

## CEPAS DE *Yarrowia lipolytica*, AISLADAS DE LAGUNAS ALTOANDINAS DEL PERÚ CONTAMINADAS CON RELAVES MINEROS, COMO POTENCIALES AGENTES PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE METALES PESADOS

### *Yarrowia lipolytica* STRAINS ISOLATED FROM HIGH ANDEAN LAGOONS OF PERU CONTAMINATED WITH MINING TAILINGS AS POTENTIAL AGENTS FOR THE BIOREMEDIATION OF HEAVY METALS

Tito L. Sánchez-Rojas<sup>1,2</sup>, Diego Macedo-Prada<sup>1,3</sup>, Pablo S. Ramírez<sup>4,5</sup>, Lee K. Arrieta<sup>1,6</sup>, Yerson Durán<sup>1,7</sup>, Abad Flores<sup>1,8</sup>, Walter F. Manya<sup>4,9</sup> y Gregory Guerra<sup>4,10</sup>

#### Resumen

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y la capacidad de biosorción de metales pesados en levaduras aisladas del Lago Junín y la relavera Yanamate. Se evaluaron en ambos cuerpos de agua: pH, conductividad eléctrica, temperatura, sólidos totales disueltos (STD) y metales pesados por ICM-MS, según los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) del Ministerio del Ambiente-MINAM del Perú. Los parámetros fisicoquímicos evaluados en el Lago Junín fueron superiores a los límites máximos permisibles (LMP) para los siguientes metales: arsénico, cadmio, cobre, cromo y plomo. En la relavera Yanamate, los parámetros evaluados estuvieron fuera del LMP para los ECA de aguas tipo IV: pH inferiores a 3 (ácidos), altas conductividades eléctricas y elevadas concentraciones de metales pesados. A partir de las aguas muestreadas, se aislaron levaduras en medio YPG a 10 °C y 20 °C. La CL<sub>50</sub> de los iones Cr<sup>+6</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup> y Hg<sup>+2</sup> en *Y. lipolytica* AMJ3 fue 0.24 mM, 1.34 mM, 0.54 mM y 7.5 0.04 mM en el orden descrito; en tanto la cepa *Y. lipolytica* AMJ6 mostró una CL<sub>50</sub> de 1.06 mM, 1.42 mM, 0.49 mM y 0.05 mM en el mismo orden. La capacidad de biosorción del ion Cu<sup>+2</sup> fue del 90% en el caso de la cepa AMJ3 y 92% en la cepa AMJ6, a una concentración de 1.26 mM; asimismo, la biosorción del ion Cr<sup>+6</sup> fue cercana al 90% en ambas cepas (AMJ3 y AMJ6) a concentraciones de 0.24 mM y 0.96 mM, respectivamente. Los análisis de las secuencias nucleotídicas de las cepas AMJ3 y AMJ6 confirmaron una identidad del 100% en el clado de *Yarrowia lipolytica*. Los resultados obtenidos de CL<sub>50</sub> y la capacidad de biosorción indican que las levaduras bajo estudio tienen potencial en la biorremediación de cuerpos de agua y suelos contaminados con metales pesados.

**Palabras clave:** relaves mineros, parámetros fisicoquímicos, concentración letal media (CL<sub>50</sub>), biosorción, *Yarrowia lipolytica*.

#### Abstract

The objective of this work was to study the mean lethal concentration (LC<sub>50</sub>) and the biosorption capacity of heavy metals in isolated yeasts from Lake Junín and the Yanamate tailings facility. In both bodies of water were evaluated: pH, electrical conductivity, temperature, total dissolved solids (STD) and heavy metals by ICM-MS, according to the Environmental Quality Standards (ECA) of the Ministry of the Environment-MINAM of Peru. The physicochemical parameters evaluated in Lake Junín were higher than the maximum permissible limits (MPL) for the following metals: arsenic, cadmium, copper, chromium and lead. In the Yanamate tailings facility, the evaluated parameters were out of the LMP for type IV water ECAs: pH below 3 (acids), high electrical conductivities and high concentrations of heavy metals. From the sampled waters, yeasts were isolated in YPG medium at 10 °C and 20 °C. The LC<sub>50</sub> of the Cr<sup>+6</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup> and Hg<sup>+2</sup> ions in *Y. lipolytica* AMJ3 were 0.24 mM, 1.34 mM, 0.54 mM and 7.5 0.04 mM in the order described; while the strain *Y. lipolytica* AMJ6 showed a LC<sub>50</sub> of 1.06 mM, 1.42 mM, 0.49 mM and 0.05 mM in the same order. The biosorption capacity of the Cu<sup>+2</sup> ion was 90% in the case of the AMJ3 strain, and 92% in the AMJ6 strain, at a concentration of 1.26 mM; likewise, the biosorption of the Cr<sup>+6</sup> ion was close to 90% in both strains (AMJ3 and AMJ6) at concentrations of 0.24 mM and 0.96 mM, respectively. Nucleotide sequence analysis of AMJ3 and AMJ6 strains confirmed 100% identity in the *Yarrowia lipolytica* clade. These LC<sub>50</sub> and biosorption capacity results indicate that the studied yeasts have potential in the bioremediation of water bodies and soils contaminated with heavy metals.

**Key words:** mining tailings, physicochemical parameters, mean lethal concentration (LC<sub>50</sub>), biosorption, *Yarrowia lipolytica*.

---

## Introducción

En la cabecera de cuenca del río Mantaro existe una intensa actividad minera con alta explotación polimetálica de cobre, plata, plomo y zinc. Sin embargo, los desechos generados (relaves) por estas actividades impactan los ambientes naturales; gran parte de los relaves son derivados a lagunas y afluentes del lago Junín. Por ejemplo, el río San Juan, ubicado a 4 200 msnm, recibe efluentes mineros procedentes de la Compañía Minera Volcán S.A.A., la Compañía Minera Aurex y de la Sociedad Minera El Broncal, a través de la quebrada Quiulacocha (Wade *et al.*, 2006).

La evaluación realizada por el Ministerio de Salud (MINSa) en marzo del 2010, determinó que el río San Juan, presentaba contaminación por metales pesados: arsénico, cadmio, cobre, plomo, mercurio, zinc y drenaje ácido de minas (MINSa, 2011). El estudio realizado por Cusiche & Miranda (2019) manifiesta que la calidad del agua del río San Juan, fue impactado por los efluentes de las operaciones mineras de la Compañía Minera Aurex, que deterioraron la biodiversidad del sistema acuático y las poblaciones de aves migratorias y residentes, como el zambullidor de Junín (*Podiceps taczanowskii*); ave endémica, considerada una especie amenazada. El tamaño de las poblaciones de estas aves disminuyó, debido a la contaminación por efluentes mineros a partir de 1983, presentando un ligero aumento de 250 a 450 individuos entre los años 2010 y 2016 (Dinesen *et al.*, 2018). Otras especies amenazadas son los anfibios, como la rana de Junín (*Batrachophrynus microphthalmus*), especie endémica cuya población ha descendido drásticamente, por intoxicación con metales pesados, como arsénico, cadmio, hierro, mercurio y plomo (Castillo, 2008; Loza & Mendoza, 2017).

El Lago Junín (Chinchaycocha), situado a 4 080 msnm, abarca la mayor parte de la superficie de la Reserva Nacional de Junín (RNJ), y es el segundo lago más extenso del Perú (MINAM, 2012). Sus aguas son abastecidas por 12 ríos y 20 arroyos que dan origen al río Mantaro, el cual es uno de los principales tributarios de la cuenca del río Amazonas (ANA, 2010). El principal problema de este lago se debe al impacto de la minería; donde a partir del año 1913, la compañía minera Cerro de Pasco Cooper Corporation vertieron sus relaves mineros al río San Juan, afluente del Lago Junín (Vega-Centeno, 2011).

Otra de las lagunas afectadas por la actividad minera es Yanamate, hoy convertida en una relavera, se encuentra a 4 358 msnm y cuenta con un volumen de agua aproximado de 21.26 millones de m<sup>3</sup>, presenta pH muy ácido, alta conductividad eléctrica y concentraciones elevadas de metales pesados y sulfatos (Aduvire, 2018). Esta laguna ha sido utilizada desde 1981 hasta el 2005 para el vertimiento de aguas ácidas provenientes de la Mina de Cerro de Pasco Cooper Corporation y la compañía minera Volcán S.A.A. (hoy Cerro S.A.C.). Más aún, las empresas han incumplido

el “Plan de Cierre de Mina Progresivo” que fue aprobado el 2009 (MINEM, 2009). Hasta el año 2012, no se neutralizaron las aguas ácidas con material calcáreo, como carbonato de calcio (Dold *et al.*, 2009), luego se postergó para el periodo 2014 al 2017. En los últimos monitoreos realizados durante la presente investigación, en los años 2015 al 2018, se determinó que las aguas de esta relavera siguen impactadas, encontrando aguas ácidas de 1.5 a 3 de pH y altas concentraciones de metales pesados.

Para la biorremediación de metales pesados existen varias alternativas biológicas, como el uso de biomasa de hongos filamentosos y levaduras, por su capacidad de bioacumular metales pesados y conservar esta capacidad en condiciones extremas (Bahafid *et al.*, 2017). Estudios realizados con diferentes microorganismos *Debaryomyces hansenii*, *Zygosaccharomyces bailii* y *S. cerevisiae*, demostraron que las levaduras son agentes biosorbentes para la captura y eliminación de iones metálicos de aguas residuales. Estos microorganismos, son una alternativa para descontaminar procesos de biomagnificación y/o acumulación de metales en la cadena trófica, que afectan negativamente el entorno biológico (Bahafid *et al.*, 2017).

Las levaduras presentan capacidades intrínsecas asociadas a la biosorción de metales pesados (Hosiner *et al.*, 2014). Uno de los mecanismos para atrapar metales pesados es mediado por la quelación, puede ocurrir en las superficies celulares a través sus grupos fosfatos y carboxilo, estos grupos funcionales se unen a cationes metálicos. Otras moléculas que participan en la quelación y transporte de iones metálicos a nivel del citosol son los tripéptidos glutatión, fitoquelatinas y metalotioneínas (Bahafid *et al.*, 2017; Hosiner *et al.*, 2014). En general, la inmovilización y la movilización son dos de los principales mecanismos, utilizados por las levaduras para la biorremediación de metales.

Las levaduras además de quelar metales, promueven el crecimiento vegetal, tienen potencial aplicación en la agricultura orgánica, mejoran la producción y sostenibilidad ambiental (Higa & Parr, 2013). Se demostró que las levaduras pertenecientes al género *Candida*, *Saccharomyces* y *Yarrowia*, favorecen directa o indirectamente el crecimiento de las raíces de las plantas (Dudeja *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2016; Gizaw *et al.*, 2017). Esto microorganismos aislados de ambientes extremos, también poseen el potencial, como promotores de crecimiento vegetal, en agricultura sostenible y regenerativa (Botha, 2011).

Debido a la importancia y potencial biotecnológico de las levaduras en la biorremediación de suelos y aguas contaminadas con metales pesados, se aislaron cepas nativas de cuerpos de aguas altoandinas, contaminadas con relaves mineros. En este contexto, los objetivos del presente estudio fueron evaluar parámetros fisicoquímicos en el Lago Junín y la relavera Yanamate. Así mismo, determinar, en las

cepas, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de diversos metales, cinéticas de crecimiento, la CL<sub>50</sub> y la capacidad de biosorción de iones Cr<sup>+6</sup> y Cu<sup>+2</sup>.

## **Materiales y métodos**

### Localización de las estaciones

Las estaciones de muestreo corresponden a cuerpos de agua de la sierra central del Perú (Junín y Pasco) cuyas aguas han sido afectadas por el vertimiento de relaves mineros, por procesos de filtración o por escorrentía, que transportan el material tóxico de las relaveras hacia los cuerpos de agua estudiados. Las estaciones de muestreo del Lago Junín y la relavera Yanamate fueron georreferenciadas (Tablas 1 y 2) en coordenadas UTM WGS84, mediante el GPS (GARMIN eTrex® 30) en los meses de junio y noviembre del 2015.

### Parámetros fisicoquímicos

En cada estación de muestreo, se midieron *in situ*: pH, temperatura en °C, conductividad eléctrica (CE) en µS/cm y sólidos totales disueltos (STD) en ppt, de acuerdo con el Protocolo de Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos del ANA (2011), tomando muestras a una profundidad aproximada de 40 cm en la columna de agua, usando un equipo multiparámetro calibrado EXTECH-DO700.

### Análisis de metales

Para el análisis de metales pesados, se colectaron las muestras de agua durante la época de estiaje y de lluvia (junio y noviembre, respectivamente), según el Protocolo de Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos del ANA (2011). Para ello, se colectó 1 litro de muestra en envases limpios de primer uso, adicionando 20 gotas de ácido nítrico al 10%, siguiendo la metodología descrita por Skousen *et al.* (1998). Se determinó la concentración de los metales por Espectroscopia de Emisión por Plasma-Método basado en EPA 200.7 - Rev.4.4-1994 (EPA, 1994), en el Instituto de Corrosión y Protección de la Universidad Católica del Perú.

### Aislamiento de levaduras

Para el aislamiento de levaduras del Lago Junín y relavera Yanamate, se recolectaron muestras líquidas, previa remoción y/o agitación de la columna de agua, en frascos estériles de 500 ml de cada estación, siguiendo los procedimientos estándar para la evaluación del agua y aguas residuales (APHA *et al.*, 2012). Las muestras colectadas se conservaron en refrigeración hasta su procesamiento, antes de las 24 horas, en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la FCB-UNMSM en Lima, Perú. Las muestras se sembraron en caldo YPG (“Yeast Extract Peptone Glucose”) a pH 4.0 y se incubaron por dos semanas a 10 °C y 20 °C, a 150 rpm de agitación (Acosta *et al.*, 2005). La purificación de las cepas se llevó a cabo por agotamiento en placa en agar YPG. Se realizó una tinción con cristal violeta y se determinó la morfología de las cepas aisladas. Luego, se

criopreservaron a -20 °C, en viales de 1.5 ml con medio YPG semisólido (0.75% p/v de agar) a pH 4.0 y glicerol al 20%.

### Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico, las levaduras aisladas se cultivaron en caldo YPG por 48 horas, a pH 4.0, 150 rpm y 20 °C. La biomasa obtenida de cada cepa fue lisada, siguiendo el protocolo de Doyle & (1991) y para la extracción de ADN se usó el Kit de Purificación Gene JET DNA (NORGEN BIOTECK CORP), según las especificaciones del fabricante.

### Amplificación por PCR de la región LSU D1/D2 del gen 26S ARNr y Secuenciamiento

Para amplificar la región D1/D2 del gen de la subunidad ribosomal ARNr 26S de las cepas aisladas se usaron los iniciadores: F63: (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y LR3: (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') según Orbegozo *et al.* (2008). La PCR se realizó utilizando un equipo Multigene Optimax (LABNET), según el protocolo del mismo autor. Los amplicones se evaluaron mediante electroforesis en gelde agarosa al 2.0% con un marcador de peso molecular de 100 pb, buffer TAE 1x, a 80 voltios por 1.20 horas y se revelaron los geles en bromuro de etidio. Los amplicones de 10 cepas aisladas fueron enviados a Cloning Laboratories (MCLAB)-USA (www.mclab.com) para su secuenciamiento.

### Identificación molecular y análisis filogenético

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa Bioedit v7.2.5. y se utilizó la herramienta BlastN para comparar las secuencias de la región D1/D2 LSU de la subunidad ribosomal 26S, con otras levaduras identificadas y suscritas en el Genbank (BankIT -NCBI).

El análisis filogenético se realizó usando la herramienta ClustalW del programa BioEdit v.7.0.5. La comparación de las secuencias obtenidas se realizó con el programa BLASTN v.2 de las secuencias depositadas en Ribosomal Data Project – GenBank, luego se procedió al análisis filogenético con el programa MEGA v.7 (Kumar *et al.*, 2016). Para la determinación del mejor modelo evolutivo se realizó el análisis Best DNA Model empleando el método Neighbor – Joining y el Modelo de Sustitución Kimura 2 parámetros.

### Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a metales pesados

Las cepas resistentes a metales pesados se seleccionaron según la CMI. Para ello, estas fueron cultivadas en caldo YPG, pH 4, 20 °C a una agitación de 150 rpm, y expuestas a diferentes concentraciones (50 – 400 ppm) de iones metálicos (Cr<sup>+6</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, y Hg<sup>+2</sup>) y se incubaron por dos semanas. Las soluciones de metales se prepararon a partir de dicromato de sodio (Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), sulfato de cadmio (CdSO<sub>4</sub>), sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) y cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>).

Ensayo de citotoxicidad: determinación de la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>)

La citotoxicidad se evaluó mediante la determinación de la CL<sub>50</sub>, siguiendo la metodología propuesta por Hosiner *et al.* (2014). Las cepas seleccionadas se reactivaron y sembraron en caldo YPG a pH 4.0, 150 rpm, por 48 horas hasta alcanzar la fase exponencial. Al término de las 48 horas, se tomaron inóculos de 1 ml de cada cultivo y se inocularon por triplicado en tubos con 9 ml de caldo YPG con diferentes concentraciones de iones metálicos: Cd<sup>+2</sup> (0.53 y 0.63 mM), Cu<sup>+2</sup> (1.34 y 1.42 mM), Cr<sup>+6</sup> (0.144 y 0.240 mM) y Hg<sup>+2</sup> (0.04 y 0.05 mM), y se incubaron por 3 horas. Al término del tiempo de exposición, se tomó un volumen de 1 ml y se realizaron diluciones seriadas (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-5</sup>), las dos últimas diluciones se sembraron por diseminación en placas con agar YPG por 48 horas. Finalmente, se realizó el recuento en UFC/ml, determinándose la CL<sub>50</sub> para cada metal, mediante el porcentaje de viabilidad con respecto al ensayo control. Se determinó el porcentaje de viabilidad según la Fórmula 1.

$$\begin{aligned} & \% \text{viabilidad} \\ & = \left( \frac{\text{N}^\circ \text{ células viables en metal}}{\text{N}^\circ \text{ células viables control (sin metal)}} \right) \times 100\% \end{aligned}$$

**Fórmula 1.**

Cinética de crecimiento frente a metales pesados

Para determinar la cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas, se tomó como referencia la CMI y la CL<sub>50</sub>, en presencia de iones Cr<sup>+6</sup> y Cu<sup>+2</sup>. De un cultivo de 48 h, se tomó un inóculo promedio de 25 x 10<sup>7</sup> UFC/ml para la cepa AMJ3 y 50 x 10<sup>7</sup> UFC/ml para la cepa AMJ6, el inóculo correspondió al 10% del volumen total de los cultivos con tratamiento para cada metal. La evaluación de la cinética de crecimiento de la cepa AMJ3, se realizó a una concentración de 80 ppm (1.26 mM) de Cu<sup>+2</sup> y 10 ppm (0.192 mM) de Cr<sup>+6</sup>. Con la cepa AMJ6 se usó similar concentración de 80 ppm (1.26 mM) de Cu<sup>+2</sup> y 15 ppm (0.289 mM) de Cr<sup>+6</sup>. En ambos casos, se utilizó un control sin metal, las

cinéticas para cada tratamiento se trabajaron por triplicado. La incubación se llevó a cabo a 20 °C, 150 rpm por 96 horas en caldo YPG a pH 4.0. La evaluación de la población microbiana se realizó mediante la densidad óptica (λ = 600 nm) y se reportó en UFC/ml; las mediciones se realizaron en un intervalo de 4 a 10 horas, usando la metodología ICMSF cap. 2000 (DIGESA, 2003) para el conteo de las colonias.

Biosorción de metales pesados

Para determinar la capacidad de biosorción de metales pesados, se tomaron como referencia los estudios realizados por Cañizares-Villanueva (2000), Rehman *et al.* (2007) y Rehman *et al.* (2008). La biosorción se evaluó en base a los resultados de CMI en ambas cepas, las concentraciones de los ensayos de CL<sub>50</sub> y de las cinéticas de crecimiento. Para ello, se cultivaron las cepas seleccionadas (AMJ3 y AMJ6) en caldo YPG, y se tomaron volúmenes de la fase de crecimiento exponencial. Las cepas fueron expuestas a caldos YPG con iones Cr<sup>+6</sup> a concentraciones de 0.12 mM (12.5 ppm) y 0.48 mM (50 ppm) respectivamente; las concentraciones de iones Cu<sup>+2</sup> para ambas cepas fueron las mismas 1.26 mM (80 ppm). Los ensayos de biosorción de los iones metálicos, se realizaron por triplicado en matraces de 1 l con caldo YPG a pH 4.0, en las cuales se incorporó cada metal por separado. Se inoculó el 10% (v/v) de cada cepa cultivada, a una concentración aproximada de 10<sup>7</sup> UFC/ml, luego se incubaron por 96 h a 20 °C y 150 rpm. Se tomaron muestras de 50 ml del cultivo cada 24 h, los volúmenes tomados se centrifugaron a 4 500 rpm por 20 minutos, 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 (EPA, 1994).

**Tabla 1.** Georreferenciación de las estaciones de muestreo y promedios de parámetros fisicoquímicos del Lago Junín (junio y noviembre 2015).

Época	Estación	Coordenadas UTM 18L		Elevación (msnm)	pH	Conductividad (µS/cm)	STD (ppt)	Temperatura (°C)
		Este	Sur					
Junio	M 4	378916.31	8772988.85	4 088	7.21	320	0.16	12.70
	M 5	374859.52	8778313.75	4 084	7.49	1 050	0.52	11.00
	M 6	369824.63	8781884.24	4 084	7.90	430	0.21	13.50
	M 7	363858.88	8790283.59	4 083	7.72	260	0.13	13.00
Noviembre	M 4	378916.31	8772988.85	4 088	7.29	200	0.08	8.00
	M 5	374859.52	8778313.75	4 084	7.14	500	0.15	11.90
	M 6	369824.63	8781884.24	4 084	7.24	160	0.34	11.00
	M 7	363858.88	8790283.59	4 083	7.33	400	0.18	14.00
ECA-D.S. N° 004-2017-MINAM-PERÚ. Aguas Categoría IV					6.5 a 9.0	1 000		

**Tabla 2.** Georreferenciación de las estaciones de muestreo y promedios de parámetros fisicoquímicos de la relavera Yanamate (junio y noviembre 2015).

Época	Estación	Coordenadas UTM 18L		Elevación (msnm)	pH	Conductividad (µS/cm)	STD (ppt)	Temperatura (°C)
		Este	Sur					
Junio	M 1	363540.50	8814894.33	4 346	2.58	4 040	2.12	10.7
	M 2	363824.88	8815541.09	4 345	2.18	12 320	6.27	13.6
	M 3	363864.47	8815626.03	4 345	3.32	9 200	1.4	12.5
Noviembre	M 1	363540.50	8814894.33	4 346	1.74	3 999	2	10
	M 2	363824.88	8815541.09	4 345	1.71	3 999	2	10.5
	M 3	363864.47	8815626.03	4 345	1.73	2 173	1.085	11
ECA-D.S. N° 004-2017-MINAM-PERÚ. Aguas Categoría IV					6.5 a 9.0	1 000		

### Resultados y discusión

#### Georreferenciación, parámetros fisicoquímicos y metales pesados

La georreferenciación y la evaluación de la calidad fisicoquímica de los cuerpos de agua de las estaciones de muestreo del Lago Junín se muestran en la Tabla 1 y de la relavera Yanamate Tabla 2. Para el análisis se tomó como referencia los ECA del D.S. N° 004-2017-MINAM-PERÚ (MINAM, 2017).

Los resultados de los monitoreos realizados en los meses de junio y noviembre del año 2015 en el Lago Junín fueron similares a los reportados por Bianchini (2009), los resultados obtenidos de conductividad para el tributario principal (río San Juan) del Lago Junín, fue de 320 µS/cm. En el presente estudio, encontramos en 7 de las 8 estaciones muestreadas, valores entre los 200 y 500 µS/cm, solo la estación M5 presentó conductividad 1 050 µS/cm, ligeramente por encima del ECA del MINAM (Tabla 1). Por otro lado, Bianchini (2009) reporta una temperatura media de 12.75 °C y pH de 9.4, mientras que, en la presente investigación, las temperaturas en las estaciones muestreadas estuvieron en el rango de 8 °C a 14 °C y los valores promedio del pH fueron cercanos a 7.52.

En la estación M7 se encuentra la desembocadura del río San Juan en el Lago Junín, en esta estación se

determinó el pH de 7.72 en junio del 2015 y 7.33 en noviembre 2015. Cusiche & Miranda (2019), reportaron 2 puntos de muestreo para el río San Juan (100 m aguas arriba del afluente de las operaciones de CIA Minera Aurex S.A.) con una temperatura promedio de 10 °C, pH 8.28; y 100 m aguas abajo a una temperatura de 12.4 °C con un pH de 7.55. Las estaciones de muestreo del Lago Junín presentaron niveles de pH cercanos al neutro, probablemente porque los efluentes reciben tratamiento alcalino o neutralizante, mientras que algunos resultados de las mediciones de metales pesados para el Lago Junín estuvieron ligeramente por encima del ECA establecido para aguas continentales de clase IV, como se reportan en la Tabla 3. Los resultados de los parámetros fisicoquímicos, a excepción de la estación M5, en el Lago Junín estuvieron dentro de los ECA del MINAM.

En el caso de la relavera Yanamate, se registraron temperaturas entre 10.60 °C y 12.27 °C, pH de 1.30 a 3.32 (ácido), conductividades eléctricas altas, de 5 200 a 12 320 µS/cm, todos los parámetros fisicoquímicos y las concentraciones de metales pesados se encontraron por encima del ECA del MINAM (Tablas 2 y 3). Este cuerpo de agua ubicada en la región Pasco, fue contaminada por décadas por relaves mineros, causando impactos negativos, hasta convertirla en la actualidad, en una relavera, con pH muy ácido y altas

**Tabla 3.** Concentración de metales pesados en la relavera Yanamate y en el Lago Junín.

Metales* (mg/l)	Relavera Yanamate		Lago Junín		ECA ** ppm
	Junio 2015	Noviembre 2015	Junio 2015	Noviembre 2015	
Arsénico	25.8 §	12.7 §	0.203 §	0.183 §	0.15 φ
Cadmio	1.5 §	0.5 §	0.046 §	0.016 §	0.00025 φ
Cobre	52.9 §	26.5 §	4.2 §	0.7 §	0.1 φ
Cromo	0.073 §	0.037 §	0.011 φ	0.011 φ	0.011 φ
Níquel	0.188 §	0.073 §	0.055 §	0.023 φ	0.052 φ
Plomo	0.135 §	0.217 §	1.6 §	1.6 §	0.0025 φ
Selenio	< 0.010 φ	< 0.010 φ	< 0.010 φ	< 0.010 φ	0.005 φ

\*Método: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) o Espectrofotometría de masas con plasma acoplado inductivamente - Instituto de Corrosión de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

\*\* (Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM). Categoría de agua IV.

§ Parámetros dentro de los Estándares de Calidad Ambiental (ECA)-Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM.

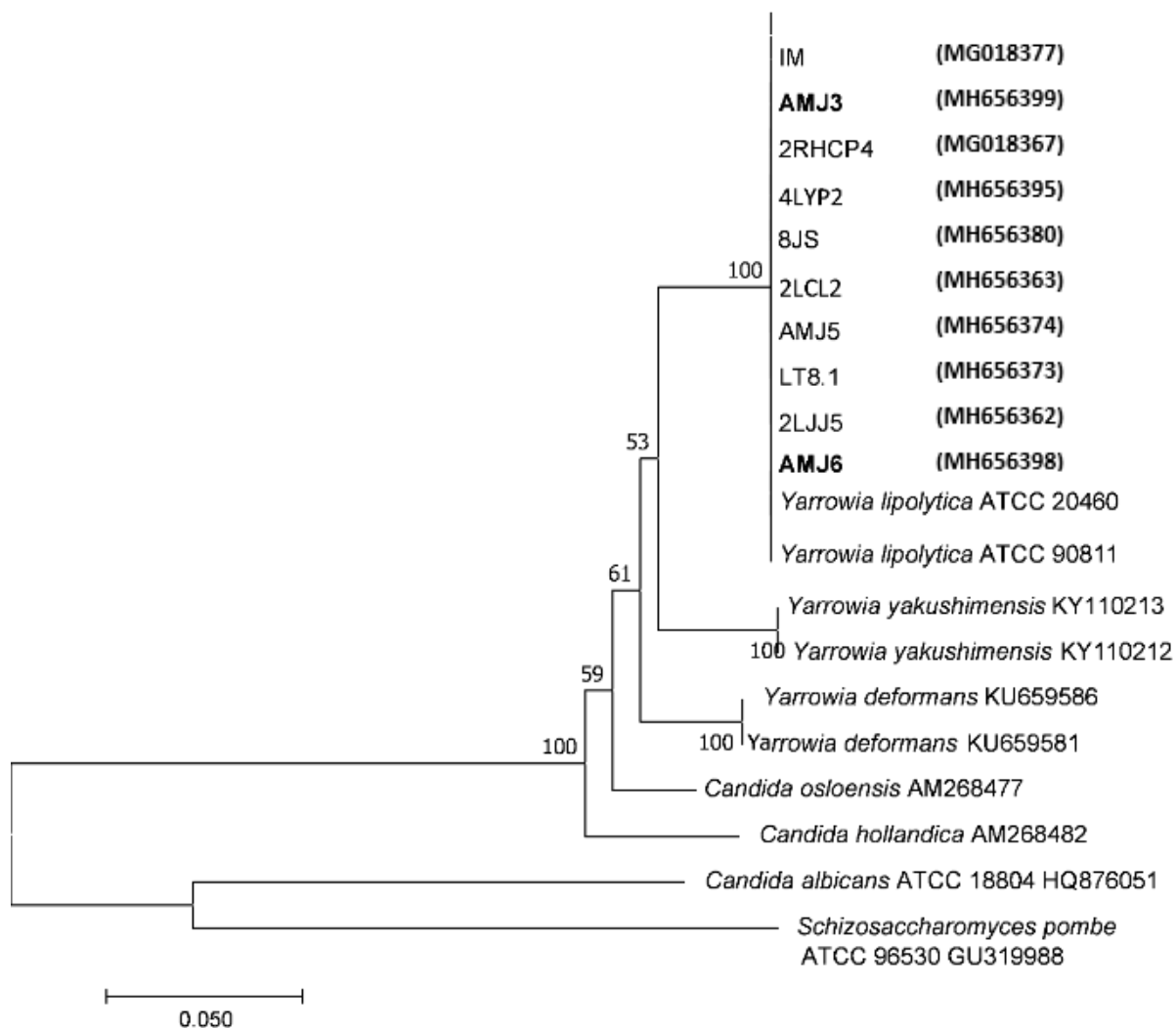
φ Concentraciones de metales que superan los ECA Nacionales por ICP-MS.

concentraciones de metales pesados, según lo reportado por Aduvire (2018) y en la presente investigación. Esta laguna fue utilizada hasta el 2005 para el vertimiento de aguas ácidas provenientes de la Mina de Cerro de Pasco Cooper Corporation y la compañía minera Volcán S.A.A., actualmente, es una relavera altamente contaminada (Dold *et al.*, 2009).

Aislamiento y selección de levaduras resistentes a metales pesados

A partir del muestreo, se aislaron 10 cepas de levaduras que crecieron a diferentes concentraciones de metales pesados (50 a 400 ppm) (Tabla 4). Las cepas seleccionadas para este estudio fueron AMJ3 y AMJ6, las cuales presentaron mayor CMI frente al ion  $\text{Cu}^{+2}$  y a los otros, tres iones metálicos ( $\text{Cr}^{+6}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  y  $\text{Hg}^{+2}$ ) (Tabla 4). Ambas cepas AMJ3 y AMJ6 crecieron en presencia del ion  $\text{Cu}^{+2}$  hasta 250 ppm y 400 ppm, respectivamente; la CMI frente a los iones  $\text{Cr}^{+6}$  y  $\text{Hg}^{+2}$ ,

fue de 50 ppm, para ambas cepas; con el ion  $\text{Cd}^{+2}$  la cepa AMJ3 creció hasta 100 ppm y la cepa AMJ6 hasta 150 ppm. Se sabe que algunos metales son oligoelementos para los organismos, importantes para el funcionamiento de algunas proteínas, como cofactores. Sin embargo, el exceso del metal, aun siendo esencial, en altas concentraciones, son tóxicos, tanto para los organismos eucariotas como procariotas (Hodson, 2004). Autores como Fu *et al.* (2010); Wang & Chen, (2006), 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) y Zn (1000 ppm), pero con mayor sensibilidad a As, Cd, Cr y Hg (100, 150, 250 y 50 ppm). Las levaduras seleccionadas (AMJ3 y AMJ6), presentaron CMI similares para los iones  $\text{Cd}^{+2}$  y  $\text{Hg}^{+2}$ . Los resultados obtenidos de resistencia a metales pesados, mediante



**Figura 1.** Árbol filogenético de 10 cepas construido por el método Neighbor Joining utilizando la región D1/D2 LSU de los aislados de levaduras resistentes a metales pesados. Se utilizó el modelo Kimura 2 parámetros y Bootstrap de 1 000 repeticiones. Las cepas AMJ3 y AMJ6 identificadas se emplearon en los diversos ensayos, del presente estudio, las cepas están con su código de acceso al GenBank.

ensayos de CMI, fueron referenciales para determinar la  $CL_{50}$  y la biosorción de los iones  $Cu^{+2}$  y  $Cr^{+6}$ .

#### Identificación Molecular y Filogenia

El análisis filogenético realizado con las 10 cepas aisladas fue inferido a partir de 450 bases nucleotídicas, aplicando el método de Kimura 2 parámetros, con 1 000 réplicas (*bootstraps*) (Figura 1). Todas las cepas analizadas formaron un mismo clado con la levadura *Y. lipolytica*. Las secuencias de las cepas AMJ3 y AMJ6 identificadas se depositaron al NCBI del GenBank, con código acceso MH656399 y MH656398, respectivamente. En la Tabla 4, se muestran la procedencia de las 10 cepas, la CMI, así mismo su identificación, según el código de acceso (BankIT) en el "National Center for Biotechnology Information" (NCBI).

Actualmente, la levadura *Y. lipolytica* es considerada como un modelo expresión y producción de lípidos y proteínas (Ito *et al.*, 2007; Nicaud, 2012; Michely *et al.*, 2013). También se menciona *Y. lipolytica*, como un microorganismo generalmente seguro, presenta versatilidad para degradar diferentes sustratos, tasas de crecimiento rápidos, diversidad y flexibilidad metabólicas, capacidades únicas para tolerar ambientes extremos (ácidos, alcalinos, hipersalinos, contaminación por metales pesados y otros) y su capacidad secretora de metabolitos. (Mamaev *et al.*, 2021).

#### Cinéticas de crecimiento de las cepas AMJ3 y AMJ6 (*Y. lipolytica*) en presencia de metales pesados.

Para evaluar la cinética de crecimiento se utilizaron los inóculos de la fase exponencial de cada uno de los cultivos. Los ensayos con la cepa *Y. lipolytica* AMJ3 exhibió una cinética de crecimiento con pendientes similares, para el control y con iones  $Cu^{+2}$ . Las fases de la cinética fueron continuas tanto en la fase de adaptación y exponencial, aproximadamente hasta las 60 h; sin embargo, se visualizó que la pendiente de AMJ3 con iones  $Cu^{+2}$  sobrepasó al control; después de las 40 h, en la fase estacionaria presentaron un pequeño incremento hasta las 96 h. La cinética de la cepa AMJ3 cultivada con iones  $Cr^{+6}$ , fue muy diferente, presentó una fase Lag hasta las 25 h, con pendiente cercana a cero, posteriormente se dio la fase exponencial, hasta aproximadamente las 60 h, con un ligero incremento en la fase estacionaria hasta las 96 horas (Figura 2A). Las fases exponencial y estacionaria con la cepa AMJ3, no estuvieron bien definidas. Los resultados de las réplicas de la cinética realizada, y su correspondiente análisis estadístico, se encuentran en las Tablas 5.1\_2 y 5.2\_2. Los iones  $Cr^{+6}$  son más tóxico que los iones  $Cu^{+2}$ , no obstante que la concentración de este último, fue ocho veces mayor que la del ion cromo. Estos resultados demuestran la baja toxicidad del cobre para ambas cepas, y sugieren que este metal, estimula el crecimiento en estas condiciones o se presentaría como un cofactor de síntesis de proteínas (Chen *et al.*, 2021). Se debe tener en consideración que el ion cobre es

necesario para que los diversos complejos citocromo oxidasa se mantengan activos, 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). Por otro lado, Arinbasarova *et al.* (2015) mencionan que el cobre es un elemento vital que puede llegar a extender la viabilidad de las levaduras.

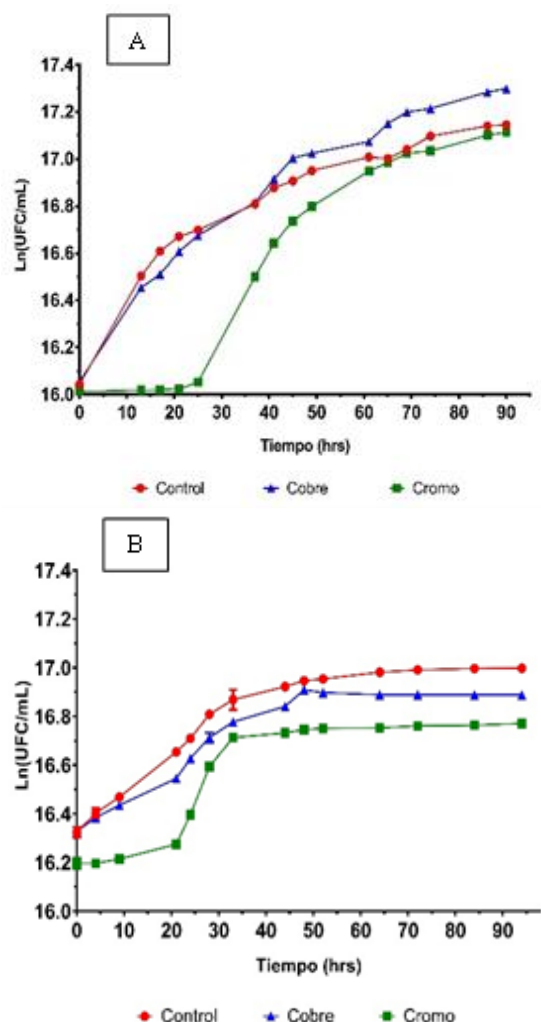
Según se observa en la Figura 2B, la cepa *Y. lipolytica* AMJ6 sin metal (control), no presentó una fase de adaptación, pero con pendiente fue menor, en la fase exponencial, en relación con la cepa AMJ3, la fase Log fue constante desde el inicio hasta las 30 h aproximadamente. Posteriormente, se incrementó hasta las 50 h, luego la fase estacionaria se mantuvo constante, hasta las 96 h. La cinética de la AMJ6 con los iones  $Cu^{+2}$ , fue menor, con relación al control, continuó con la fase exponencial, hasta las 50 h, después entró en fase estacionaria hasta las 96 h. La cinética de la cepa AMJ6 cultivada con iones  $Cr^{+6}$ , fue menor en comparación al cultivo control y con iones cobre. Presento fase Lag de 20 h; luego, la fase exponencial continuó hasta las 35 h aproximadamente, con una duración menor (15 h), continuó la fase estacionaria, hasta las 96 h. La cinética del control fue mayor a la cepa AMJ6 cultivada con iones  $Cu^{+2}$  y con iones  $Cr^{+6}$  (Figura 2 B). Las réplicas de la cinética realizada, y su correspondiente análisis estadístico, se encuentran descritas en las Tabla 6.1\_2 y 6.2\_2, respectivamente. Para la cepa AMJ6, los resultados muestran que el ion cromo también resultó ser más tóxico que el cobre, aunque la concentración del ion cobre fue cinco veces mayor, en comparación con el ion cromo. Los análisis estadísticos de tendencia central, de las réplicas de las cinéticas, en cada tratamiento, se reportan en las Tablas 5 y 6.

#### Ensayo de Citotoxicidad-Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ ).

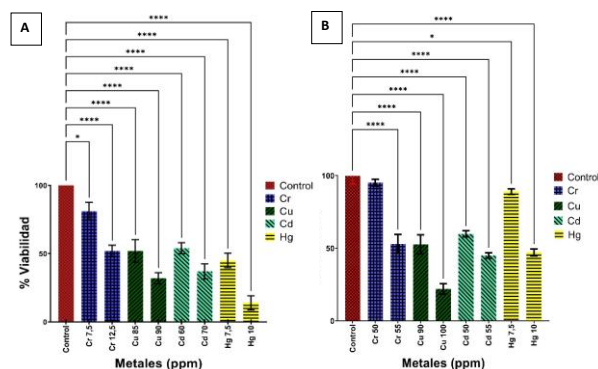
El análisis de citotoxicidad se realizó en las dos cepas seleccionadas de *Y. lipolytica* (AMJ3 y AMJ6) frente a cuatro iones metálicos, en el siguiente orden:  $Cr^{+6}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  y  $Hg^{+2}$ . Los controles fueron cultivados en medio YPG sin metal, en condiciones similares, obteniéndose una concentración final de  $6.5 \times 10^7$  y de  $11 \times 10^7$  UFC/ml para las cepas *Y. lipolytica* AMJ3 y AMJ6, respectivamente. La  $CL_{50}$  de *Y. lipolytica* AMJ3 fue 12.5 ppm (0.24 mM), 85 ppm (1.34 mM), 60 ppm (0.54 mM) y 7.5 ppm (0.04 mM) en el orden descrito ( $Cr^{+6}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  y  $Hg^{+2}$ ) (Figura 3A); en tanto, la cepa *Y. lipolytica* AMJ6 mostró una  $CL_{50}$  de 55 ppm (1.06 mM), 90 ppm (1.42 mM), 55 ppm (0.49 mM) y 10 ppm (0.05 mM) en el mismo orden ( $Cr^{+6}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  y  $Hg^{+2}$ ) (Figura 3B). Los resultados de la  $CL_{50}$  muestran que el metal más letal para ambas cepas fue el  $Hg^{+2}$ , seguido del  $Cr^{+6}$ ,  $Cd^{+2}$  y finalmente el  $Cu^{+2}$ . Los resultados de las réplicas y las desviaciones estándar de cada metal se encuentran en la Tabla 7.



Para la cepa AMJ3 se realizó el análisis de varianza por Brown- Forsythe ( $P = 0.7320$ ) y el análisis de ANOVA de una cola (one way - ANOVA) ( $P < 0.0001$ ); indicaría que las varianzas de las poblaciones son iguales para estos datos paramétricos y que las diferencias de los tratamientos de las medias son significativas con respecto al grupo control, de igual forma, para la cepa AMJ6. Los asteriscos en la figura muestran las diferencias significativas de las medias, de acuerdo a Brown- Forsythe ( $P = 0.5640$ ) y ANOVA de una cola (one way - ANOVA) ( $P < 0.0001$ ); indicaría que las varianzas de las poblaciones son similares, para estos datos paramétricos y que las diferencias de los tratamientos de las medias son significativas con respecto al grupo control.



**Figura 2.** Cinética de crecimiento de las cepas AMJ3 y AMJ6 (*Y. lipolytica*). Los valores son los promedios de tres réplicas y tratamientos en caldo YPG **A**) Cepa AMJ3: control (-●-), 80 ppm (1.26 mM) de  $\text{Cu}^{+2}$  (-▲-) y 10 ppm (0.192 mM) de  $\text{Cr}^{+6}$  (-■-) **B**) Cepa AMJ6: control (-●-), 80 ppm (1.26 mM) de  $\text{Cu}^{+2}$  (-▲-) y 15 ppm (0.29 mM) de  $\text{Cr}^{+6}$  (-■-); D.O ( $\lambda = 600$  nm).



**Figura 3.** Valores promedio de  $\text{CL}_{50}$  de las tres réplicas de la cepa AMJ3 (A) y AMJ6 (B) de *Yarrowia lipolytica*, expuestas por 3 horas a diferentes concentraciones frente a los iones metálicos ( $\text{Cr}^{+6}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  y  $\text{Hg}^{+2}$ ). Los asteriscos en la figura muestran las diferencias significativas de las medias con relación al control.

Jin *et al.* (2008), trabajaron con una cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* frente a los mismos iones metálicos:  $\text{Cr}^{+6}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  y  $\text{Hg}^{+2}$ , reportaron valores de  $\text{CL}_{50}$  en el orden descrito de: 90 ppm (0.9 mM), 445 ppm (7.0 mM), 3.4 ppm (0.03 mM) y 0.64 ppm (0.05 mM) respectivamente; comparadas con la  $\text{CL}_{50}$  del presente estudio, fue mayor para los iones  $\text{Cr}^{+6}$  y  $\text{Cu}^{+2}$ ; y, menor con los iones  $\text{Cd}^{+2}$  y  $\text{Hg}^{+2}$ . La mayor  $\text{CL}_{50}$  para los metales  $\text{Cr}^{+6}$  y  $\text{Cu}^{+2}$  se dio, en la cepa mutante *S. cerevisiae*, donde se incorporaron genes marcadores kanMX (resistencia a Kanamicina), ADE2 (enzima que cataliza la biosíntesis de nucleótidos de purina) y MET15 (enzima que cataliza la biosíntesis de nucleótidos de metionina).

Los estudios de Mesquita *et al.* (2015) enfrentaron una cepa de *Pichia kudriavzevii* a múltiples metales, entre ellos  $\text{Cd}^{+2}$  a una concentración de 0.045 mM por 6 h, mostraron una  $\text{CL}_{50}$  de 10 a 12 veces menor, que las cepas de *Y. lipolytica* AMJ3 y AMJ6. Igualmente, Hosiner *et al.* (2014) reportaron para *S. cerevisiae* la  $\text{CL}_{50}$  de 0.01 mM de  $\text{Cd}^{+2}$  en 12 h, donde la  $\text{CL}_{50}$  fueron de 54 y 49 veces menor, comparada con las cepas *Y. lipolytica* AMJ3 y AMJ6, expuestas por 3 h.

Los valores de la  $\text{CL}_{50}$  en estas cepas fueron fundamental para determinar su capacidad de biosorción de iones  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Cr}^{+6}$ , por lo cual se determinó la viabilidad celular frente a estos dos metales en las cepas *Y. lipolytica* AMJ3 y *Y. lipolytica* AMJ6; caso contrario, concentraciones mayores de metales en los ensayos de biosorción, podrían dar falsos negativos.

#### Biosorción de cromo y cobre.

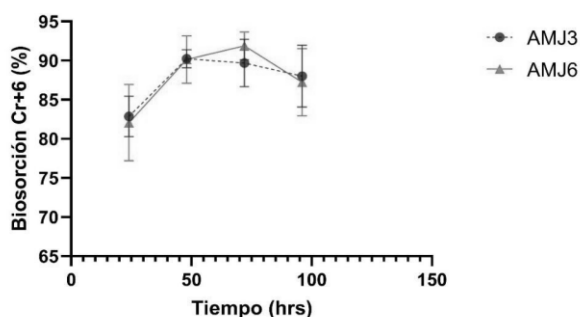
La biosorción es un proceso en el cual participan mecanismos pasivos y activos, incluye la bioadsorción, referida como la incorporación de metales por los microorganismos a nivel de superficie celular, el cual es un mecanismo pasivo (proceso fisicoquímico), sin



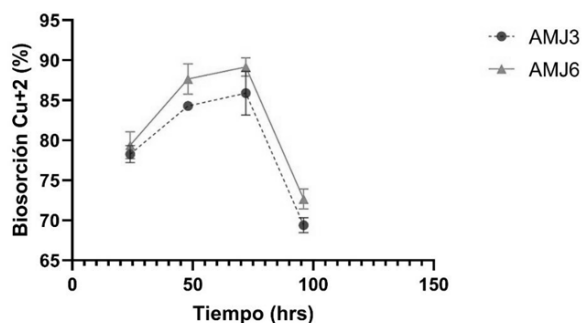
gasto de energía; en la bioabsorción y/o bioacumulación participan células vivas, mecanismo de transporte activo, con gasto de energía (Cañizares-Villanueva, 2000; Rehman *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2015).

Para determinar la biosorción de cada metal, se utilizaron concentraciones tomando como referencia los resultados de la CMI, las cinéticas de crecimientos y las  $CL_{50}$ . Las concentraciones con el ion  $Cr^{+6}$  fueron de 0.24 mM y 0.96 mM para las cepas *Y. lipolytica* AMJ3 y AMJ6, respectivamente; obteniéndose a las 72 h una biosorción promedio de las réplicas del 90% con la cepa *Y. lipolytica* AMJ3 y 92% con la cepa *Y. lipolytica* AMJ6; a las 96 h, fueron alrededor del 88% en ambas cepas (Figura 4); en las Tablas 8 y 9, se muestran los porcentajes de biosorción de cada réplica y sus promedios. Asimismo, es importante mencionar, que la mayor biosorción se obtuvo con *Y. lipolytica* AMJ6, a una concentración cuatro veces mayor del ion  $Cr^{+6}$ , en comparación con la cepa AMJ3. Bankar *et al.* (2009) emplearon biomasa muerta de *Y. lipolytica* en una solución de 50 ppm de  $Cr^{+6}$ , temperatura de 35 °C a pH 1, agitación de 130 rpm, reportaron una eficiencia máxima de bioadsorción de 95.84% después de 2 h de exposición al metal. En comparación, en el presente estudio la biosorción de  $Cr^{+6}$ , a las 72 h de cultivo, fue cercano al 92% con la cepa *Y. lipolytica* AMJ6 (Figura 4).

Para determinar la biosorción del ion  $Cu^{+2}$  en ambas cepas, se empleó una concentración de 1.26 mM (80 ppm), la biosorción promedio fue de 90% con la cepa *Y. lipolytica* AMJ3 y de 92% con la cepa *Y. lipolytica* AMJ6 alrededor de las 72 h; posteriormente en la fase estacionaria, ambas cepas los porcentajes de biosorción disminuyeron por debajo del 75%, debido al envejecimiento, acumulación de metabolitos y muerte celular (Figura 5). Los valores de los porcentajes de biosorción de las tres réplicas en cada ensayo, se encuentran en la Tabla S4.



**Figura 4.** Porcentajes de biosorción de las réplicas de iones  $Cr^{+6}$ , cepas *Y. lipolytica* AMJ3 con 12.5 ppm (0.24 mM) ( $\sigma=2.68$ ) y AMJ6 con 50 ppm (0.96 mM) ( $\sigma=3.50$ ). Tiempo de incubación 96 horas, 20 °C a 150 rpm.



**Figura 5.** Porcentajes de biosorción de las réplicas de iones  $Cu^{+2}$ , cepas *Y. lipolytica* AMJ3 ( $\sigma=1.31$ ) y AMJ6 ( $\sigma=1.49$ ) a 80 ppm (1.26 mM). Tiempo de incubación 96 horas, 20 °C a 150 rpm.

Acosta *et al.* (2005) reportaron la bioadsorción de  $Cr^{+6}$  por biomasa muerta de las cepas de los hongos *Cryptococcus neoformans* y *Helminthosporium* sp., sumergidos en una solución acuosa de 0.2 ppm de  $Cr^{+6}$ ; *C. neoformans* fue más eficiente en la remoción de  $Cr^{+6}$  (98%) que *Helminthosporium* sp. (65%). Es importante recalcar que en dicho estudio se utilizó un método de medición del ion  $Cr^{+6}$  similar al reportado en la presente investigación, en ambos estudios se cuantificaron los iones  $Cr^{+6}$  en los sobrenadantes. Sin embargo, las concentraciones de exposición al ion  $Cr^{+6}$  fueron mayores, 12.5 ppm (0.24 mM) con *Y. lipolytica* AMJ3 y 50 ppm (0.96 mM) con *Y. lipolytica* AMJ6, los porcentajes de biosorción estuvieron alrededor de 90% en ambas cepas, además nuestro trabajo fue realizado con células vivas, cultivadas hasta las 96 h. Así mismo, Campaña- Pérez *et al.*, 2019 señalan la capacidad de biosorción frente a los iones metálicos  $Cr^{+6}$  en caldo YPG a 100 ppm, con levaduras nativas de Ecuador, reportadas como *Kazachstania yasuniensis*, *Kodamaea transpacifica*, y *Saturnispora quitensis*, quienes reportan la capacidad de biosorción del 40%, en promedio, en las cepas sin tratamiento y mencionan un aumento significativo de biosorción del 80%, en tratamiento con surfactantes catiónicos (cloruro de benzalconio).

Dil *et al.* (2017) utilizaron biomasa viva de *Y. lipolytica* 70562 expuestas a 25 ppm de  $Cu^{+2}$  a pH 6.4, 25 °C por 8.1 h, reportaron 99.74% de biosorción. Si bien estos resultados fueron superiores a los obtenidos con las cepas de *Y. lipolytica* AMJ3 y AMJ6 (90% y 92%), es importante señalar, que en nuestros ensayos se enfrentaron ambas cepas con 80 ppm de iones  $Cu^{+2}$  donde las concentraciones fueron 3.2 veces mayores (Figura 5). Sun *et al.* (2015), trabajaron con la cepa de *S. cerevisiae* AWR1R2 en Medio Sintético Modelo (MSM), con 0.5 mM (32 ppm) de iones  $Cu^{+2}$  a 28 °C, 120 rpm, la eficiencia de biosorción fue de 67.37%. Por otro lado, realizaron análisis de microscopía electrónica diferencial y de ICP-AES,

demonstraron que la **bioadsorción** dominó al proceso de **bioabsorción** de  $\text{Cu}^{+2}$ .

Los estudios de Rehman *et al.* (2007), sobre tolerancia y biosorción de iones  $\text{Cu}^{+2}$  a una concentración de 100 ppm, por *Candida tropicalis*, demostraron una eficiencia de biosorción de 82% a las 96 h; valor cercano al obtenido con las cepas *Y. lipolytica* AMJ3 y AMJ6 (90% y 92%) a las 72 h. Otros estudios de Rehman *et al.* (2008) sobre biosorción de iones  $\text{Cu}^{+2}$  a 0.1 ppm, pH 8.0 a 30 °C por *Loddermyces elongisporus*, obtienen 81% de biosorción después de 96 h, resultados similares a la presente investigación; sin embargo, las concentraciones de iones  $\text{Cu}^{+2}$  fueron 800 veces superiores (80 ppm) en las cepas *Y. lipolytica* AMJ3 y AMJ6. También Dönmez & Aksu (2001) evaluaron la biosorción del ion  $\text{Cu}^{+2}$  en medio YPG, a pH 4.0 con *Candida* sp., adaptada (expuesta previamente al metal) y no adaptada (no expuesta previamente al metal) frente al ion  $\text{Cu}^{+2}$ . Observaron una biosorción de 52.1% a una concentración de 92.2 ppm, con la cepa no adaptada y de 67.6% a una concentración de 97.6 ppm, con la cepa adaptada en un tiempo de exposición de 8 días. En los ensayos realizados se obtuvieron resultados superiores, con las cepas *Y. lipolytica* AMJ3 y AMJ6 (90% y 92%) en un cultivo de 72 h, a una concentración de 80 ppm.

Para los ensayos de biosorción, se tomó como referencia a Rehman *et al.* (2008), algunos autores, difieren a los reportados en la presente investigación, la mayoría de los estudios de biosorción de metales, trabajan con biomasa muerta o viva (*pellets celulares*), por lo cual los resultados, se reportan en mg/gramo de biomasa (peso seco), en la presente investigación cuantificamos la capacidad biosorción frente a un metal, a partir de los sobrenadantes en mM o ppm.

### Conclusiones

En la presente investigación se estudiaron dos levaduras extremófilas de aguas altoandinas contaminadas con relaves mineros, se determinó la Cinética de Crecimiento, CMI, la  $\text{CL}_{50}$  frente a cuatro iones metálicos ( $\text{Cr}^{+6}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  y  $\text{Hg}^{+2}$ ), donde el ion  $\text{Hg}^{+2}$  fue el más tóxico para ambas cepas, seguido de los iones  $\text{Cd}^{+2}$  y  $\text{Cr}^{+6}$ , el metal menos tóxico fue el ion  $\text{Cu}^{+2}$ . La biosorción de los iones  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Cr}^{+6}$  fueron cercanas al 90% en ambas cepas de *Y. lipolytica* AMJ3 y AMJ6. Los resultados obtenidos de CMI y  $\text{CL}_{50}$  nos indican que las levaduras son tolerantes a varios iones metálicos; además, tienen alta capacidad de biosorción de estos metales, por lo cual, podrían ser candidatas potenciales en la biorremediación de aguas y suelos agrícolas, contaminados con metales pesados. Por otro lado, es importante recalcar que, en algunos parámetros fisicoquímicos, los ECA del lago Junín mostraron ligera contaminación para los metales (arsénico, cadmio y cobre); sin embargo, en Yanamate los resultados del análisis de metales pesados fueron muy

altos y con pH muy ácidos, fuera a los ECA establecidos para cuerpos de agua de tipo IV.

### Agradecimientos

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 Innóvate Perú, Convenio N° 391-PNICP-PIAP-2014.

### Literatura citada

- Acosta I., Moctezuma-Zárate M.G., 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): 0718-0764. DOI:10.4067/S0718-07642005000100003.
- Aduvire O., Quinteros J. & Mazadiego L. 2018. Aplicación de los índices geomecánicos en el arranque de rocas mediante excavación o voladura. Investigación Minera. N° registro: TT-076. <https://www.eadic.com/wp-content/uploads/2013/12/TT-076-Final.pdf>.
- ANA. 2010. Evaluación de recursos hídricos superficiales en la cuenca del río Mantaro. Tomo I. ANA (Autoridad Nacional del Agua) / Ministerio de Agricultura. Lima, Perú. [hdl.handle.net/20.500.12543/1968](http://hdl.handle.net/20.500.12543/1968).
- ANA. 2011. Protocolo de Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos. ANA (Autoridad Nacional del Agua) / Ministerio de Agricultura. Perú. [www.gwp-globalassets/global/gwp-sam\\_files/publicaciones/varios/2011-protocolo-anaperu.pdf](http://www.gwp-globalassets/global/gwp-sam_files/publicaciones/varios/2011-protocolo-anaperu.pdf).
- APHA, AWWA & WEF. 2012. Standard Methods for Examination of Water and Waste Water. 22nd Edition, American Public Health Association, Washington DC. [https://beta-static.fishersci.com/content/dam/fishersci/en\\_US/documents/programs/scientific/technical-documents/white-papers/apha-water-testing-standard-methods-introduction-white-paper.pdf](https://beta-static.fishersci.com/content/dam/fishersci/en_US/documents/programs/scientific/technical-documents/white-papers/apha-water-testing-standard-methods-introduction-white-paper.pdf).
- Arinbasarova A.Y., Biryukova E.N. & Medentsev A.G. 2015. Antistress systems of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Applied Biochemistry and Microbiology, 51(2): 135-142. [Original Russian Text © A.Yu. Arinbasarova, E.N. Biryukova, A.G. Medentsev, 2015, published in Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya, 2015, Vol. 51, No. 2, pp. 122-131.]. <https://link.springer.com/article/10.1134/S0003683815020027>.
- Bahafid W., Joutey N.T., Asri M., Sayel H., Tirry N. & El Ghachtouli N. 2017. Yeast biomass: an alternative for bioremediation of heavy metals (Chapter 12). Yeast-Industrial Applications, 269-289. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.70559>.
- Bankar A.V., Kumar A.R. & Zinjarde S. 2009. Removal of chromium (VI) ions from aqueous solution by adsorption onto two marine isolates of *Yarrowia lipolytica*. Journal of Hazardous Materials, 170(1): 487-494. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.04.070.

- Bianchini F. 2009. Evaluación de la Calidad de los Recursos Hídricos en la Provincia de Pasco y de la Salud en el Centro Poblado de Paragsha. Asociación Civil Centro de Cultura Popular Labor. Pasco / Perú. [https://laborpascoperu.org.pe/wp-content/uploads/2020/08/Libro\\_Flaviano.pdf](https://laborpascoperu.org.pe/wp-content/uploads/2020/08/Libro_Flaviano.pdf).
- Botha A. 2011. The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(1), 1-8. DOI:10.1016/j.soilbio.2010.10.001.
- Campana-Pérez J.F., Portero P., Martín-Ramos P. & Carvajal E.J. 2019. Ecuadorian yeast species as microbial particles for Cr (VI) biosorption. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(27): 28162-28172. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-019-06035-8>.
- Cañizares-Villanueva R.O. 2000. Heavy metals biosorption by using microbial biomass. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(3): 131-143. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=10632>.
- Castillo J.H. 2008. Influencia antropogénica minera de la especie endémica *Batrachophrynus macrostomus* Peters, 1873 en peligro de extinción del lago Chinchaycocha (Pasco, Junín) 2007. Tesis para optar el grado académico de Doctoral en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. <dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/5903>.
- Cusiche L.F. & Miranda G.A. 2019. Contaminación por aguas residuales e indicadores de calidad en la Reserva Nacional 'Lago Junín', Perú. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(6), 1433-1447. DOI: 10.29312/remexca.v10i6.1870.
- Chen Y., Li F., Mao J., Chen Y. & Nielsen J. 2021. Yeast optimizes metal utilization based on metabolic network and enzyme kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(12): e2020154118. DOI: 10.1073/pnas.2020154118.
- DIGESA. 2003. RESOLUCIÓN MINISTERIAL N° 615-2003-SA/DM: Aprueban el documento "Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano" RM del 30 de mayo del 2003. *El Peruano: Normas Legales*, 22(8406): 246849-246862. Sábado 28 de junio de 2003. <https://busquedas.elperuano.pe/download/full/4Lower0q3b8xHOHkJPxQW>.
- Dil E.A., Ghaedi M., Ghezlbash G.R., Asfaram A. & Purkait M.K. 2017. Highly efficient simultaneous biosorption of Hg<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> by Live yeast *Yarrowia lipolytica* 70562 following response surface methodology optimization: Kinetic and isotherm study. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 48: 162-172. DOI:10.1016/j.jiec.2016.12.035.
- Dinesen L., Chamorro A., Fjeldsá J. & Auca C. 2018. Long-term declines in waterbirds abundance at Lake Junín, Andean Peru. *Bird Conservation International*, 29(1): 83-99. DOI:10.1017/S0959270918000230.
- Dold B., Wade C. & Fontboté L. 2009. Water management for acid mine drainage control at the polymetallic Zn-Pb-(Ag-Bi-Cu) deposit Cerro de Pasco, Peru. *Journal of Geochemical Exploration*, 100(2-3): 133-141. DOI:10.1016/j.gexplo.2008.05.002.
- 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. DOI: 10.1016/S0043-1354(00)00394-8.
- Doyle J. 1991. DNA Protocols for Plants. In: Hewitt G.M., Johnston A.W.B. & Young J.P.W. (eds) *Molecular Techniques in Taxonomy*. NATO ASI Series, vol 57. Springer. Berlin, Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-83962-7\_18.
- Dudeja S.S., Singh N.P., Sharma P., Gupta S.C., Chandra R., Dhar B., Bansal R.K., Brahmaprakash G.P., Potdukhe S.R., Gundappagol R.C., Gaikawad B.G. & Nagaraj K.S. 2011. Biofertilizer technology and pulse production. In: *Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol*. 43-63. Part of the Soil Biology book series (SOILBIOL, volume 108). Springer. Berlin \ Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-19769-7\_3.
- EPA. 1994. Method 200.7. Determination of metals and trace elements in water and wastes by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. Revision 4.4 EMMC Version. EPA (U. S. Environmental Protection Agency). [https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-08/documents/method\\_200-7\\_rev\\_4-4\\_1994.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-08/documents/method_200-7_rev_4-4_1994.pdf).
- Fu Q., Li W.-X., Yao Y., Liu H., Su H.-Y., Ma D., Gu X.-K., Chen L., Wang Z., Zhang H., Wang B. & Bao X. 2010. Interface-confined ferrous centers for catalytic oxidation. *Science*, 328(5982): 1141-1144. DOI: 10.1126/science.1188267.
- Fu S.-F., Sun P.-F., Lu H.-Y., Wei J.-Y., Xiao H.-S., Fang W.-T., Cheng B.-Y. & Chou, J. Y. 2016. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. *Fungal biology*, 120(3): 433-448. DOI: 10.1016/j.funbio.2015.12.006.
- Gizaw B., Tsegay Z., Tefera G., Aynalem E., Wassie M. & Abatneh E. 2017. Phosphate solubilizing fungi isolated and characterized from Teff rhizosphere soil collected from North Showa zone, Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research*, 11(17): Article Number 66AF57F64120: 687-696. DOI: 10.5897/AJMR2017.8525.
- 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005946200>.
- Higa T. & Parr J.F. 2013. Microorganismos Benéficos y efectivos para una agricultura y medio ambiente sostenibles. Maryland (USA): Centro internacional de Investigación de Agricultura Natural, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, 13. [Versión traducida de: Higa T. & Parr, J. F. 1994. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. International Nature Farming Research Center. Atami, Japan. <https://www.bokashi.se/dokument/bibliotek/EM.pdf>. <https://itscv.edu.ec/wp-content/uploads/2018/10/MICROORGANISMOS-DEL-SUELO-PARA-LA-AGRICULTURA.pdf>. [https://cdn.goconqr.com/uploads/media/pdf\\_media/42178589/ef577365-1bb5-4922-a61b-1e268f8784d6.pdf](https://cdn.goconqr.com/uploads/media/pdf_media/42178589/ef577365-1bb5-4922-a61b-1e268f8784d6.pdf).
- Hodson M.E. 2004. Heavy metals—geochemical bogey men? *Environmental Pollution*, 129(3): 341-343. DOI: 10.1016/j.envpol.2003.11.003.

- Hosiner D., Gerber S., Lichtenberg-Fraté H., Glaser W., Schüller C. & Klipp E. 2014. Impact of Acute Metal Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. PLOS ONE, 9(1): e83330. DOI: 10.1371/journal.pone.0083330.
- Ito H., Inouhe M., Tohoyama H. & Joho M. 2007. Characteristics of copper tolerance in *Yarrowia lipolytica*. BioMetals, 20(5): 773-780. DOI: 10.1007/s10534-006-9040-0.
- Jin Y.H., Dunlap P.E., McBride S.J., Al-Refai H., Bushel P.R. & Freedman J.H. 2008. Global Transcriptome and Deletome Profiles of Yeast Exposed to Transition Metals. PLOS Genetics, 4(4): e1000053. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000053.
- Kumar S., Stecher G. & 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.
- Loza A. & Mendoza W. 2017. Evaluación poblacional y de estado de conservación de *Telmatoibius macrostomus* Peters, 1873 (Anura: Telmatobiidae) en humedales altoandinos, Región Pasco (Perú). Revista de Investigaciones Altoandinas, 19(2): 145-156. DOI: 10.18271/ria.2017.273.
- Mamaev D. & Zvyagilskaya R. 2021. *Yarrowia lipolytica*: A multitolerant yeast species of ecological significance. FEMS Yeast Research, 21(2): foab008. DOI: 10.1093/femsyr/foab008.
- Mesquita V.A., Machado M.D., Silva C.F. & Soares E.V. 2015. Impact of multi-metals (Cd, Pb and Zn) exposure on the physiology of the yeast *Pichia kudriavzevii*. Environmental Science and Pollution Research, 22: 11127-11136. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-015-4326-9>.
- Michely S., Gaillardin C., Nicaud J.M. & Neuvéglise C. 2013. Comparative physiology of oleaginous species from the *Yarrowia* clade. PLOS ONE, 8(5): e63356. DOI: 10.1371/journal.pone.0063356.
- MINAM (Ministerio del Ambiente / PE). 2012. Resolución Suprema 002-2012-MINAM: Plan de manejo ambiental sostenible Chinchaycocha 2012-2016. El Peruano (Normas Legales), 29(11873): 468035-468035. Sábado 9 de junio de 2012. [http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2013/09/rs-002-2012-minam-plan\\_manejo\\_ambiental.pdf](http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2013/09/rs-002-2012-minam-plan_manejo_ambiental.pdf). <https://busquedas.elperuano.pe/normaslegales/aprueban-el-plan-de-manejo-ambiental-sostenible-chinchaycoch-resolucion-suprema-n-002-2012-minam-799555-7/>. <https://busquedas.elperuano.pe/download/full/BCWOWp9bKWUApheyGXepRn>.
- MINAM (Ministerio del Ambiente / PE). 2017. Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM: Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua y establecen Disposiciones Complementarias. Diario (Oficial) El Peruano (Normas Legales), 34(14101): 10-19. miércoles 7 de junio de 2017. [busquedas.elperuano.pe/download/full/A9FfboQZawNAtgAiwXkB6T](https://busquedas.elperuano.pe/download/full/A9FfboQZawNAtgAiwXkB6T).
- MINEM (Ministerio de Energía y Minas / PE). 2009. Resolución del Consejo de Minería N° 499-2009 / CM. Dirección General de Minería.
- MINSA (Ministerio de Salud / PE). 2011. Análisis de Situación de Salud de la Región Pasco. Dirección Regional de Salud en Pasco.
- Nicaud J.M. 2012. *Yarrowia lipolytica*. Yeast, 29(10): 409-418. DOI: 10.1002/yea.2921.
- 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. DOI: 10.15381/rpb.v15i1.1681.
- Rehman A., Farooq H. & Hasnain S. 2008. Biosorption of copper by yeast, *Loddermyces elongisporus*, isolated from industrial effluents: its potential use in wastewater treatment. Journal of Basic Microbiology, 48(3): 195-201. DOI: 10.1002/jobm.200700324.
- Rehman A., Farooq H. & Shakoori A.R. 2007. Copper tolerant yeast, *Candida tropicalis*, isolated from industrial effluents: Its potential use in wastewater treatment. Pakistan Journal of Zoology, 39(6): 405-412. [zsp.com.pk/pdf3/405-412%20\(9\).pdf](http://zsp.com.pk/pdf3/405-412%20(9).pdf).
- Skousen J., Rose A., Geidel G., Foreman J., Evans R. & Hellier W. 1998. A Handbook of technologies for avoidance and remediation of acid mine drainage. National Mine Land Reclamation Center, located at West Virginia University in Morgantown, West Virginia. [www.wvu.edu/files/d/c2e42b2b-e40d-4ada-8bad-3c264d867e76/99-handbook-avoidance-remediation.pdf](http://www.wvu.edu/files/d/c2e42b2b-e40d-4ada-8bad-3c264d867e76/99-handbook-avoidance-remediation.pdf).
- Sun X.-Y., Zhao Y., Liu L.-L., Jia, B., Zhao F., Huang W.-D. & Zhan J.-C. 2015. Copper Tolerance and Biosorption of *Saccharomyces cerevisiae* during Alcoholic Fermentation. PLOS ONE, 10(6): e0128611. DOI: 10.1371/journal.pone.0128611.
- Vega-Centeno P. 2011. Los efectos urbanos de la minería en el Perú: del modelo de Cerro de Pasco y La Oroya al de Cajamarca. Apuntes: Revista de Ciencias Sociales, 38(68): 109-136. <https://doi.org/10.21678/apuntes.68.621>.
- Wade C., Dold B. & Fontboté L. 2006. Geochemistry and Mineralogy of the Quiulacocha Tailings Impoundment from the Polymetallic Zn-Pb-(Ag-Bi-Cu) Deposit Cerro De Pasco, Peru. In: Barnhisel R.I. (Ed.) 7th International Conference on Acid Rock Drainage (ICARD), March 26-30, 2006, St. Louis MO. 2199-2206. American Society of Mining and Reclamation (ASMR). DOI: 10.21000/JASMR06022198.
- Wang J. & Chen C. 2006. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. Biotechnology Advances, 24(5): 427-451. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.03.001.

**Tabla 4.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de levaduras en caldo YPG a diferentes concentraciones de metales pesados, sembradas a 20 °C, 150 rpm, pH 4 por 14 días. Aisladas de las regiones altoandinas de Junín y Pasco. Las cepas seleccionadas se encuentran sombreadas.

Cepas	Código Acceso*	Lugar de muestreo	Metales	Concentraciones de metales pesados en ppm o mg/l								
				50	100	150	200	250	300	350	400	
AMJ3	MH656399	Lago Junín	Cd+2	+	+	-	-	-	-	-	-	-
			Cu+2	++++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	
			Cr+6	+	-	-	-	-	-	-	-	
			Hg+2	+	-	-	-	-	-	-	-	
IM	MG018377	Lago Junín	Cd+2	+	-	-	-	-	-	-	-	-
			Cu+2	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	
			Cr+6	+	-	-	-	-	-	-	-	
			Hg+2	-	-	-	-	-	-	-	-	
AMJ5	MH656374	Lago Junín	Cd+2	+++	+++	++	-	-	-	-	-	
			Cu+2	+++	-	-	-	-	-	-	-	
			Cr+6	+	-	-	-	-	-	-	-	
			Hg+2	-	-	-	-	-	-	-	-	
2RHCP4	MH656397	Relavera Huarón (Pasco)	Cd+2	+++	++	+	-	-	-	-	-	
			Cu+2	+++	-	-	-	-	-	-	-	
			Cr+6	+	-	-	-	-	-	-	-	
			Hg+2	-	-	-	-	-	-	-	-	
4RYP2	MH656395	Relavera Yanamate Ppasco)	Cd+2	+++	++	+	-	-	-	-	-	
			Cu+2	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	
			Cr+6	+	-	-	-	-	-	-	-	
			Hg+2	-	-	-	-	-	-	-	-	
AMJ6	MH656398	Lago Junín	Cd+2	+++	+++	+	-	-	-	-	-	
			Cu+2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	
			Cr+6	+	+	-	-	-	-	-	-	
			Hg+2	+	-	-	-	-	-	-	-	
8JS	MG018378	Lago Junín	Cd+2	+++	-	-	-	-	-	-	-	
			Cu+2	+++	+++	-	-	-	-	-	-	
			Cr+6	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Hg+2	-	-	-	-	-	-	-	-	
2LCL2	MG018361	Laguna Canchis (Junín)	Cd+2	++	+	+	-	-	-	-	-	
			Cu+2	++	+	-	-	-	-	-	-	
			Cr+6	+	-	-	-	-	-	-	-	
			Hg+2	-	-	-	-	-	-	-	-	
LT81	MG018364	Lago Junín	Cd+2	++	+	+	-	-	-	-	-	
			Cu+2	+++	++	+	-	-	-	-	-	
			Cr+6	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Hg+2	-	-	-	-	-	-	-	-	
2LJJ5	MH656362	Lago Junín	Cd+2	+++	++	+	+	-	-	-	-	
			Cu+2	++	+	+	-	-	-	-	-	
			Cr+6	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Hg+2	-	-	-	-	-	-	-	-	

-: Ausencia de turbidez. +: Presencia de turbidez. ++: Regular turbidez. +++: Buena turbidez. +++: Excelente turbidez. La turbidez se midió a una densidad óptica ( $\lambda = 600$  nm).

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

**Tabla 5.1\_2.** Cinéticas de crecimiento de las cepas AMJ3 en caldo YPG pH: 4. UFC/ml. 150 RPM, inóculo 10% (v/v). (Análisis en **Tabla 5.2\_2**).

TIEMPO	CONTROL			CROMO			COBRE		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
0	16.041	16.043	16.046	16.013	16.013	16.013	16.056	16.054	16.054
13	16.506	16.507	16.497	16.017	16.019	16.022	16.45	16.456	16.457
17	16.598	16.613	16.615	16.017	16.022	16.022	16.51	16.513	16.51
21	16.672	16.674	16.667	16.024	16.022	16.026	16.598	16.601	16.623
25	16.699	16.699	16.697	16.06	16.052	16.046	16.672	16.677	16.679
37	16.805	16.809	16.813	16.502	16.501	16.498	16.817	16.813	16.815
41	16.879	16.883	16.871	16.639	16.644	16.642	16.916	16.919	16.912
45	16.905	16.908	16.908	16.737	16.739	16.734	17.008	17.005	17.002
49	16.948	16.951	16.954	16.797	16.799	16.801	17.022	17.025	17.025
61	17.012	17.008	17.005	16.951	16.951	16.944	17.075	17.078	17.069
65	17.002	16.999	17.005	16.985	16.985	16.982	17.158	17.152	17.141
69	17.044	17.041	17.038	17.025	17.025	17.022	17.202	17.199	17.197
74	17.099	17.096	17.096	17.031	17.034	17.038	17.215	17.213	17.215
86	17.143	17.141	17.138	17.099	17.102	17.102	17.282	17.285	17.285
90	17.146	17.143	17.146	17.108	17.114	17.12	17.295	17.3	17.302

Los valores expresados se encuentran en base logaritmo neperiano ( $L_n$ ) de las UFC/ml.

**Tabla 5.2\_2.** Análisis estadístico de tendencia central de la **Tabla 5.1\_2**.

	Control	Cromo	Cobre
Número de valores	15	15	15
Mínimo	16.04	16.01	16.05
25% Percentil	16.67	16.02	16.61
Media	16.91	16.74	17.01
75% Percentil	17.04	17.02	17.2
Máximo	17.15	17.11	17.3
Media	16.83	16.6	16.89
Desviación estándar	0.2944	0.4529	0.3605
Error estándar de la media	0.07601	0.1169	0.09307
Bajo 98% CI de la media	16.63	16.29	16.64
Sobre 98% CI de la media	17.03	16.91	17.13
Coefficiente de variación	1.75%	2.73%	2.13%
Sumatoria	252.5	249	253.3

**Tabla 6.1\_2** Cinéticas de crecimiento de las cepas AMJ6 en caldo YPG pH: 4. UFC/ml. 150 RPM, inoculo 10% (v/v). (Análisis en **Tabla 6.2\_2**).

TIEMPO	CONTROL			CROMO			COBRE		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
0	16.317	16.349	16.307	16.221	16.18	16.188	16.346	16.327	16.314
4	16.426	16.396	16.387	16.213	16.188	16.191	16.374	16.402	16.377
9	16.474	16.469	16.463	16.21	16.228	16.206	16.434	16.426	16.446
21	16.649	16.656	16.658	16.273	16.29	16.263	16.56	16.524	16.552
24	16.699	16.717	16.713	16.384	16.402	16.405	16.613	16.644	16.625
28	16.801	16.821	16.805	16.588	16.586	16.61	16.734	16.695	16.71
33	16.897	16.888	16.821	16.715	16.708	16.717	16.781	16.773	16.779
44	16.916	16.926	16.925	16.728	16.739	16.73	16.841	16.845	16.837
48	16.937	16.948	16.954	16.743	16.747	16.749	16.905	16.916	16.907
52	16.944	16.972	16.946	16.747	16.749	16.756	16.901	16.897	16.896
64	16.985	16.977	16.982	16.756	16.754	16.749	16.89	16.894	16.884
72	16.99	16.989	16.994	16.762	16.764	16.758	16.89	16.894	16.884
84	16.995	16.999	16.997	16.764	16.768	16.76	16.89	16.894	16.884
94	16.999	16.995	17	16.77	16.773	16.77	16.89	16.894	16.884

Los valores expresados se encuentran en base logaritmo neperiano ( $L_n$ ) de las UFC/ml.

**Tabla 6.2\_2.** Análisis estadístico de tendencia central de la **Tabla 6.1\_2**.

	Control	Cromo	Cobre
Número de valores	14	14	14
Mínimo	16.32	16.2	16.33
25% Percentil	16.61	16.26	16.52
Media	16.9	16.72	16.81
75% Percentil	16.98	16.76	16.89
Máximo	17	16.77	16.91
Media	16.79	16.56	16.72
Desviación Estándar	0.2375	0.2449	0.2122
Error estándar de la media	0.06347	0.06547	0.05673
Bajo 98% CI de la media	16.62	16.39	16.57
Sobre 98% CI de la media	16.96	16.74	16.87
Coefficiente de variación	1.41%	1.48%	1.27%
Sumatoria	235	231.9	234

**Tabla 7.** Resultados en UFC/ml de la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) cercanas al 50%, de las cepas AMJ3 y AMJ6, frente a diferentes concentraciones de metales pesados, sembradas en caldo YPG a 20 °C, pH 4 por 48 horas.

AMJ3	Placa 1 (♣)	Placa 2 (♣)	placa 3 (♣)	$\bar{x}$	X1%	X2%	X3%	% Células viables ( $\bar{x}$ )	% Células muertas	$\sigma$
Control	338	258	296	297	113.80	86.87	99.66	100	0	13.47
Cr 7.5	238	224	262	241	79.99	75.29	88.06	81	19	6.46
Cr 12.5	158	164	140	154	53.35	55.38	47.27	52	48	4.22
Cu 85	149	182	134	155	49.99	61.06	44.95	52	48	8.24
Cu 90	92	83	107	94	31.32	28.26	36.43	32	68	4.13
Cd 60	164	149	173	162	54.67	49.67	57.67	54	46	4.04
Cd 70	113	125	92	110	38.01	42.05	30.95	37	53	5.62
Hg 7.5	146	140	116	134	49.03	47.01	38.96	45	55	5.33
Hg 10	57	39	27	41	19.46	13.32	9.22	14	86	5.16
<b>AMJ6</b>										
Control	271	242	254	256	105.86	94.53	99.22	100	0	5.69
Cr 50	236	248	243	242	92.64	97.36	95.39	95	5	2.37
Cr 55	136	118	151	135	53.39	46.33	59.28	53	7	6.49
Cu 90	138	119	146	134	53.91	46.48	57.03	52	48	5.42
Cu 100	60	65	47	57	23.44	25.39	18.36	22	78	3.63
Cd 50	159	154	148	154	61.95	60.00	57.66	60	40	2.15
Cd 55	120	115	110	115	46.96	45.00	43.04	45	55	1.96
Hg 7.5	228	223	233	228	89.00	87.05	90.95	89	11	1.95
Hg 10	125	120	113	119	49.37	47.39	44.63	47	53	2.38

♣: UFC/ml.  $\bar{x}$ : Promedio.  $\sigma$ : Desviación estándar.



**Tabla 8.** Porcentaje de biosorción de cromo en las réplicas (E1, E2 y E3) con las cepas AMJ3 y AMJ6 en cultivos de 96 horas.

Cepas	Cr <sup>+6</sup> (ppm)	Tiempo (h)	E1 %	E2 %	E3 %	X%	(S)	(S <sup>2</sup> )
AMJ3	Cr <sup>+6</sup> 15	24	80	83.6	85	82.87	2.58	6.65
AMJ3	Cr <sup>+6</sup> 15	48	89	90.48	91.26	90.25	1.15	1.32
AMJ3	Cr <sup>+6</sup> 15	72	86.4	90.34	92.34	89.69	3.02	9.13
AMJ3	Cr <sup>+6</sup> 15	96	83.6	89.18	91.24	88.01	3.95	15.62
AMJ6	Cr <sup>+6</sup> 50	24	78.4	80.16	87.6	82.05	4.88	23.85
AMJ6	Cr <sup>+6</sup> 50	48	87.04	90.3	93.1	90.15	3.03	9.20
AMJ6	Cr <sup>+6</sup> 50	72	91.16	90.6	93.94	91.90	1.79	3.20
AMJ6	Cr <sup>+6</sup> 50	96	83	87.08	91.6	87.23	4.30	18.51

Promedio (X), desviaciones estándar (S) y varianzas (S<sup>2</sup>).

**Tabla 9.** Porcentaje de biosorción de cobre en las réplicas (E1, E2 y E3) con las cepas AMJ3 y AMJ6 en cultivos de 96 horas.

Cepas	Cu <sup>+2</sup> (ppm)	Tiempo (h)	E1 %	E2 %	E3 %	X%	(S)	(S <sup>2</sup> )
AMJ3	Cu <sup>+2</sup> 80	24	79.38	77.25	78.13	78	1.07	1.37
AMJ3	Cu <sup>+2</sup> 80	48	84.88	83.88	84.13	84	0.52	0.62
AMJ3	Cu <sup>+2</sup> 80	72	87.25	82.75	87.65	86	2.72	3.17
AMJ3	Cu <sup>+2</sup> 80	96	68.38	69.5	70.25	69	0.94	1.36
AMJ6	Cu <sup>+2</sup> 80	24	77.63	79.5	81	79	1.69	2.13
AMJ6	Cu <sup>+2</sup> 80	48	85.5	88.5	89	88	1.89	2.16
AMJ6	Cu <sup>+2</sup> 80	72	87.88	89.5	90.13	89	1.16	1.30
AMJ6	Cu <sup>+2</sup> 80	96	71.38	72.75	73.88	73	1.25	1.72

Promedios (X), desviaciones estándar (S) y varianzas (S<sup>2</sup>).

<sup>1</sup> Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología - Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

<sup>2</sup> ORCID: 0000-0003-3853-2128. Autor para correspondencia: tsanchezr@unmsm.edu.pe.

<sup>3</sup> ORCID: 0000-0002-5211-1488.

<sup>4</sup> Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología - Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

<sup>5</sup> ORCID: 0000-0001-9309-7021.

<sup>6</sup> ORCID: 0000-0002-7044-5174.

<sup>7</sup> ORCID: 0000-0002-7846-6973.

<sup>8</sup> ORCID: 0000-0002-7657-3687.

<sup>9</sup> ORCID: 0000-0002-1123-1133.

<sup>10</sup> ORCID: 0000-0003-1588-5246.