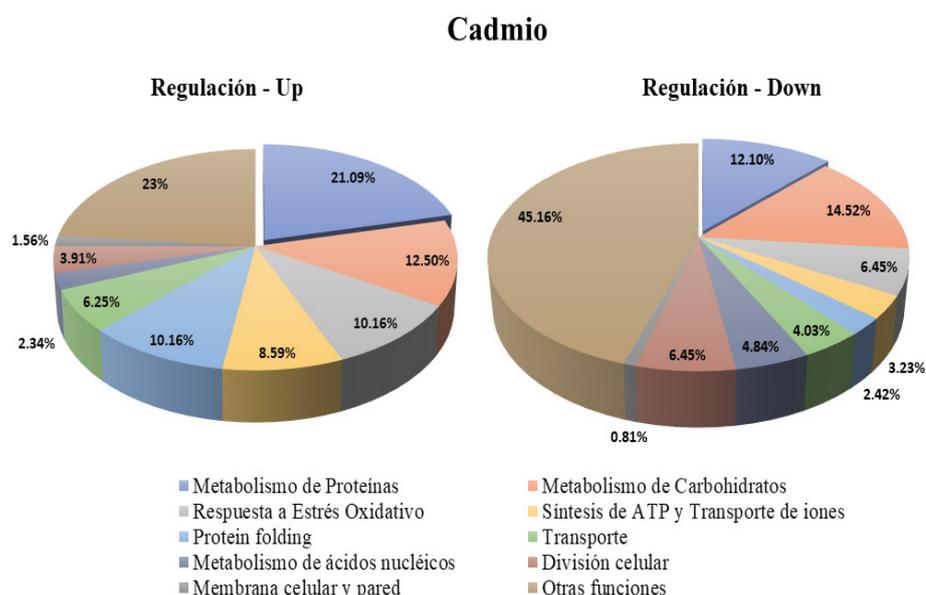


Figura 57: Clasificación de las 252 proteínas reguladas en el tratamiento con cadmio en *Y. lipolytica* AMJ6. La distribución corresponde a su función biológica.

5.11.3 Proteínas expresadas bajo el tratamiento con iones cobre (Cu²⁺)

Ensayos en medio de cultivo suplementado con cobre en cepas de *S. cerevisiae* (Kirchman & Botta, 2007) aumentaron la vida útil de las levaduras disminuyendo la generación de superóxido. En nuestros resultados encontramos un número mayor de proteínas reguladas de 390 (Up and Down) en comparación con las proteínas no reguladas 207 (Anexo 7). Un porcentaje menor de 5% relacionadas a estrés oxidativo fue observado con este metal en la sobreexpresión (Up-reguladas) de proteínas en comparación con el cromo y cadmio. Lo que indica, que bajo este tratamiento con cobre no fue perjudicial para las levaduras, encontrando un número mayor de proteínas reguladas como es el caso del metabolismo global de proteínas que aumentan (Up-reguladas) su expresión en 31.25% y disminuyen (Down-reguladas) la expresión de proteínas involucradas en la síntesis de carbohidratos en 16.48%. La cuantificación relativa de los cambios en la abundancia de proteínas de *Y. lipolytica* frente al tratamiento con cobre, se evidencia en la Figura 58 y Anexo 6.

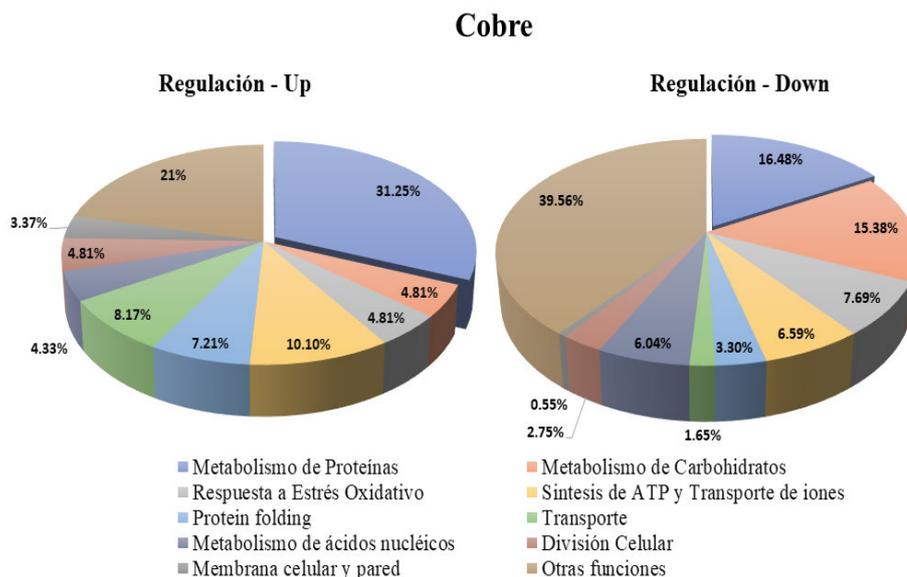


Figura 58: Clasificación de las 390 proteínas reguladas bajo tratamiento con cobre en *Y. lipolytica* AMJ6. La distribución corresponde a su función biológica. Siendo las más predominantes aquellas relacionadas con la función del metabolismo de proteínas.

Mediante el análisis de los datos encontrados en BioVenn (Hulsen et al., 2008), se encontraron proteínas únicas reguladas para cada metal tanto en la sobreexpresión de proteínas(Up), así con en la menor expresión (Down) en referencia al control. Las encontradas en cada metal fueron las siguientes: 26 proteínas para cromo, 82 para cadmio, 196 para cobre; para los tres metales se encontraron 48 proteínas en común (Figura 59). Estos resultados indicarían que existen proteínas únicas reguladas por efecto de cada metal y podrían estar relacionadas con el metabolismo del mismo. Tanto para proteínas que se sobreexpresan (Up-reguladas), como proteínas que disminuyen su expresión (Down-reguladas).

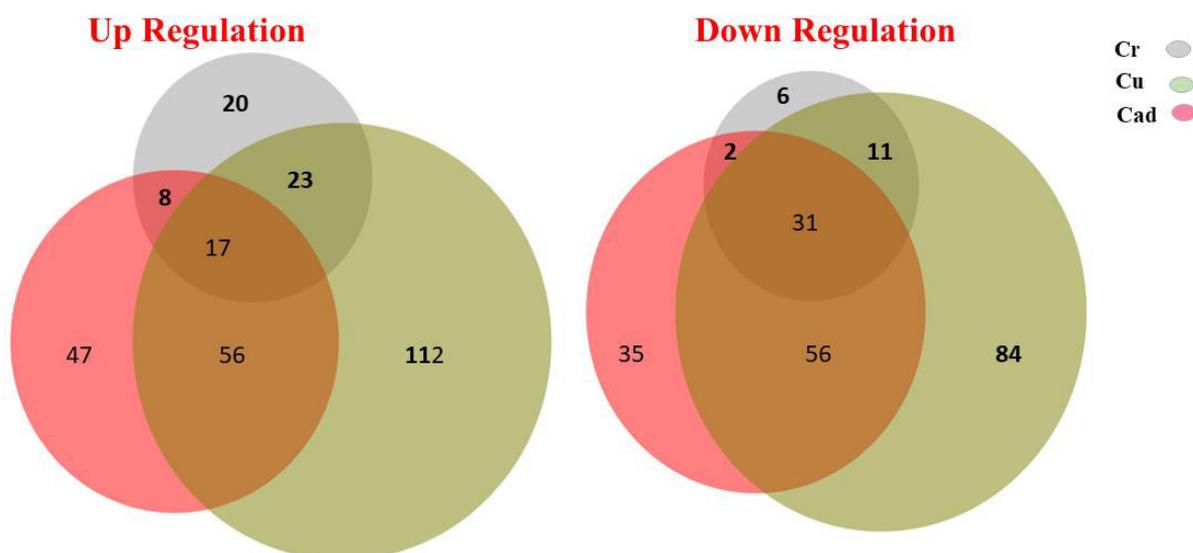


Figura 59: Representación en diagrama de Venn de la distribución de las proteínas que se sobreexpresan (Up-regulated) y proteínas que disminuyen su expresión (Down-regulated), encontradas bajo tratamiento con tres metales: Cromo, Cadmio y Cobre.

VI. DISCUSIÓN

Comportamiento en diferentes pH

En relación al pH evaluado de las muestras de tierra y agua del lago Pacococha, todas presentaron acidez, en un rango de pH comprendido entre 2,13 y 5,25, lo cual demostró que el lago Pacococha, está contaminando con efluentes mineros y aguas ácidas. Al cultivarse las muestras en caldo YPG, en un rango de pH, de 2.0 a 6.0, se determinó que ninguna de las 12 muestras creció en caldo YPG a pH 2.0. La mayoría crecieron a pH 3.0 y todas crecieron de pH 4.0 hasta pH 6.0. Las otras muestras tomadas de las lagunas contaminadas con relaves mineros de la cabecera de la cuenca del río Rímac, Junín y Cerro de Pasco como Santa Catalina, Churuca, Yanamate, Quiulacocha y Milpo, entre otras, de zonas altoandinas de la región central del Perú, también presentaron pH ácido, excepto las lagunas de Milpo y Huarón que estaban tratadas con carbonato de calcio y otros químicos utilizadas para neutralizar relaves ácidos, por lo cual el pH de estas estaba cercano al neutro. De 27 lagunas evaluadas en tres monitoreos de campo realizados en la región central de Perú, por lo menos 8 lagunas presentaron acidez en un rango de 2.49 a 5.69. La relavera de la minera Huarón tuvo valores de pH de 7.48 y 7.92 en los dos puntos muestreados, por el tratamiento alcalino neutralizante que se da a los efluentes mineros ácidos, al igual que los relaves de la minera Milpo (pH 6.82 y 7.14). Estos resultados se corroboran con los análisis de laboratorio que se realizaron en el Instituto de Corrosión y Protección de la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP), en la cual los valores de calcio encontrados en estas muestras presentan valores muy altos entre 100 y 800 ppm (Anexo 8).

Las levaduras aisladas de lagunas contaminadas con aguas ácidas de la región central presentaron buen crecimiento en medio YPG a pH 3,5 (Tablas 12, 13 y 14). En un estudio realizado por Carro y col., (2010) obtuvieron similares resultados al cultivar una cepa seleccionada de *Cryptococcus neoformans*, bajo diferentes rangos de pH, entre 2.0 a 7.0, obteniendo el mejor crecimiento a pH ácidos, cerca de 3.0. La misma cepa también creció a pH cercanos a 7.0. Acosta *et al.* (2005), determinaron que el hongo *Helminthosporium* sp tuvo mejor crecimiento a pH 4.0, estos resultados también coinciden con los resultados de nuestras levaduras nativas aisladas.

Resistencia a metales pesados

Las cepas de levaduras aisladas de la laguna Pacococha fueron enfrentadas a varios iones con la finalidad de evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI), se trabajaron con los iones metálicos: Cr^{+6} , Zn^{+2} , Hg^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} , Pb^{+2} , Ba^{+2} , Cu^{+2} y Va^{+2} . Según los resultados analizados los metales que más afectaron el crecimiento de las levaduras fueron los iones Hg^{+2} , Co^{+2} y Cr^{+6} . La cepa AMP6 fue la que mejor se adaptó a altas concentraciones del ión Co^{+2} 270 ppm y las cepas más sensibles fueron la AMP3, AMP4 AMP5 y TMP7, solamente crecieron hasta 100 ppm; siendo el ión Co^{+2} un oligoelemento que forma parte de la vitamina B12, a concentraciones altas superiores a las 100 ppm, inhibieron el crecimiento de las otras levaduras. El exceso de metales, aun siendo esenciales, en concentraciones altas son tóxicos, tanto para los organismos eucariotas como procariotas (Hodson, 2004). El zinc es un elemento esencial para muchas proteínas, los tratamientos con el ion Zn^{+2} en un grupo de levaduras, dieron mejores resultados, crecieron a concentraciones más altas, en comparación con el ión Co^{+2} . La CMI para la mayoría de levaduras evaluadas con el ion Zn^{+2} superaron los 400 ppm. El metal más tóxico para las levaduras fue el ión Hg^{+2} , la CMI de la cepa AMP6 con este metal fue de 100 ppm, otras cepas solo crecieron hasta 80 ppm. El ión Cr^{+6} es otro metal tóxico, no esencial para los organismos, inhibió el crecimiento de las levaduras en concentraciones bajas, pero superiores al cobalto y al mercurio. En la mayoría de las cepas su CMI frente al ion Cr^{+6} fueron hasta 300 ppm; Frumkin et al., 2001; Fu et al., 2010; Wang & Chen, (2006a), realizaron estudios de resistencia con *Cryptococcus neoformans* frente a siete metales pesados (Pb, Zn, Co, Hg, Cr, Cd, y As), encontrándose que esta levadura era más resistente a Pb (2000 ppm), Zn (1000 ppm), pero mayor sensibilidad a As, Cd, Cr y Hg (100, 150, 250 y 50 ppm). Nuestras levaduras, en algunos metales la CMI fue menor (Pb^{+2} y Zn^{+2}) y en otros la CMI fueron mayores como el caso del Cr^{+6} y Hg^{+2} .

Ensayo de Citotoxicidad-Concentración Letal Media (CL₅₀)

Se evaluaron la CL₅₀ con dos cepas AMJ3 Y AMJ6, aisladas y seleccionadas de Pasco, en caldo YPG con iones metálicos Cr^{+6} , Cd^{+2} , Cu^{+2} y Hg^{+2} , los resultados se muestran en las Figuras 48 y 49. Los estudios de citotoxicidad frente a los cuatro metales, muestran que la Concentración Letal Media (CL₅₀) con nuestras levaduras nativas, para los iones Hg^{+2} y Cr^{+6} son cercanos a los reportados por Jin et al. (2008), ellos determinaron que el valor de CL₅₀ para el ión Hg^{+2} fue de 0.05 mM y con el ión Cr^{+6} de 0.9 mM en *Sacharomyces cerevisiae* (cepa mutante). En el presente estudio el valor de CL₅₀ para la cepa *Yarrowia lipolytica* (AMJ6) fue alrededor de 0.05 mM para el ión Hg^{+2} y de 0.53 mM para el ión Cr^{+6} , la CL₅₀

para este último metal fue inferior, a la reportada por Jin et al. (2008). Asimismo, la CL₅₀ de la cepa AMJ6, para el ión Cu⁺², fue aproximadamente de 90 ppm (1.42 mM) y para el ión Cd⁺² fue de 55 ppm (0.49 mM). La cepa *Y. lipolytica* AMJ3 presentó una CL₅₀ para el ión Hg⁺² cercana a 7.5 ppm (0.04 mM), y para el ión Cr⁺⁶ fue alrededor de 12.5 ppm (0.12 mM), CL₅₀ inferior a la reportada para este metal por Jin et al. (2008). La CL₅₀ de la cepa AMJ3 para el ión Cd⁺² fue cercana a los 60 ppm (0.54 mM) y 85 ppm (1.34 mM) para el Cu⁺². Jin et al. (2008) reporta el valor de CL₅₀ para el Cu⁺² de 7 mM en *S. cerevisiae* (cepa mutante), aproximadamente 5 veces más resistente que la cepa AMJ6. Sucede lo contrario con el ión Cd⁺² con la cepa mutante, la CL₅₀ equivalente a 0.03 mM, fue mucho menor. Las cepas estudiadas en el presente estudio presentan CL₅₀ mayores para el ión Cd⁺², 0.49 mM para la cepa AMJ6 y 0.54 mM para la cepa AMJ3, superiores a la cepa de Jin. La posible causa de la diferencia en la CL₅₀ de nuestras cepas con la cepa mutante estudiada, fue la modificación de su genoma, al incorporarles los genes *kanMX* (resistencia a Kanamicina), *ADE2* (enzima que cataliza la biosíntesis de nucleótidos de purina) y *MET15* (enzima que cataliza la biosíntesis de metionina). Al parecer los genes incorporados a *S. cerevisiae* (cepa mutante), para estudios de expresión, influyen de forma directa o indirecta en las rutas metabólicas de resistencia frente a los metales Cu⁺² y Cr⁺⁶, lo que las hace más resistentes, excepto para el Cd⁺² y Hg⁺², son más sensibles.

Los resultados de la CL₅₀ de nuestras cepas AMJ3 y AMJ6 (*Y. lipolytica*) son mejores a los obtenidos por Mesquita et al. (2015), al enfrentar una cepa de *Pichia kudriavzevii* a múltiples metales entre ellos Cd⁺², a una concentración de 0.045 mM por 6 h, produjo una reducción notable de células viables, en más del 50% con respecto a la población inicial. Por otra parte, Hosiner et al. (2014), reporta que una concentración de 0.01 mM de Cd⁺² resultó tóxica en más del 50% de la población para su levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae*, en una exposición por 12 h. Los resultados de CL₅₀ obtenidos en nuestras cepas (AMJ3 y AMJ6), presentan valores de CL₅₀ cercanos y mayores para algunos metales como Cd⁺² y Hg⁺², comparados con la cepa *S. cerevisiae* de Hosiner y Jin, así mismo con la cepa *P. kudriavzevii* de Mesquita. La CL₅₀ en nuestras cepas, fue realizada para hacer estudios posteriores de biosorción de metales pesados con las cepas (AMJ6 y AMJ3). Asimismo, para hacer estudios de expresión diferencial de proteínas en condiciones de estrés, frente a iones Cu⁺², Cd⁺² y Cr⁺⁶ con *Y. lipolytica* (AMJ6).

Los resultados de la CL₅₀ para cobre en nuestra levadura *Y. lipolytica* AMJ6 fue de 1.42 mM (90 ppm). Al tratarse de una levadura de origen ambiental, los patrones de resistencia son

diferentes al compararlas con levaduras de otras especies; Soares et al., (2003) obtuvieron patrones de resistencia en *S. cerevisiae* para el cobre con CL₅₀ entre 0.047-0.057 mM; (Codina et al., 1993) también obtuvieron la CL₅₀ para levadura de panadería *S. cerevisiae*, presentando una CL₅₀ entre 0.43-0.462 mM con cobre. Nuestra levadura *Y. lipolytica* AMJ6 muestra un alto perfil de resistencia con una CL₅₀ de 1.42 mM al ion Cu⁺², nuestra levadura fue aislada de muestras de aguas contaminadas por relaves mineros, procedente de la relavera Yanamate de la sierra Pasco. Las levaduras de origen ambiental tienden a ser más resistentes a metales pesados, incluso más resistentes que otros microorganismos como las bacterias. Esto se debe a que las levaduras pueden adaptarse a diferentes condiciones ambientales, por ejemplo, a condiciones extremas de pH, bajas temperaturas, disponibilidad de nutrientes, así como también a altas concentraciones de metales pesados (Anand et al., 2006). No hay evidencia de aislados de *Y. lipolytica* de relaves mineros ni mucho menos de zonas altoandinas. Este es el primer estudio de aislamientos y caracterización de esta cepa en estos ambientes.

Es conocido en la literatura científica que ciertos microorganismos utilizan los iones metálicos como parte de su metabolismo celular, y también son usados para la eliminación de metales pesados presentes en el ambiente, como los hongos (Farhan & Khadom, 2015; Ferdous et al., 2016; Infante et al., 2014). Los hongos juegan un papel muy importante en el ecosistema; uno de ellos como grandes recicladores (Kendrick, 2001), usados también en la biotecnología para la producción de antibióticos y otros metabolitos de uso comercial. En nuestra investigación, hemos aislado levaduras autóctonas de zonas altoandinas, de relaves mineros y aguas contaminadas con relaves, las cuales fueron cultivadas en laboratorio a baja temperatura, todas fueron identificadas y accesadas al NCBI del Gen Bank. Una de estas levaduras evaluadas para estudios de proteínas fue *Y. lipolytica* cepa AMJ6 identificada mediante biología molecular con una identidad de 100% como se muestra en la figura 42 y Tabla 33. Esta especie ha sido estudiada y usada en biotecnología debido a sus productos secretados como las lipasas (Zieniuk & Fabiszewska, 2018). En condiciones de laboratorio, nuestra cepa de *Y. lipolytica* AMJ6, presenta una fase de crecimiento similar a otras aisladas de ambientes marinos (Bankar et al., 2018) con una fase exponencial entre las 30 y 42 horas (Figura 46).

Biosorción de metales

Los resultados de biosorción de iones cromo (Cr^{+6}) y cobre (Cu^{+2}) con *Yarrowia lipolytica* AMJ3 y AMJ6 fueron buenos. La cepa AMJ3 se enfrentó a una concentración de 0.144 mM (15ppm) del ión Cr^{+6} con una biosorción promedio de 42% a las 72 h. La cepa AMJ6 logró menores resultados de biosorción de Cr^{+6} , pero a una concentración mayor del ión Cr^{+6} 0.481 mM (50ppm), con 39% de biosorción entre las 48 a 72 h. Por otra parte, se evidenciaron que ambas cepas presentaron alto porcentaje de biosorción del ion Cu^{+2} a una concentración de 1.26 mM (80 ppm). La mejor biosorción promedio fue de 91.90% con la cepa AMJ6, y 89.69% con la cepa AMJ3, en tiempos similares. Dil et al. (2017), realizaron un trabajo acerca de la optimización de parámetros con células vivas de *Yarrowia lipolytica* 70562 bajo la metodología de superficie de respuesta (diseño compuesto central) para la biosorción de los iones Hg^{2+} , Pb^{2+} y Cu^{2+} a 18, 22 y 25 mg/L (ppm) respectivamente, reportaron 99.74 % de eficiencia de biosorción a Cu^{+2} a pH 6.4, 25 °C y tiempo de contacto de 8.1 h. Si bien este resultado es superior para el Cu^{+2} al obtenido con nuestras cepas *Y. lipolytica* (AMJ3 y AMJ6). Sin embargo, es importante indicar que las nuestras se enfrentaron a una concentración del ión Cu^{+2} mayor (80 mg/L), a la reportada por Dil (25 mg/L).

Sun et al. (2015), realizaron estudios de biosorción de Cu^{+2} a 0.5 mM (32ppm) en Medio Sintético Modelo (MSM), con tres cepas de *S. cerevisiae* comerciales, de las cuales la cepa AWR1R2 demostró una biosorción de 67.37 %, a 28 °C y 120 rpm. En dicho estudio se realizó microscopia electrónica diferencial y análisis de mediante la técnica de espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP-AES), llegando a la conclusión que la adsorción superficial domina el proceso de biosorción de Cu^{+2} . Los resultados de biosorción de Sun et al. (2015) son menores a los obtenidos en nuestro estudio (89%), a pesar de que sus experimentos fueron realizados con concentraciones menores de Cu^{+2} , 0.5 mM (32 mg/L). Además, los autores mencionados trabajaron con cepas nativas aisladas del mosto de uva de bebidas fermentables, mientras que nuestros estudios fueron realizados con levaduras provenientes de ambientes mineros. Por otro lado, Rehman et al. (2007) realizaron estudios de tolerancia y biosorción de Cu^{+2} a una concentración de 100 ppm por *Candida tropicalis*, esta cepa presentó una eficiencia de biosorción de 82 % a las 96 h. El porcentaje de biosorción en dicho estudio fue cercano al obtenido con nuestras cepas *Y. lipolytica* AMJ3 (84%) y *Yarrowia lipolytica* AMJ6 (89%). En otro reporte (Rehman et al., 2008), realizaron la biosorción de Cu^{+2} a menor concentración 0.1 ppm a pH 8.0 con

Loddermyces elongisporus, observando 81% de biosorción después de 96 h a 30 °C. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en el presente trabajo, sin embargo, la concentración utilizada de Cu^{+2} fue mayor (80 ppm).

Ksheminska *et al.* (2003) y Silóniz *et al.* (2002) trabajaron con biomasa viva para evaluar la biosorción de Cr y Cu. Ksheminska *et al.* (2003) cultivaron cepas de *Pichia guilliermondii* frente al cromo en concentraciones de 2.0 – 9.0 mM de Cr^{+3} y, 0.3 – 0.5 mM de Cr^{+6} . Las cepas presentaron la capacidad de bioadsorción de Cr^{+3} de 1.2 - 10 mg/g de peso seco, y de Cr^{+6} , 0.4 - 0.9 mg/g peso seco, siendo mayor la bioadsorción con el Cr^{+3} . Asimismo, Silóniz *et al.* (2002) cultivaron *P. guilliermondii* por 72 h a 28 °C, inmovilizaron células con alginato de calcio y polifenoles; las levaduras que previamente se adaptaron al metal, se denominaron “adaptadas” y las células que no fueron enfrentadas “no adaptadas”; las levaduras muertas como “no viables”. Fue evaluada la capacidad de bioadsorción del ión Cu^{+2} a diferentes concentraciones 0 a 317 mg/L, en un medio K modificado por el autor, Silóniz *et al.* (2002), reportan que las células viables adaptadas de *P. guilliermondii*, tienen una capacidad de biosorción de Cu^{+2} , de 20 mg Cu por g de biomasa, en una solución de 200-300 mg Cu/L; mientras que las células no adaptadas presentaron aproximadamente una biosorción de 10 mg de Cu^{+2} por g de biomasa. Los resultados reportados por ambos autores, difieren de los obtenidos en nuestro estudio; las mediciones de los metales por biosorción fueron diferentes. Ksheminska *et al.* (2003) y Silóniz *et al.* (2002), midieron los metales en la biomasa obtenida (peso seco) después de enfrentarse con el metal problema. En nuestro estudio el metal se cuantificó en la solución soluble de los sobrenadantes de los cultivos (biomasa viva) con metales, después del lavado de los pellets. Así mismo los resultados de biosorción de cobre obtenidos, son superiores a los de Dönmez & Aksu (2001), quienes evaluaron la biosorción del ion Cu^{+2} en medio YPG, a pH 4.0 con *Candida sp.* no adaptada y adaptada. Observaron una biosorción de 52.1% a una concentración de 92.2 ppm (no adaptada) y de 67.6 % a una concentración de 97.6 ppm (adaptada) en exposición de 8 días.

Por otro lado (Bankar *et al.*, 2018) reporta en sus estudios de bioadsorción del ión Cr^{+6} en una solución de 50 ppm, con biomasa de *Y. lipolytica*, en condiciones de pH 1, 35 °C y 130 rpm de agitación. La eficiencia máxima de bioadsorción (proceso pasivo fisicoquímico) con biomasa muerta, fue de 95.84 % alrededor de las 2 h de exposición al metal. En nuestro estudio obtuvimos el 39% de biosorción con *Y. lipolytica* AMJ6, en la misma concentración del ión Cr^{+6} , y de 42% de biosorción con la cepa AMJ3 en una concentración de 15 ppm. Las

condiciones de trabajo fueron diferentes, nosotros trabajamos en cultivos en caldo YPG (biomasa viva). En otro estudio Acosta *et al.* (2005), reportaron la bioadsorción de Cr^{+6} en solución acuosa de 0.2 ppm (0.004 mM) por biomasa muerta de *Cryptococcus neoformans* y *Helminthosporium* sp. La biomasa de *C. neoformans* fue más eficiente en la remoción de Cr^{+6} (98%) que *Helminthosporium* sp (65%). Los porcentajes fueron calculados en los sobrenadantes, condiciones similares a las empleadas en nuestro estudio. Nuestros resultados fueron mejores a los de Acosta, nosotros trabajamos a concentraciones mas altas con el ión Cr^{+6} 50 ppm (0.96 mM) con la cepa AMJ6, llegando a una biosorción de 39%, en cultivos de 72 h; con la cepa AMJ3 se obtuvo una biosorción promedio de 42%, en cultivos con 15 ppm del ión Cr^{+6} , ambas concentraciones fueron superiores al de Acosta *et al.* (2005).

Expresión de proteínas por metales pesados

Los resultados proteómicos en *Yarrowia lipolytica* AMJ6, identificaron un número menor de proteínas reguladas bajo el tratamiento con cromo, 118 proteínas reguladas, para este metal, frente al control (562 proteínas no reguladas). Se observó disminución en la tasa de crecimiento, en relación al ión cobre. En *S. cerevisiae* sod1Delta defectuoso para el Cu, Zn-superóxido dismutasa fue hipersensible a la toxicidad por Cr^{+6} en condiciones aeróbicas y que ciertas enzimas glicolíticas y proteínas de shock térmico como las HSP sufrieron daño específicamente por la acción oxidativa dependiente de cromo (Sumner et al., 2005). En nuestro estudio encontramos regulación negativa (Down-regulated) para la proteína superóxido dismutasa SDS, con una Media log2 Cromo/Control = -1,161 bajo el tratamiento con ión Cr^{+6} , la transcetolasa en -1,354, la isocitrato deshidrogenasa en -0,813, la malato deshidrogenasa en -0,866, la fructosa-1,6-bisfosfatasa en -0,957, entre otras proteínas (Anexo 2). Las enzimas en em mención en condiciones de estrés con el ión Cr^{+6} tienen una regulación negativa (Down-regulated). Por otro lado, en las proteínas de regulación positiva (Up-regulated), se evidenciaron la histona H4 en +1,31, la Aldo/ceto reductasa en +0,993, la peptidasa en +0,962 y la proteína de elongación factor 1-alpha en +0,658, dentro de las reguladas con valor $q < 0.01$. Otra proteína de regulación positiva fue la proteína de shock térmico (HSP) en +0,374. Estos resultados difieren del análisis de expresión de proteínas realizado por Sumner et al., 2005. El balance del análisis de la expresión de proteínas con este metal indica que muchas proteínas involucradas en el estrés oxidativo, tienen una regulación negativa (Down-regulated) en 8 % y otras proteínas involucradas en el estrés oxidativo tienen una regulación positiva (UP-regulated) en un 11.76% (Fig. 56). Estos resultados indican que el ión Cr^{+6} tiene un mayor efecto tóxico y provocaría daño oxidativo

en las células. El análisis de proteínas únicas, reguladas bajo este tratamiento con ión Cr^{+6} , encontramos 26 proteínas como se muestra en la Figura 59.

Metales pesados como el cadmio se generan por la contaminación minera entre otras actividades industriales y es un problema para el ambiente. Bajo el tratamiento con cadmio, encontramos 252 proteínas reguladas (Up and Down) con relación al control (384 no reguladas). En Asia fue estudiada la contaminación por metales pesados en mineras abandonadas, encontrando altas cantidades de metales pesados en los relaves, entre ellos el cadmio (Jung, 2008), y el mismo metal en otros estudios en América e incluso en el mismo Perú (Schneider et al., 2007), estos metales pesados encontrados en ríos, lagos o en el suelo producto de la contaminación antrópica resultan en un gran problema de salud pública. En diferentes trabajos de investigación se han aislado hongos de relaveras mineras encontrando especies como *Fomitopsis meliae*, *Trichoderma ghanense* y *Rhizopus microsporus* tolerantes a metales pesados como cadmio, cobre, plomo, arsénico y hierro (Oladipo et al., 2018). En nuestro estudio, también encontramos hongos filamentosos y levaduriformes aislados de relaveras altoandinas tolerantes a metales pesados, entre ellos el cadmio. En la Figura 55, se muestra que el ión Cd^{+2} a diferencia del ión Cr^{+6} , presenta muchas más proteínas reguladas con un total de 252 proteínas. Lo que nos indica que *Y. lipolytica* es más tolerante al ion Cd^{+2} ; las proteínas de regulación negativa (Down-regulated) encontramos a: proteína putativa dedo de zinc en -3.053, la fructosa-1,6-bisphosphatasa en -1.505, la transcetolasa en -1.494, la proteína con factor 2 de transporte nuclear en -1.22, entre otras proteínas de regulación negativa, con un valor $q < 0.01$. En las proteínas de regulación positiva (Up-regulated) encontramos: malato deshidrogenasa en +1,647, glucósido hidrolasa +1,528, fosfoglicerato mutasa +1,426, transaldolasa +1,254, con un valor $q < 0.01$, muchas más que las reguladas con el ión Cr^{+6} (Anexo 4).

En otros estudios realizados en relaves mineros, aislaron hongos como *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces sp.*, *Trichoderma sp.*, *Microsporum sp.*, *Cladosporium sp.* con una alta tolerancia a cadmio, los estudios fueron reportados en Irán, con un CMI de (1000–4000 mg/L) (Mohammadian Fazli et al., 2015). Nosotros aislamos de relaveras de Perú: *Penicillium sp.*, *Mucor racemosus*, *Trichoderma koningiopsis*, *Trichoderma asperellum*, *Acidotherix acidophila*, *Galactomyces candidum*, *Geotrichum sp.* (Arrieta & Sánchez, 2019), y levaduras como: *Yarrowia lipolytica*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Coniochaeta fodinicola*, *Cystobasidium sp.* o *Pucciniomycotina*, *Rhodotorula mucilaginosa*,

Pichia fermentans (Macedo & Sánchez, 2018). En el tratamiento con cadmio, en relación al metabolismo general de proteínas, cerca de la mitad de proteínas tuvieron regulación negativa (down-regulated) en 12.10%, en comparación a la regulación positiva (UP-regulated) 21.09%. Las proteínas de respuesta al estrés oxidativo tuvieron una regulación positiva del 10.16% y una regulación negativa de 6.45%, ligeramente menor a las expresadas con el ión Cr^{+6} (figura 57). En análisis de proteínas únicas reguladas bajo este tratamiento con ión Cd^{+2} encontramos 82 proteínas, una de las proteínas fue la chaperona DnaK, encontraba únicamente bajo el tratamiento con cadmio con una expresión positiva de +0,344, cuya función es múltiple siendo una de ellas de evitar la agregación de proteínas y mal ensamblado.

En nuestros resultados encontramos un número mayor de proteínas reguladas de 390 (Up and Down) en comparación con las proteínas no reguladas 207 (Anexo 7). Se sabe que los compuestos que contienen cobre son usados como agentes antimicrobianos. Esto se debe a la capacidad reductora del cobre, que puede reducir el oxígeno a superóxido o peróxido de hidrógeno, ambas pertenecen a las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Rong-Mullins et al., 2017; Sutton & Winterbourn, 1989). El análisis proteómico en la levadura *Y. lipolytica* AMJ6 (Anexo 5) mostró la sobreexpresión o expresión positiva (UP-regulated) de diversas proteínas que responden al estrés oxidativo y con actividad oxidorreductora (Anexo 6). La sobreexpresión de la glutatión peroxidasa (ID: Q6C7A8) y el superóxido dismutasa (ID: Q6C662), ambas proteínas permiten tolerar el estrés oxidativo por cobre; también han sido observadas tanto en la levadura de *C. albicans* (Miramón et al., 2014) y en *S. cerevisiae* (Gross et al., 2000), respectivamente. Debemos tener en cuenta que el ión cobre es necesario, para que los diversos complejos citocromo oxidasa se mantengan activos, ya que esto, permitiría que las levaduras tengan la capacidad de crecer en diversos medios de cultivo con fuentes de carbono no fermentables (Gross et al., 2000). En la levadura *Y. lipolytica* AMJ6, la expresión de diversos complejos citocromos oxidasa, como la expresión de diversas subunidades del citocromo C oxidasa y NADH-citocromo reductasa, fueron inducidos positivamente (UP-regulated) la expresión de estas proteínas, en presencia de cobre. En nuestros resultados también encontramos sobreexpresión de proteínas que participan en la síntesis de ATP y transporte de iones (H^+), pero tales resultados no muestran si estas proteínas podrían estar presentes en las mitocondrias o en las vacuolas. Además, se conoce que las subunidades del complejo H^+ -ATPasa vacuolar son organizadas de manera similar, a la estructura de la F1F0-ATPasa de las mitocondrias (Bowman et al., 1986).

En relación a la tolerancia del estrés por cobre, (Eide et al., 1993) demostraron que el complejo H⁺-ATPasa vacuolar de la *S. cerevisiae* participa en la desintoxicación celular por cobre, por tanto, es muy probable que la síntesis de ATP y transporte de iones (H⁺), en *Y. lipolytica* AMJ6, estén localizados en la membrana vacuolar. Los resultados muestran la expresión de proteínas (Anexo 6) que participan en el metabolismo de carbohidratos para la síntesis de la pared celular, también está relacionado a la resistencia de las levaduras a diversos metales pesados, en este caso el cobre. Estudios realizados Sun et al. (2015) reportan que la resistencia o tolerancia a diversas concentraciones del ión cobre, en *S. cerevisiae*, se debe a la bioadsorción del metal en la pared celular. Esta capacidad de biosorción de iones cobre a través de la pared celular también fue observada en varias especies de hongos miceliales, siendo esta la primera línea de defensa, ante la presencia excesiva de iones cobre. Esta capacidad de retener el metal no requiere gasto de energía (Cervantes & Gutierrez-Corona, 1994). Nuestros resultados en proteómica también están relacionados con otros trabajos proteómicos que estudiaron la tolerancia al estrés por cobre en levaduras aisladas de ambientes fríos. Kan et al. (2018) realizaron estudios de expresión de proteínas en la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* AN5 aislada del hielo marino del continente Antártico. Observaron la expresión de diferentes grupos de proteínas con funciones biológicas distintas, así como proteínas que participan en el metabolismo de carbohidratos y de energía, metabolismo de ácidos nucleicos y proteínas, plegamiento de proteínas, sistema antioxidante, sistema de señalización y, además, proteínas de función desconocida. La sobreexpresión de estos grupos de proteínas, no solo participan en la resistencia a la alta concentración del cobre, sino también a los demás metales pesados.

El número de proteínas únicas encontradas de regulación positiva (Up), en presencia de cromo fueron en número de 20, entre ellas la catalasa, proteína importante en el proceso de estrés oxidativo, ésta se ve alterada cuando son expuestas las células a metales, como lo reportan para hongos filamentoso Lazarova et al. (2014) y en levaduras, Arinbasarova et al. (2015), del mismo modo se sobreexpresan proteínas de shock térmico (HSP). Entre las proteínas comprometidas para el tratamiento de los tres metales encontramos proteínas, aquellas cuyas funciones están relacionadas con el estrés oxidativo como peroxiredoxina, thioredoxina reductasa y proteínas involucradas en el plegamiento de las HSP.

En tanto con el ion Cu⁺² cobre fueron encontradas 112 proteínas únicas (figura 59), mucho más, en comparación con los otros metales, lo que significaría que el cobre es menos tóxico,

en comparación a los otros dos metales evaluados (Cr^{+6} y Cd^{+2}) pudiendo encontrar un mayor número de proteínas clasificadas en las funciones descritas en el Anexo 6. Estudios realizados por Arinbasarova et al. (2015) menciona que el cobre es un elemento vital que puede llegar a extender la vida de las levaduras. En el análisis de las proteínas reguladas, con menor expresión (Down-regulated), se encontró 6 únicas proteínas para el metal cromo, 35 en cadmio y 84 en cobre. Las 31 proteínas comunes reguladas de menor expresión con los tres metales, estarían relacionadas al metabolismo de proteínas, carbohidratos y estrés oxidativo.

VII. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se aislaron y seleccionaron levaduras extremófilas de relaves mineros altoandinos, resistentes a metales pesados, fueron identificadas molecularmente alrededor de 48 cepas de levaduras, las cepas se accedieron al NCBI del Gen Bank. Se determinaron la CMI, la CL50 y biosorción de iones metálicos. La resistencia y la biosorción de iones zinc y cobre fueron los más altos, siendo menores para los iones cobalto, cromo y mercurio.
- Se determinó la regulación de la expresión de proteínas en *Yarrowia lipolytica* AMJ6, en condiciones normales y en estrés frente a iones Cu^{+2} , Cd^{+2} y Cr^{+6} . En el análisis proteómico realizado bajo el tratamiento con estos iones, se determinó que existe regulación positiva (Up) y negativa (Down), identificándose proteínas que participan en diferentes vías metabólicas, siendo las de mayor expresión, las que participan en el metabolismo global de proteínas y de carbohidratos, proteínas de respuesta al estrés oxidativo, síntesis de ATP y transporte de iones.
- En los tratamientos con iones Cr^{+6} y Cd^{+2} , la mayor sobreexpresión de proteínas estuvo relacionados al estrés oxidativo y metabolismo de carbohidratos. Se encontraron proteínas comunes y únicas reguladas bajo cada tratamiento, que estarían asociadas al metabolismo o como defensa y/o supervivencia a estos metales.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Se requiere continuar con el estudio de levaduras aisladas de cuerpos de agua altoandinos contaminados con relaves mineros, estos ambientes presentan condiciones extremas, como pH ácidos, altas concentraciones de metales pesados, temperaturas frías a heladas y altitudes por encima de los 4000 msnm, los reportes de estudios en levaduras de estos ambientes son mínimos, pero sus aplicaciones son provisorias.
2. En nuestros resultados de análisis de proteínas, no encontramos la metalotioneína CUP1 en la cepa *Yarrowia lipolytica* AMJ6, proteínas reportada en eucariotas y en otras cepas de levaduras de usos industriales como *Saccharomyces cereviceae* y *Schizosaccharomyces pombe*, estos resultados nos demostrarían que no todas las levaduras presentan metalotioneínas CUP1, por lo cual es importante continuar con la búsqueda de estas proteínas y /o genes en levaduras de estos ambientes.
3. Las levaduras tienen un potencial metabólico poco estudiado, sintetizan metabolitos de interés económico, como fármacos antitumorales, antibióticos, factores de crecimiento vegetal, enzimas degradadoras de colorantes cancerígenos, metabolitos frente al estrés hídrico y de nutrientes, entre otras propiedades.
4. Las levaduras, sirven como modelos biológicos en eucariotas, para estudiar el ciclo celular, son de fácil cultivo en ensayos relativamente rápidos y económicos. Los estudios realizados en levaduras como microorganismos de importancia biotecnológica y ambiental son escasos, por lo cual recomendamos continuar con esta línea de trabajo, las investigaciones en levaduras han estado dirigidos a la búsqueda de cepas con mayor capacidad de producir alcohol y para la producción de bebidas fermentadas.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abriata, L. A. (2013). Investigation of non-corrin cobalt (II)-containing sites in protein structures of the Protein Data Bank. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science, Crystal Engineering and Materials*, 69(2), 176-183.
- Acosta, I., Moctezuma-Zárata, M., Gutiérrez, C., & Rodríguez, X. (2005). Bioadsorción de Cromo (VI) en Solución Acuosa por la Biomasa Celular de *Cryptococcus neoformans* y *Helminthosporium* sp. *Información tecnológica*, 16(1), 11-15.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. doi:[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anand, P., Isar, J., Saran, S., & Saxena, R. K. (2006). Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology*, 97(8), 1018-1025.
- Aránguiz, F., Gaete, H., Hidalgo, M. E., & Lobos, G. (2009). Oxidative damage in the microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to receiving waters of a mining effluent in the Rio Blanco (V Region, Chile). *Química Nova*, 32(9), 2417-2422.
- Arinbasarova, A. Y., Biryukova, E., & Medentsev, A. (2015). Antistress systems of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied biochemistry and microbiology*, 51(2), 135-142.
- Arrieta Aquisé, L., & Sánchez Tito L. (2019). Biosorción de metales pesados por hongos filamentosos, aislados de cuerpos de agua altoandinos contaminados con relaves mineros de la sierra central del Perú.
- Atsdr, U. (1997). Agency for toxic substances and disease registry. *Case Studies in environmental medicine*. <http://www.atsdr.cdc.gov/HEC/CSEM/csem.html>.
- Bankar, A., Zinjarde, S., Shinde, M., Gopalghare, G., & Ravikumar, A. (2018). Heavy metal tolerance in marine strains of *Yarrowia lipolytica*. *Extremophiles*, 22(4), 617-628.
- Barceloux, D. G., & Barceloux, D. (1999). Copper. *Journal of toxicology: clinical Toxicology*, 37(2), 217-230.
- Bertin, G., & Averbeck, D. (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, 88(11), 1549-1559.
- Bondarenko, O., Rõlova, T., Kahru, A., & Ivask, A. (2008). Bioavailability of Cd, Zn and Hg in soil to nine recombinant luminescent metal sensor bacteria. *Sensors*, 8(11), 6899-6923.
- Bowman, E. J., Mandala, S., Taiz, L., & Bowman, B. J. (1986). Structural studies of the vacuolar membrane ATPase from *Neurospora crassa* and comparison with the tonoplast membrane ATPase from *Zea mays*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(1), 48-52. doi:10.1073/pnas.83.1.48
- Brar, S. K., Verma, M., Surampalli, R., Misra, K., Tyagi, R., Meunier, N., & Blais, J. (2006). Bioremediation of hazardous wastes—a review. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, 10(2), 59-72.
- Bréant, D., Jézéquel, K., & Lebeau, T. (2002). Optimisation of the cell release from immobilised cells of *Bacillus simplex* cultivated in culture media enriched with Cd 2+: influence of Cd 2+, inoculum size, culture medium and alginate beads characteristics. *Biotechnology Letters*, 24(15), 1237-1241.
- Brown, A. C., & Hargreaves, J. J. (1999). Sulfated metal oxide catalysts. Superactivity through superacidity? *Green Chemistry*, 1(1), 17-20.
- Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 45(3), 198-207.
- Calace, N., Petronio, B. M., & Pietroletti, M. (2006). Metal bioavailability: how does its significance change in the time? *Annali di Chimica: Journal of Analytical, Environmental and Cultural Heritage Chemistry*, 96(3-4), 131-136.

- Carro, L., Anagnostopoulos, V., Lodeiro, P., Barriada, J. L., Herrero, R., & de Vicente, M. E. S. (2010). A dynamic proof of mercury elimination from solution through a combined sorption–reduction process. *Bioresource technology*, *101*(23), 8969-8974.
- Casamorin, J. A., Bennett, R., & Dedeles, G. (2014). Biosorption of Cd (II) by Yeasts from Ripe Fruit Peels in the Philippines. *Journal of Health Pollution*, *4*(7), 14-24.
- Cervantes, C., & Gutierrez-Corona, F. (1994). Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, *14*(2), 121-137. doi:10.1111/j.1574-6976.1994.tb00083.x
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G., & Thompson, J. D. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic acids research*, *31*(13), 3497-3500.
- Clarkson, T. W. (1997). The toxicology of mercury. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, *34*(4), 369-403.
- Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, *88*(11), 1707-1719.
- Cobbett, C. S. (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant physiology*, *123*(3), 825-832.
- Codina, J., Perez-Garcia, A., Romero, P., & De Vicente, A. (1993). A comparison of microbial bioassays for the detection of metal toxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *25*(2), 250-254.
- Cousins, R. J. (1985). Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiological reviews*, *65*(2), 238-309.
- Coyle, P., Philcox, J., Carey, L., & Rofe, A. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *59*(4), 627-647.
- Crinnion, W. J. (2000). Environmental medicine, part three: long-term effects of chronic low-dose mercury exposure. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, *5*(3), 209-223.
- Crist, R. H., Oberholser, K., Shank, N., & Nguyen, M. (1981). Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. *Environmental Science & Technology*, *15*(10), 1212-1217.
- Cuberos, E., Rodriguez, A. I., & Prieto, E. (2009). Niveles de cromo y alteraciones de salud en una población expuesta a las actividades de curtiembres en Bogotá, Colombia. *Revista de Salud Pública*, *11*, 278-289.
- Davis, R. H. (1986). Compartmental and regulatory mechanisms in the arginine pathways of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews*, *50*(3), 280.
- De Silóniz, M. a.-I., Balsalobre, L., Alba, C., Valderrama, M. a.-J., & Peinado, J. M. (2002). Feasibility of copper uptake by the yeast *Pichia guilliermondii* isolated from sewage sludge. *Research in microbiology*, *153*(3), 173-180.
- Dil, E. A., Ghaedi, M., & Asfaram, A. (2017). The performance of nanorods material as adsorbent for removal of azo dyes and heavy metal ions: application of ultrasound wave, optimization and modeling. *Ultrasonics Sonochemistry*, *34*, 792-802.
- Dönmez, G., & Aksu, Z. (2001). Bioaccumulation of copper (II) and nickel (II) by the non-adapted and adapted growing *Candida* sp. *Water Research*, *35*(6), 1425-1434.
- Donnellan, N., Rollan, A., McHale, L., & McHale, A. (1995). The effect of electric field stimulation on the biosorption of uranium by non-living biomass derived from *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Biotechnology letters*, *17*(4), 439-442.
- Dorsey, A., & Ingerman, L. (2004). Toxicological profile for copper.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, *12*(13), 39-40.
- Eide, D. J., Bridgham, J. T., Zhao, Z., & Mattoon, J. R. (1993). The vacuolar H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient copper detoxification, mitochondrial function, and iron metabolism. *Molecular and General Genetics MGG*, *241*(3-4), 447-456.
- Emsley, J. (2003). Nature's Building Blocks, An AZ guide to elements. Popular sciences: Oxford.

- Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K., & Wood, W. (2007). Framework for metals risk assessment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 68(2), 145-227.
- Farhan, S. N., & Khadom, A. A. (2015). Biosorption of heavy metals from aqueous solutions by *Saccharomyces Cerevisiae*. *International Journal of Industrial Chemistry*, 6(2), 119-130. doi:10.1007/s40090-015-0038-8
- Faroon, O., Ashizawa, A., Wright, S., Tucker, P., Jenkins, K., Ingerman, L., & Rudisill, C. (2012). Toxicological profile for cadmium.
- Ferdous, A., Maisha, N., Sultana, N., & Ahmed, S. (2016). Removal of heavy metal from industrial effluents using Baker's yeast. *AIP Conference Proceedings*, 1754(1), 060011. doi:10.1063/1.4958452
- Fic, E., Kedracka-Krok, S., Jankowska, U., Pirog, A., & Dziedzicka-Wasylewska, M. (2010). Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis. *Electrophoresis*, 31(21), 3573-3579.
- Frumkin, H., Jacobson, A., Gansler, T., & Thun, M. J. (2001). Cellular phones and risk of brain tumors. *CA: a cancer journal for clinicians*, 51(2), 137-141.
- Fu, Q., Li, W.-X., Yao, Y., Liu, H., Su, H.-Y., Ma, D., . . . Zhang, H. (2010). Interface-confined ferrous centers for catalytic oxidation. *science*, 328(5982), 1141-1144.
- Gadd, G. (2009). Heavy metal pollutants: environmental and biotechnological aspects *Encyclopedia of microbiology* (pp. 321-334): Elsevier.
- Gadd, G. M. (1994). Interactions of fungi with toxic metals *The Genus Aspergillus* (pp. 361-374): Springer.
- Gadd, G. M. (2000). Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current opinion in biotechnology*, 11(3), 271-279.
- Gaete, H., Hidalgo, M., Neaman, A., & Ávila, G. (2010). Evaluación de la toxicidad de cobre en suelos a través de biomarcadores de estrés oxidativo en *Eisenia foetida*. *Quim. Nova*, 33(3), 566-570.
- Goyer, R. A. (1997). Toxic and essential metal interactions. *Annual review of nutrition*, 17(1), 37-50.
- Grill, E., Winnacker, E.-L., & Zenk, M. H. (1985). Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, 230(4726), 674-676.
- Gross, C., Kelleher, M., Iyer, V. R., Brown, P. O., & Winge, D. R. (2000). Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *Journal of Biological Chemistry*, 275(41), 32310-32316.
- Gutiérrez, J. C., Amaro, F., Diaz, S., De Francisco, P., Cubas, L., & Martín-Gonzalez, A. (2011). Ciliate metallothioneins: unique microbial eukaryotic heavy-metal-binder molecules. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 16(7), 1025.
- Gutiérrez, J. C., Amaro, F., & Martín-González, A. (2015). Heavy metal whole-cell biosensors using eukaryotic microorganisms: an updated critical review. *Frontiers in microbiology*, 6, 48.
- Gutiérrez Moreno, S. M. (2015). Estudio de la bioadsorción de cadmio y plomo con biomasa de *serratia marcescens* m8a-2t, a nivel de laboratorio.
- Gwaltney Jr, J. M. (2002). Clinical significance and pathogenesis of viral respiratory infections. *The American journal of medicine*, 112(6), 13-18.
- Hall, J. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of experimental botany*, 53(366), 1-11.
- Hall, T. A. (1999). *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Paper presented at the Nucleic acids symposium series.
- Haq, F., Mahoney, M., & Koropatnick, J. (2003). Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533(1-2), 211-226.

- Herrejón Figueroa, M. L., Limón Rodríguez, B., & Martínez Miranda, V. (2008). Cinética e isothermas de adsorción de Pb (II) en el suelo de Monterrey. *Ingenierías*, 11(41), 24-31.
- Hightower, L. E. (1993). A brief perspective on the heat-shock response and stress proteins. *Marine Environmental Research*, 35(1-2), IN1-83.
- Hodson, M. E. (2004). Heavy metals--geochemical bogey men? *Environ Pollut*, 129(3), 341-343. doi:10.1016/j.envpol.2003.11.003
- Hosiner, D., Gerber, S., Lichtenberg-Frate, H., Glaser, W., Schüller, C., & Klipp, E. (2014). Impact of acute metal stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS one*, 9(1), e83330.
- Huckle, J. W., Morby, A. P., Turner, J. S., & Robinson, N. J. (1993). Isolation of a prokaryotic metallothionein locus and analysis of transcriptional control by trace metal ions. *Molecular microbiology*, 7(2), 177-187.
- Hulsen, T., de Vlieg, J., & Alkema, W. (2008). BioVenn—a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC genomics*, 9(1), 488.
- Infante J, C., De Arco R, D., & Angulo M, E. (2014). Removal of lead, mercury and nickel using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista MVZ Córdoba*, 19, 4141-4149.
- Jianlong, W., Xinmin, Z., Decai, D., & Ding, Z. (2001). Bioadsorption of lead (II) from aqueous solution by fungal biomass of *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology*, 87(3), 273-277.
- Jin R., Dobry CJ., McCown PJ., & Kumar A. (2008) Large-scale analysis of yeast filamentous growth by systematic gene disruption and overexpression. *Mol Biol Cell* 19(1):284-96.
- Jung, M. C. (2008). Contamination by Cd, Cu, Pb, and Zn in mine wastes from abandoned metal mines classified as mineralization types in Korea. *Environmental geochemistry and health*, 30(3), 205-217.
- Junghans, K., & Straube, G. (1991). Biosorption of copper by yeasts. *Biology of metals*, 4(4), 233-237.
- Kagi, J. (1993). Evolution, structure and chemical activities of class 1 metallothioneins: An overview. *Metallothionein*, 29-55.
- Kägi, J. H. (1991). [69] Overview of metallothionein *Methods in enzymology* (Vol. 205, pp. 613-626): Elsevier.
- Kägi, J. H., & Vallee, B. L. (1960). Metallothionein: a cadmium-and zinc-containing protein from equine renal cortex. *Journal of Biological Chemistry*, 235(12), 3460-3465.
- Kendrick, B. (2001). Fungi: ecological importance and impact on humans. *e LS*.
- Kim, J.-M., Lim, J.-S., Kim, S.-H., & Hahn, S.-J. (2002). Process for the preparation of 3-isothiazolone mixture and composition comprising the mixture: Google Patents.
- Kirchman, P. A., & Botta, G. (2007). Copper supplementation increases yeast life span under conditions requiring respiratory metabolism. *Mechanisms of ageing and development*, 128(2), 187-195. doi:10.1016/j.mad.2006.10.003
- Kirova, G., Velkova, Z., & Gochev, V. (2012). Copper (II) removal by heat inactivated *Streptomyces fradiae* biomass: Surface chemistry characterization of the biosorbent. *J. BioSci. Biotech*, 77-82.
- Klaassen, C. D., & Liu, J. (1998). Induction of metallothionein as an adaptive mechanism affecting the magnitude and progression of toxicological injury. *Environmental Health Perspectives*, 106(suppl 1), 297-300.
- Klionsky, D., Herman, P. K., & Emr, S. (1990). The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 54(3), 266-292.
- Kneer, R., & Zenk, M. H. (1992). Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry*, 31(8), 2663-2667.

- Kondo, N., Isobe, M., Imai, K., Goto, T., Murasugi, A., & Hayashi, Y. (1983). Structure of cadystin, the unit-peptide of cadmium-binding peptides induced in a fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Tetrahedron Letters*, 24(9), 925-928.
- Li, Z., & Yuan, H. (2008). Responses of *Rhodotorula* sp. Y11 to cadmium. *Biometals*, 21(6), 613-621.
- Liu, J., Liu, Y., Michalska, A. E., Choo, K. A., & Klaassen, C. D. (1996). Distribution and retention of cadmium in metallothionein I and II null mice. *Toxicology and applied pharmacology*, 136(2), 260-268.
- Lluisaca, S. A., Burgos, F. A., & Vargas, J. D. (2011). Caracterización de Bacterias Metalofijadoras de Mercurio, A Través de la Subunidad 16srna, Mediante la Técnica de PCR-DGGE del Rio Gala (Aguas Abajo en el Recinto San Rafael) en la Parroquia Tenguel.
- Lloyd, J. R., & Lovley, D. R. (2001). Microbial detoxification of metals and radionuclides. *Current opinion in biotechnology*, 12(3), 248-253.
- Lovley, D. R. (2000a). *Environmental microbe-metal interactions*: ASM.
- Lovley, D. R. (2000b). Fe (III) and Mn (IV) reduction *Environmental microbe-metal interactions* (pp. 3-30): American Society of Microbiology.
- Macedo Prada, D., & Sánchez Tito L. (2018). Identificación de marcadores moleculares en levaduras extremófilas, aisladas de lagunas Altoandinas de la Sierra Central del Perú contaminadas con relaves. Tesis de pre grado UNMSM. Lima Perú.
- Mann, S., Sparks, N. H., & Board, R. G. (1990). Magnetotactic bacteria: microbiology, biomineralization, palaeomagnetism and biotechnology *Advances in microbial physiology* (Vol. 31, pp. 125-181): Elsevier.
- Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C. J., Lu, S., . . . Gonzales, N. R. (2016). CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic acids research*, 45(D1), D200-D203.
- Margoshes, M., & Vallee, B. L. (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society*, 79(17), 4813-4814.
- Méndez, S., Lara, J., Moreno, E., & Ayala, A. (2007). Estudio preliminar de los niveles de cadmio en arroz, frijoles y lentejas, distribuidos en supermercados de Bogotá y plazas de mercado de Manizales. *Fitotecnia Colombiana*, 7(2), 40-47.
- Mendoza, F. S. (2010). *DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO*.
- Mendum, M. L., Gupta, S. C., & Goldsbrough, P. B. (1990). Effect of glutathione on phytochelatin synthesis in tomato cells. *Plant physiology*, 93(2), 484-488.
- Miramón, P., Dunker, C., Kasper, L., Jacobsen, I. D., Barz, D., Kurzai, O., & Hube, B. (2014). A family of glutathione peroxidases contributes to oxidative stress resistance in *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 52(3), 223-239. doi:10.1093/mmy/myt021
- Mohammadian Fazli, M., Soleimani, N., Mehrasbi, M., Darabian, S., Mohammadi, J., & Ramazani, A. (2015). Highly cadmium tolerant fungi: their tolerance and removal potential. *Journal of environmental health science & engineering*, 13, 19-19. doi:10.1186/s40201-015-0176-0
- Moore, M. N., & Simpson, M. G. (1992). Molecular and cellular pathology in environmental impact assessment. *Aquatic Toxicology*, 22(4), 313-322.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853.
- Nava-Ruiz, C., & Méndez-Armenta, M. (2011). Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Archivos de Neurociencias*, 16(3), 140-147.
- Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Applied microbiology and biotechnology*, 51(6), 730-750.
- Oetiker, N., Norambuena, R., Martínez-Bussenius, C., Navarro, C., Amaya, F., Álvarez, S., . . . Jerez, C. (2018). Possible role of envelope components in the extreme copper resistance of the biomining *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Genes*, 9(7), 347.

- Oladipo, O. G., Awotoye, O. O., Olayinka, A., Bezuidenhout, C. C., & Maboeta, M. S. (2018). Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 29-37.
- Orbegozo, J., Abanto, M., García, R., & Ramírez, P. (2008). Identificación molecular de *Pichia guilliermondii* aislada de aguas ácidas de minas en el Perú y su resistencia a metales pesados. *Revista peruana de biología*, 15(1), 91-95.
- Palmiter, R. D. (1998). The elusive function of metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15), 8428-8430.
- Penkowa, M., & Hidalgo, J. (2000). Retracted: Metallothionein I+ II expression and their role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia*, 32(3), 247-263.
- Pickett, C. B., & Lu, A. Y. (1989). Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annual review of biochemistry*, 58(1), 743-764.
- Preston, S., Coad, N., Townend, J., Killham, K., & Paton, G. I. (2000). Biosensing the acute toxicity of metal interactions: are they additive, synergistic, or antagonistic? *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(3), 775-780.
- Pulido, P., Kägi, J. H., & Vallee, B. L. (1966). Isolation and some properties of human metallothionein. *Biochemistry*, 5(5), 1768-1777.
- Ramos, W., Galarza, C., de Amat, F., Pichardo, L., Ronceros, G., Juárez, D., . . . Chía, H. (2006). MINEROSANMATEODEHUANCHOR. *Dermatología Peruana*, 16(1), 41-45.
- Rausser, W. E. (1990). Phytochelatin. *Annual review of biochemistry*, 59(1), 61-86.
- Rausser, W. E. (1999). Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell biochemistry and biophysics*, 31(1), 19-48.
- Rehman, A., Ali, A., Muneer, B., & Shakoobi, A. R. (2007). Resistance and biosorption of mercury by bacteria isolated from industrial effluents. *Pakistan Journal of Zoology*, 39(3), 137.
- Rehman, A., & Anjum, M. S. (2011). Multiple metal tolerance and biosorption of cadmium by *Candida tropicalis* isolated from industrial effluents: glutathione as detoxifying agent. *Environmental Monitoring and Assessment*, 174(1-4), 585-595.
- Rehman, A., Zahoor, A., Muneer, B., & Hasnain, S. (2008). Chromium tolerance and reduction potential of a *Bacillus* sp. ev3 isolated from metal contaminated wastewater. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 81(1), 25-29.
- Rico, D., Martín-González, A., Díaz, S., de Lucas, P., & Gutiérrez, J.-C. (2009). Heavy metals generate reactive oxygen species in terrestrial and aquatic ciliated protozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(1), 90-96.
- Robinson, N. J., Whitehall, S. K., & Cavet, J. S. (2001). Microbial metallothioneins.
- Rodríguez, M. E., Miranda, R. C., Olivas, R., & Sosa, C. A. (2008). Efectos de las condiciones de operación sobre la biosorción de Pb²⁺, Cd²⁺ y Cr³⁺ en solución por *Saccharomyces cerevisiae* residual. *Información tecnológica*, 19(6), 47-55.
- Rong-Mullins, X., Winans, M. J., Lee, J. B., Lonergan, Z. R., Pilolli, V. A., Weatherly, L. M., . . . Oporto, G. S. (2017). Proteomic and genetic analysis of the response of *S. cerevisiae* to soluble copper leads to improvement of the antimicrobial function of cellulosic copper nanoparticles. *Metallomics*, 9(9), 1304-1315.
- Ruotolo, B. T., Gillig, K. J., Woods, A. S., Egan, T. F., Ugarov, M. V., Schultz, J. A., & Russell, D. H. (2004). Analysis of phosphorylated peptides by ion mobility-mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 76(22), 6727-6733.
- Satyanarayana, A., Kenie, D. N., & Shyamala, P. (2014). Speciation study on the Interaction of some divalent transition metal ions with succinic acid dihydrazide in aqueous medium. *Acta Chimica Slovenica*, 60(4), 807-812.
- Schaidler, L. A., Senn, D. B., Brabander, D. J., McCarthy, K. D., & Shine, J. P. (2007). Characterization of Zinc, Lead, and Cadmium in Mine Waste: Implications for Transport, Exposure, and Bioavailability. *Environmental Science & Technology*, 41(11), 4164-4171. doi:10.1021/es0626943

- Schat, H., Llugany, M., Vooijs, R., Hartley-Whitaker, J., & Bleeker, P. M. (2002). The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *Journal of Experimental Botany*, 53(379), 2381-2392.
- Semple, K. T., Doick, K. J., Jones, K. C., Burauel, P., Craven, A., & Harms, H. (2004). Peer reviewed: defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated: ACS Publications.
- Shine, A. M., Shakya, V. P., & Idnurm, A. (2015). Phytochelatin synthase is required for tolerating metal toxicity in a basidiomycete yeast and is a conserved factor involved in metal homeostasis in fungi. *Fungal biology and biotechnology*, 2(1), 3.
- Silver, S., & Phung, I. T. (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(11-12), 587-605.
- Soares, E. V., Hebbelinck, K., & Soares, H. M. (2003). Toxic effects caused by heavy metals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a comparative study. *Canadian journal of microbiology*, 49(5), 336-343.
- Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P., & Garg, S. (2002). Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere*, 48(4), 427-435.
- Stecher, G., Kumar, S., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874. doi:10.1093/molbev/msw054
- Substances, A. f. T., & Registry, D. (1999). Toxicological profile for mercury: US Department of Health and Human Services, Public Health Service Atlanta, GA.
- Sumner, E. R., Shanmuganathan, A., Sideri, T. C., Willetts, S. A., Houghton, J. E., & Avery, S. V. (2005). Oxidative protein damage causes chromium toxicity in yeast. *Microbiology*, 151(6), 1939-1948. doi:doi:10.1099/mic.0.27945-0
- Sutton, H. C., & Winterbourn, C. C. (1989). On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Radical Biology and Medicine*, 6(1), 53-60.
- Tangaromsuk, J., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., & Upatham, E. (2002). Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass. *Bioresource Technology*, 85(1), 103-105.
- Trivedi, B., & Patel, K. (2007). Biosorption of hexavalent chromium from aqueous solution by a tropical basidiomycete BDT-14 (DSM 15396). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(5), 683-689.
- Valls, M., Bofill, R., González-Duarte, R., González-Duarte, P., Capdevila, M., & Atrian, S. I. (2001). A new insight into metallothionein (MT) classification and evolution The in vivo and in vitro metal binding features of *Homarus americanus* recombinant MT. *Journal of Biological Chemistry*, 276(35), 32835-32843.
- Vestergaard, M. d., Matsumoto, S., Nishikori, S., Shiraki, K., Hirata, K., & Takagi, M. (2008). Chelation of cadmium ions by phytochelatin synthase: role of the cystein-rich C-terminal. *Analytical Sciences*, 24(2), 277-281.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., & Panfoli, I. (2000). Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 46(2), 407-417.
- Viarengo, A., & Nott, J. (1993). Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 104(3), 355-372.
- Vögeli-Lange, R., & Wagner, G. J. (1990). Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves: implication of a transport function for cadmium-binding peptides. *Plant physiology*, 92(4), 1086-1093.
- Volesky, B., & May-Phillips, H. (1995). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42(5), 797-806.
- Vullo, D. L. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*, 2(3), 93-104.

- Wang, J., & Chen, C. (2006a). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Biotechnology advances*, 24(5), 427-451.
- Wang, J., & Chen, C. (2006b). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Biotechnol Adv*, 24(5), 427-451. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.03.001
- Winge, D., Nielson, K., Gray, W., & Hamer, D. (1985). Yeast metallothionein. Sequence and metal-binding properties. *Journal of Biological Chemistry*, 260(27), 14464-14470.
- Wright, A., & Nelson, J. (2002). Theory of the copper vacancy in cuprous oxide. *Journal of Applied Physics*, 92(10), 5849-5851.
- Wu, X., Cobbina, S. J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., & Yang, L. (2016). A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(9), 8244-8259.
- Yi, X., LIANG, X., Yingming, X., Xu, Q., HUANG, Q., Lin, W., & Yuebing, S. (2017). Remediation of heavy metal-polluted agricultural soils using clay minerals: a review. *Pedosphere*, 27(2), 193-204.
- Zieniuk, B., & Fabiszewska, A. (2018). *Yarrowia lipolytica*: a beneficial yeast in biotechnology as a rare opportunistic fungal pathogen: a minireview. *World journal of microbiology & biotechnology*, 35(1), 10-10. doi:10.1007/s11274-018-2583-8

X. ANEXOS

Anexo 1. Proteínas expresadas con regulación diferenciada, mayor y menor expresión (Up and Down) sometido al tratamiento con ion Cr⁺⁶.

contrast	category	log2_fold_change	pvalue	evalue	qvalue	num_replicates	num_peptides	set_type	peptide	modif	inferred_proteins
Cr/Control	confident.up	1,31	9,99999E-07	0	0	2	6	inferred	---	----	Q6C0C5
Cr/Control	confident.down	-1,161	9,99999E-07	0	0	2	11	inferred	---	----	Q6CFA1
Cr/Control	confident.up	0,993	9,99999E-07	0	0	2	18	inferred	---	----	Q6C177
Cr/Control	confident.down	-0,866	9,99999E-07	0	0	2	23	inferred	---	----	Q6C5X9
Cr/Control	confident.down	-0,813	9,99999E-07	0	0	2	26	inferred	---	----	Q6C2Y4
Cr/Control	confident.down	-1,354	9,99999E-07	0	0,001	2	26	inferred	---	----	Q6C6T4
Cr/Control	confident.up	0,658	1,1E-05	0,01	0,001	2	14	inferred	---	----	O59949
Cr/Control	confident.up	0,962	1,3E-05	0,01	0,001	2	8	inferred	---	----	Q6C1A8
Cr/Control	confident.down	-0,957	2,3E-05	0,01	0,002	2	8	inferred	---	----	Q6CGV1
Cr/Control	confident.down	-0,476	6,39999E-05	0,04	0,004	2	23	inferred	---	----	Q6C1F3
Cr/Control	likely.down	-0,476	0,000209482	0,13	0,012	2	33	inferred	---	----	Q6C326
Cr/Control	likely.up	0,546	0,000234858	0,14	0,012	2	14	inferred	---	----	Q6BZX6
Cr/Control	likely.up	0,616	0,000493505	0,3	0,023	2	15	inferred	---	----	Q6C781
Cr/Control	likely.down	-0,986	0,000984451	0,61	0,043	2	9	inferred	---	----	Q6CGJ3
Cr/Control	likely.up	0,966	0,001130171	0,7	0,046	2	5	inferred	---	----	Q6CEM5
Cr/Control	likely.down	-0,613	0,001137718	0,7	0,044	2	8	inferred	---	----	Q6CF43
Cr/Control	likely.up	0,987	0,001213829	0,75	0,044	2	4	inferred	---	----	Q6C2I1
Cr/Control	putative.up	0,799	0,001881169	1,16	0,061	2	14	inferred	---	----	Q6C7C1
Cr/Control	putative.up	0,822	0,001881169	1,16	0,064	2	6	inferred	---	----	Q6C6Z1
Cr/Control	putative.down	-0,347	0,001979146	1,22	0,061	2	26	inferred	---	----	Q6CCU7
Cr/Control	putative.down	-3,27	0,002195377	1,35	0,064	1	1	inferred	---	----	Q6CFU4
Cr/Control	putative.down	-1,719	0,00234565	1,44	0,066	2	1	inferred	---	----	Q6CEP9
Cr/Control	putative.down	-0,458	0,002526283	1,56	0,068	2	25	inferred	---	----	Q6C793
Cr/Control	putative.down	-0,564	0,002771389	1,71	0,071	2	12	inferred	---	----	Q6CG47
Cr/Control	putative.up	0,564	0,002794077	1,72	0,069	2	10	inferred	---	----	P18120
Cr/Control	putative.down	-0,6	0,003275806	2,02	0,078	2	13	inferred	---	----	Q6C8K2
Cr/Control	putative.down	-0,597	0,003454483	2,13	0,079	2	8	inferred	---	----	Q6C859
Cr/Control	putative.down	-0,756	0,003979084	2,45	0,088	2	5	inferred	---	----	Q6C7B8
Cr/Control	putative.up	0,642	0,004418502	2,72	0,091	2	7	inferred	---	----	Q6C2Q9
Cr/Control	putative.up	0,649	0,004418502	2,72	0,094	2	8	inferred	---	----	Q6CCD9
Cr/Control	putative.up	0,625	0,004658423	2,87	0,093	2	8	inferred	---	----	Q6C6E6
Cr/Control	putative.up	1,733	0,004922951	3,03	0,095	2	1	inferred	---	----	Q6C9Q2
Cr/Control	putative.up	0,527	0,005026184	3,1	0,094	2	9	inferred	---	----	Q6CC94
Cr/Control	putative.up	0,395	0,006062311	3,73	0,11	2	14	inferred	---	----	Q6C8V3
Cr/Control	putative.up	0,651	0,006096578	3,76	0,107	2	6	inferred	---	----	Q6C354
Cr/Control	putative.up	1,061	0,007679693	4,73	0,131	2	2	inferred	---	----	Q6C7A8
Cr/Control	putative.down	-1,606	0,007839686	4,83	0,131	2	1	inferred	---	----	rev_Q6CH10

Anexo 2. Cuantificación relativa en los cambios de abundancia de proteínas en *Yarrowia lipolytica* frente al tratamiento con cromo. Para la identificación y cuantificación de proteínas se empleó Log2 y se calcularon las medias de las réplicas biológicas, determinando el valor Q.

ID	Nombres de la Proteína/similares	Número de Péptidos	Q-value	Regulación	Media log2 Cromo/Control	% De cobertura	Respuesta a Estrés Oxidativo	Actividad Oxirreductora	Metabolismo de Proteínas	Metabolismo de Carbohidratos	Metabolismo de Ácidos nucleicos	Síntesis de ATP y Transporte de Ions	División Celular	Membrana celular y pared	Protein folding	Transporte
Proteínas significativas reguladas con el tratamiento de Cromo (media log2 ratio positivo y qvalue < 0.01)																
Q6C0C5	Histone H4	6	0	UP	1,31	51,46	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Q6C177	Aldo/Keto reductasa	18	0	UP	0,993	64,71	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Q6C1A8	Peptidase	8	0,001	UP	0,962	26,57	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
O59949	Elongation factor 1-alpha	14	0,001	UP	0,658	37,83	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Proteínas significativas reguladas con el tratamiento de Cromo (media log2 ratio positivo y qvalue < 0.05)																
Q6C2I1	Glucose-6-phosphate isomerase	4	0,044	UP	0,987	10,27	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Q6CEM5	S-adenosylmethionine synthase	5	0,046	UP	0,966	18,65	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Q6C781	Protein disulfide-isomerase	15	0,023	UP	0,616	44,64	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Q6BZX6	Purine nucleoside phosphorylase	14	0,012	UP	0,546	69,8	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Proteínas significativas reguladas con el tratamiento de Cromo (media log2 ratio positivo y qvalue > 0.05)																
Q6C9Q2	Histidine phosphatase superfamily	1	0,095	UP	1,733	4,88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5FVG4	ribosomal protein L22	2	0,141	UP	1,251	23,48	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Q6C3L1	putative serine esterase	1	0,207	UP	1,144	3,47	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
B5RSK3	subunit of protein NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I)	1	0,31	UP	1,127	15,22	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
Q6CB46	Type 1 glutamine amidotransferase	2	0,168	UP	1,072	11,72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q6C7A8	Glutathione peroxidase	2	0,131	UP	1,061	14,29	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Q6CGR9	Vps5 p	.	0,388	UP	1,021	1,58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Q6C986	60S ribosomal protein L10	1	0,381	UP	0,975	4,98	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Q6C369	ADP-ribosylation factor 1	1	0,367	UP	0,952	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Q6C477	60S ribosomal protein L9	2	0,324	UP	0,918	15,96	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Q6CDE7	Riboflavin synthase, putative	1	0,504	UP	0,89	4,39	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Q6CI89	ribosome associated DnaJ chaperone	2	0,357	UP	0,859	12,59	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Q6CFW1	O-methyltransferase	2	0,403	UP	0,797	24,12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anexo 3. Proteínas expresadas con regulación diferenciada, alta y menor expresión (Up and Down) sometido al tratamiento con ion Cd⁺².

contrast	diff. Regulation	log2_fold_change	pvalue	evalue	qvalue	num_replicates	num_peptides	set_type	peptide	modif	inferred_proteins
Cd/Control	confident.up	1,647	9,99999E-07	0	0	0	2	16 inferred	---	----	Q6C8V3
Cd/Control	confident.down	-1,494	9,99999E-07	0	0	0	2	26 inferred	---	----	Q6C6T4
Cd/Control	confident.up	1,426	9,99999E-07	0	0	0	2	16 inferred	---	----	Q6CFX7
Cd/Control	confident.up	1,369	9,99999E-07	0	0	0	2	14 inferred	---	----	Q6C0S2
Cd/Control	confident.up	1,356	9,99999E-07	0	0	0	2	9 inferred	---	----	Q6C7K9
Cd/Control	confident.up	1,254	9,99999E-07	0	0	0	2	21 inferred	---	----	Q6C1K2
Cd/Control	confident.down	-1,071	9,99999E-07	0	0	0	2	19 inferred	---	----	Q6CEH4
Cd/Control	confident.up	0,841	9,99999E-07	0	0	0	2	24 inferred	---	----	Q6C1F3
Cd/Control	confident.down	-0,837	9,99999E-07	0	0	0	2	19 inferred	---	----	Q6CF74
Cd/Control	confident.down	-0,606	9,99999E-07	0	0	0	2	34 inferred	---	----	Q6C326
Cd/Control	confident.up	1,528	9,99999E-07	0	0,001	0	2	16 inferred	---	----	Q6C6P1
Cd/Control	confident.up	1,126	2E-06	0	0	0	2	9 inferred	---	----	Q6C3D2
Cd/Control	confident.down	-1,505	3E-06	0	0	0	2	6 inferred	---	----	Q6CGV1
Cd/Control	confident.up	0,966	5E-06	0	0	0	2	10 inferred	---	----	Q6CF53
Cd/Control	confident.down	-1,131	8,99999E-06	0	0	0	2	9 inferred	---	----	Q99145
Cd/Control	confident.up	1,122	8,99999E-06	0	0	0	2	9 inferred	---	----	Q6C535
Cd/Control	confident.down	-0,878	8,99999E-06	0	0	0	2	11 inferred	---	----	Q6C211
Cd/Control	confident.down	-0,734	1,1E-05	0,01	0	0	2	15 inferred	---	----	Q6CFB6
Cd/Control	confident.up	1,187	1,3E-05	0,01	0	0	2	8 inferred	---	----	Q6CFN7
Cd/Control	confident.up	0,673	1,3E-05	0,01	0	0	2	14 inferred	---	----	Q6BZX6
Cd/Control	confident.up	0,948	1,8E-05	0,01	0	0	2	8 inferred	---	----	Q6C5H4
Cd/Control	confident.up	0,896	2,6E-05	0,01	0,001	0	2	9 inferred	---	----	Q6C9B1
Cd/Control	confident.down	-0,895	3,5E-05	0,02	0,001	0	2	8 inferred	---	----	Q6CF43
Cd/Control	confident.down	-0,967	4,7E-05	0,02	0,001	0	2	11 inferred	---	----	Q6C618
Cd/Control	confident.down	-0,81	5,89999E-05	0,03	0,001	0	2	9 inferred	---	----	Q6C2B5
Cd/Control	confident.up	0,908	6,09999E-05	0,03	0,001	0	2	18 inferred	---	----	Q6C7C1
Cd/Control	confident.down	-3,053	6,59999E-05	0,03	0,001	0	2	1 inferred	---	----	Q6CFU4
Cd/Control	confident.up	0,763	8,19999E-05	0,04	0,001	0	2	10 inferred	---	----	Q6C8D6
Cd/Control	confident.up	0,664	0,000118	0,06	0,002	0	2	11 inferred	---	----	Q6CEJ7
Cd/Control	confident.down	-0,757	0,000121	0,06	0,002	0	2	10 inferred	---	----	F2Z678
Cd/Control	confident.up	0,923	0,000164	0,08	0,003	0	2	7 inferred	---	----	Q6CFJ5
Cd/Control	confident.down	-1,221	0,00017	0,09	0,003	0	2	5 inferred	---	----	Q6CC82
Cd/Control	confident.down	-0,609	0,000229192	0,12	0,004	0	2	17 inferred	---	----	Q6C4C2
Cd/Control	confident.up	0,443	0,000230024	0,12	0,003	0	2	24 inferred	---	----	Q6C5X9
Cd/Control	confident.up	0,453	0,000236612	0,12	0,003	0	2	26 inferred	---	----	Q6CCU7
Cd/Control	confident.down	-1,212	0,000268258	0,14	0,004	0	2	4 inferred	---	----	Q6C968
Cd/Control	confident.up	1,607	0,000282318	0,14	0,004	0	2	3 inferred	---	----	Q6CB78

Anexo 4. Cuantificación relativa en los cambios de abundancia de proteínas en *Yarrowia lipolytica* frente al tratamiento con cadmio. Para la identificación y cuantificación de proteínas se empleó Log2 y se calcularon las medias de las réplicas biológicas, determinando el valor Q.

ID	Nombres de la Proteína/similares	Número de Péptidos	Q-value	Regulación	Media log2 Cromo/Control	% De cobertura	Respuesta a Estrés Oxidativo	Actividad Oxirreductora	Metabolismo de Proteínas	Metabolismo de Carbohidratos	Metabolismo de Acidos nucleicos	Síntesis de ATP y Transporte de Ions	División Celular	Membrana celular y pared	Protein folding	Transporte
Proteínas significativas reguladas con el tratamiento de Cadmio (media log2 ratio positivo y qvalue < 0.01)																
Q6C8V3	Malate dehydrogenase	16	0	UP	1,647	71,6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Q6C6P1	Glycoside hydrolase	16	0,001	UP	1,528	28,56	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Q6CFX7	Phosphoglycerate mutase	16	0	UP	1,426	80,16	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Q6C1K2	Transaldolase	21	0	UP	1,254	56,92	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Q6CFN7	Thioredoxin 4	8	0	UP	1,187	53,37	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Q6C3D2	Putative intracellular protease/amidase	9	0	UP	1,126	49,2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Q6C535	Mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40	9	0	UP	1,122	42,29	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Q6CFS3	inositol-3-phosphate synthas	10	0	UP	0,966	27,17	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Q6C5H4	Glutathione reductase	8	0	UP	0,948	30,64	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Q6CFJ5	NADPH oxidoreductase containing flavin mononucleotide (FMN)	7	0,003	UP	0,923	28,46	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Q6C9B1	ATP synthase subunit 5, mitochondrial	9	0,001	UP	0,896	52,34	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Q6C1F3	Enolase	24	0	UP	0,841	80,82	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Q6C8D6	Heat shock protein 9/12	10	0,001	UP	0,763	83,72	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Q6BZX6	purine nucleoside phosphorylase	14	0	UP	0,673	69,8	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Q6CEJ7	peroxiredoxin TSA1	11	0,002	UP	0,664	75,51	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Q6C8C6	Dihydrolipoyl dehydrogenase	27	0,009	UP	0,556	57,72	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Q6CCU7	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	26	0,003	UP	0,453	75,74	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Q6C5X9	lactate/malate dehydrogenase	24	0,003	UP	0,443	83,99	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Proteínas significativas reguladas con el tratamiento de Cadmio (media log2 ratio positivo y qvalue < 0.05)																
Q6CEP5	3-methyladenine DNA glycosylase/8-oxoguanine DNA glycosylase	1	0,022	UP	2,157	2,22	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Anexo 5. Proteínas expresadas con regulación diferenciada, alta y menor expresión (Up and Down) sometido al tratamiento con ion Cu⁺²

contrast	category	log2_fold_chan	pvalue	evalue	qvalue	num_replicate	num_peptides	set_type	peptide	modif	inferred_proteins
Cu/Control	confident.down	-2,528	9,99999E-07	0	0	2	2	1 inferred	---	----	Q6C0J1
Cu/Control	confident.up	2,146	9,99999E-07	0	0	2	2	2 inferred	---	----	B5FVB6
Cu/Control	confident.down	-2,131	9,99999E-07	0	0	2	2	6 inferred	---	----	Q6C5X6
Cu/Control	confident.down	-1,968	9,99999E-07	0	0	2	2	12 inferred	---	----	Q6C8K2
Cu/Control	confident.up	1,947	9,99999E-07	0	0	2	2	7 inferred	---	----	Q6CFM6
Cu/Control	confident.up	1,914	9,99999E-07	0	0	2	2	4 inferred	---	----	Q6CBG3
Cu/Control	confident.down	-1,849	9,99999E-07	0	0	2	2	24 inferred	---	----	Q6C6T4
Cu/Control	confident.up	1,772	9,99999E-07	0	0	2	2	3 inferred	---	----	W0TYM5
Cu/Control	confident.down	-1,618	9,99999E-07	0	0	2	2	9 inferred	---	----	Q6C2B5
Cu/Control	confident.down	-1,607	9,99999E-07	0	0	2	2	28 inferred	---	----	P29407
Cu/Control	confident.down	-1,568	9,99999E-07	0	0	2	2	9 inferred	---	----	Q6C0Y0
Cu/Control	confident.up	1,559	9,99999E-07	0	0	2	2	2 inferred	---	----	Q6CHY1
Cu/Control	confident.up	1,517	9,99999E-07	0	0	2	2	3 inferred	---	----	Q6CCH5
Cu/Control	confident.down	-1,503	9,99999E-07	0	0	2	2	4 inferred	---	----	Q6C968
Cu/Control	confident.down	-1,496	9,99999E-07	0	0	2	2	9 inferred	---	----	Q6CGV1
Cu/Control	confident.up	1,494	9,99999E-07	0	0	2	2	10 inferred	---	----	Q6C294
Cu/Control	confident.down	-1,486	9,99999E-07	0	0	2	2	3 unresolved	---	----	Q6C5X6;Q6C8Y8;Q6CDZ5;Q6C
Cu/Control	confident.up	1,451	9,99999E-07	0	0	2	2	4 inferred	---	----	Q6CCS7
Cu/Control	confident.down	-1,436	9,99999E-07	0	0	2	2	25 inferred	---	----	Q6C793
Cu/Control	confident.up	1,415	9,99999E-07	0	0	2	2	4 inferred	---	----	Q6C2R2
Cu/Control	confident.down	-1,386	9,99999E-07	0	0	2	2	33 inferred	---	----	Q6C326
Cu/Control	confident.down	-1,371	9,99999E-07	0	0	2	2	2 inferred	---	----	Q6CBQ1
Cu/Control	confident.down	-1,363	9,99999E-07	0	0	2	2	9 inferred	---	----	Q6CGJ3
Cu/Control	confident.up	1,345	9,99999E-07	0	0	2	2	4 inferred	---	----	Q6CDH0
Cu/Control	confident.up	1,306	9,99999E-07	0	0	2	2	6 inferred	---	----	Q6CF41
Cu/Control	confident.down	-1,297	9,99999E-07	0	0	2	2	8 inferred	---	----	Q6C7I2
Cu/Control	confident.up	1,265	9,99999E-07	0	0	2	2	6 inferred	---	----	Q6C2P6
Cu/Control	confident.up	1,251	9,99999E-07	0	0	2	2	4 inferred	---	----	Q6C662
Cu/Control	confident.down	-1,248	9,99999E-07	0	0	2	2	17 inferred	---	----	Q6C2T9
Cu/Control	confident.up	1,246	9,99999E-07	0	0	2	2	15 inferred	---	----	Q6C781
Cu/Control	confident.down	-1,216	9,99999E-07	0	0	2	2	7 inferred	---	----	Q6C859
Cu/Control	confident.down	-1,202	9,99999E-07	0	0	2	2	7 inferred	---	----	W0TYP0
Cu/Control	confident.down	-1,199	9,99999E-07	0	0	2	2	38 inferred	---	----	Q6C342
Cu/Control	confident.up	1,194	9,99999E-07	0	0	2	2	4 inferred	---	----	Q6C8I3
Cu/Control	confident.up	1,178	9,99999E-07	0	0	2	2	4 inferred	---	----	Q6C492
Cu/Control	confident.up	1,158	9,99999E-07	0	0	2	2	7 inferred	---	----	Q6C765
Cu/Control	confident.down	-1,153	9,99999E-07	0	0	2	2	26 inferred	---	----	Q6C2Y4

Anexo 6. Cuantificación relativa en los cambios de abundancia de proteínas en *Yarrowia lipolytica* frente al tratamiento con cobre. Para la identificación y cuantificación de proteínas se empleó Log2 y se calcularon las medias de las réplicas biológicas, determinando el valor Q.

ID	Nombres de la Proteína/similares	Número de Péptidos	Q-value	Regulación	Media log2 Cromo/Control	% De cobertura	Respuesta a Estrés Oxidativo	Actividad Oxirreductora	Metabolismo de Proteínas	Metabolismo de Carbohidratos	Metabolismo de Ácidos nucleicos	Síntesis de ATP y Transporte de Ions	División Celular	Membrana celular y pared	Protein folding	Transporte
Proteínas significativas reguladas con el tratamiento de Cobre (media log2 ratio positivo y qvalue < 0.01)																
B5FVB6	Heavy-metal-associated domain	2	0	UP	2,146	44,44	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q6C7X2	Acyl carrier protein	1	0,004	UP	2,095	11,36	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Q6CFM6	Chaperonin 10 Kd subunit	7	0	UP	1,947	71,15	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
W0TYM5	V-type proton ATPase subunit G	3	0	UP	1,772	33,04	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Q6C962	40S ribosomal protein S24	1	0,01	UP	1,584	25,37	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Q6C369	ADP-ribosylation factor 1	1	0,001	UP	1,573	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Q6CCH5	Tetratricopeptide (TPR) repeat	3	0	UP	1,517	23,26	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Q6CCY8	glutaredoxin	1	0,002	UP	1,497	27,62	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Q6C294	translation elongation factor EF-1	10	0	UP	1,494	70,45	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Q6C7J7	Glycine cleavage system H protein	2	0	UP	1,454	32,56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q6CCS7	Eukaryotic translation initiation factor 5A	4	0	UP	1,451	44,59	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Q6C2R2	60S acidic ribosomal protein P2	4	0	UP	1,415	55,56	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Q6CDX3	Ribosomal protein S19e	2	0	UP	1,36	22,45	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Q6C6E4	Aspartate protease	1	0,005	UP	1,349	6,93	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Q6CDH0	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	4	0	UP	1,345	43,94	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
P38997	Saccharopine dehydrogenase [NAD(+), L-lysine-forming]	1	0,001	UP	1,318	3,25	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Q6CF41	FK506-binding protein 1	6	0	UP	1,306	74,07	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Q6CGR9	Vps5p	1	0,009	UP	1,281	1,58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Q6CEP5	3-methyladenine DNA glycosylase/8-oxoguanine DNA glycosylase	1	0,008	UP	1,277	2,22	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Q6C2P6	40S ribosomal protein S12	6	0	UP	1,265	54,23	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Q6C662	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	4	0	UP	1,251	40,91	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Q6C781	Protein disulfide-isomerase	15	0	UP	1,246	44,64	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Q6C1P8	Ribosomal S17	2	0	UP	1,22	15,94	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Q6C350	serine--tRNA ligase SES1	3	0	UP	1,22	10,38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q6C492	Single-stranded DNA-binding protein	4	0	UP	1,178	39,2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Anexo 7. Resumen de los resultados de las proteínas encontradas bajo el tratamiento con iones metálicos.

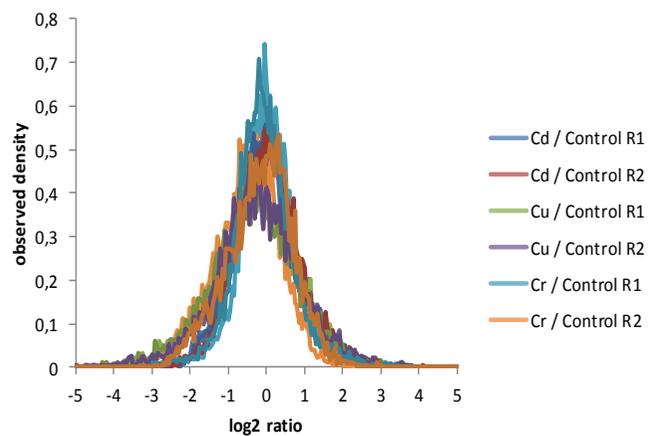
results summary

design

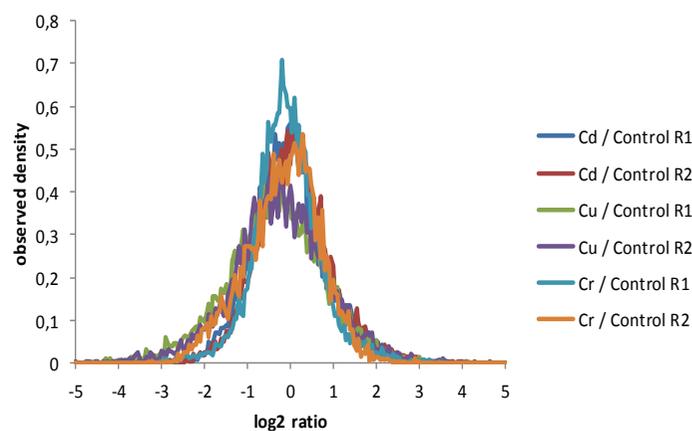
reporter ion	
113	Control R1
114	Control R2
115	Cd R1
116	Cd R2
117	Cu R1
118	Cu R2
119	Cr R1
121	Cr R2

	Cd / Control	Cu / Control	Cr / Control
	74,40%	57,30%	88,50%
	23	104	4 confident.up (q-value < 0.01, positive log fold change)
	21	29	4 likely.up (q-value < 0.05, positive log fold change)
	110	138	70 putative.up (q-value > 0.05 but p-value < 1-π0, positive log fold change)
	384	207	562 no differentially regulated
	114	102	49 putative.down (q-value > 0.05 but p-value < 1-π0, negative log fold change)
	13	22	3 likely.down (q-value < 0.05, negative log fold change)
	21	103	6 confident.down (q-value < 0.01, negative log fold change)
	686	705	698 # hypotheses tested
	78	258	17 # hypotheses significant with q < 0.05

normalized Treatment/Control reporter ion ratios



normalized Treatment/Control reporter ion ratios



Anexo 8. Resultados del análisis de metales pesados de las muestras obtenidas de cuerpos de agua Altoandinos de Pasco y Junín.

Metales* (mg/L)	Laguna Yanamate (junio 2015)	Laguna Yanamate (noviembre 2015)	Laguna Yanamate (noviembre 2016)	Laguna Quiulacocha (junio 2015)	Laguna Quiulacocha (noviembre 2015)	Lago Junín (noviembre 2015)	Lago Junín-Puente Upumayo (noviembre 2016)	ECA (Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM). Categoría 4
Aluminio	185.5	73.1	272.5	22.4	13.1	20	34.7	-
Antimonio	0.409	0.319	1.48	0.068	0.053	<0.010	<0.010	0.64
Arsénico	25.8	12.7	40	2.4	3.3	0.183	0.358	0.15
Bario	<0.0003	<0.0003	<0.0003	<0.0003	<0.0003	0.447	1.1225	0.7
Berilio	0.008	<0.003	0.008	<0.003	<0.003	<0.003	<0.003	-
Boro	9.9	4.45	10.1	9.8	4.2	0.211	0.422	-
Cadmio	1.5	0.5	1.3	0.9	0.175	0.016	0.04	0.00025
Cinc	516	152	430.9	512	62	4.498	10.8	-
Calcio	354.7	546	765.5	269.1	178	235.5	443.3	-
Cobalto	0.095	0.043	0.109	0.058	0.024	0.014	0.026	-
Cobre	52.9	26.5	67.6	4.5	3.4	0.7	2	0.1
Cromo	0.073	0.037	0.114	N.D.	0.008	0.011	0.02	0.011
Hierro	2596.5	1044	2748	1886.5	1045	41.5	91.9	-
Magnesio	716	104	327	1183	110	20	36	-
Manganeso	362.75	60.2	167.1	632	107.6	2.44	8.6	-
Mercurio	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	0.0001
Molibdeno	<0.004	<0.004	<0.004	<0.004	<0.004	<0.004	<0.004	-
Níquel	0.188	0.073	0.198	0.122	0.042	0.023	0.04	0.052
Plomo	0.135	0.217	0.145	0.098	0.174	1.6	2.3	0.0025
Selenio	<0.010	<0.010	<0.010	0.047	<0.010	<0.010	<0.010	0.005
Talio	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	0.0008

*Método: Inductively Coupled Plasma (ICP) o Espectrómetro de Plasma Inducido-Muestras analizadas en el Instituto de Corrosión de la PUCP.

 : Concentraciones de metales reportados como Estándar Calidad Ambiental (ECA)-Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM

 : Concentraciones de metales que superan ECA Nacionales por ICP-MS.