

**BIOSORCIÓN DE CADMIO EN SOLUCIÓN ACUOSA UTILIZANDO LEVADURA DE PANADERÍA (*Saccharomyces cerevisiae*)****BIOSORPTION OF CADMIUM FROM AQUEOUS SOLUTION BY BAKER'S YEAST (*Saccharomyces cerevisiae*)**S.C. Moreno-Rivas¹, R. I. Armenta-Corral¹, M.C. Frascuillo-Félix¹, I. Lagarda-Díaz², L. Vázquez-Moreno¹, G. Ramos-Clamont Montfort^{1*}¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Coordinación de Ciencia de los Alimentos. Carretera a La Victoria km. 0.6. Hermosillo, Sonora. C.P. 83304.²Universidad de Sonora. Departamento de Física. Rosales y Luis Encinas. Hermosillo, Sonora. C.P. 83000.

Recibido 24 de mayo de 2016; Aceptado 18 de agosto de 2016

Resumen

Se estudió la biosorción de cadmio (Cd) en levadura de panadería utilizando potencial zeta (ζ), Espectrometría de Absorción Atómica, Espectrometría de Infrarrojo (FT-IR), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), crecimiento microbiano, electroforesis e inmunodetección (SDS-PAGE-westernblot). La pared celular presentó hidrofobicidad de $22.8 \pm 2.9\%$, con ζ dependiente del pH del agua (-27 ± 0.7 mV, pH 5.0; -33 ± 0.9 mV; pH 6.0). La interacción levadura-Cd ocurrió en los primeros 5 min de incubación, disminuyendo el ζ hasta en 11 unidades. La eficiencia de remoción dependió del pH del agua y de la concentración inicial (CI) de Cd, siendo mayor ($p < 0.05$) a pH 6.0 y CI [5 mg/L] removiendo 3.8 ± 0.01 mg/L (76%) del Cd presente. Los espectros FT-IR presentaron disminución en las bandas correspondientes a grupos carboxilo, amida y fosfato, evidenciando relación con la interacción levadura-Cd. Las micrografías SEM mostraron cambios producidos por el Cd en la forma celular, rugosidad superficial y contacto celular, sin alterar el tamaño de las levaduras (3.3 ± 0.6 μ m). La fase de acondicionamiento (lag) aumentó 1.6-2.0 veces indicando un periodo de adaptación al Cd que correlacionó con la expresión de la proteína de choque térmico HSP104. Estos resultados indican *S. cerevisiae* tiene potencial para la remediación de Cd de sitios contaminados.

Palabras clave: cadmio, biorremediación, *S. cerevisiae*.

Abstract

Biosorption of cadmium (Cd) by Baker's yeast was studied using zeta potential (ζ), Atomic Absorption Spectroscopy, Infrared Spectroscopy (FT-IR), Scanning Electron Microscopy, microbial growth, electrophoresis and immunodetection (SDS-PAGE-westernblot). Cell surface hydrophobicity was of $22.8 \pm 2.9\%$, zeta potential values were negative and pH-dependent (-27 ± 0.7 mV, pH 5.0; -33 ± 0.9 mV; pH 6.0). Yeast-Cd interaction occurred in the first 5 min of incubation with a ζ decrease up to 11 units. Cadmium removal efficiency (CIC) was dependent of water pH and Cd initial concentration (IC). CIC was higher ($p < 0.05$) at pH 6.0 and IC [5 mg / L]. Under these conditions Cd removal was of 3.8 ± 0.01 mg/L (76%). Changes observed in FT-IR spectra involved carboxyl, amide and phosphate groups with yeast-Cd interaction. The SEM micrograph of yeast cells exposed to Cd showed variation on morphology, surface rugosity and loss of cell contact without changes in cell size (3.3 ± 0.6 μ m). Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* for growth in Cd was observed. Yeast lag phase increased 1.6-2.0 times with Cd exposition, which correlates with the expression of heat shock protein HSP104. These findings indicate that *S. cerevisiae* has potential for Cd remediation of contaminated places.

Keywords: cadmium, bioremediation, *S. cerevisiae*.

1 Introducción

La contaminación del agua debida a actividades humanas ha aumentado en las últimas décadas, constituyendo un peligro potencial para la salud.

Existe una preocupación particular por la presencia de metales pesados; en particular el cadmio (Cd), por ser un elemento muy tóxico y persistente

* Corresponding author. E-mail: gramos@ciad.mx

(ATSDR, 2005), el cual está incluido en el grupo 1 de los compuestos carcinogénicos; además, ocupa el séptimo lugar de prioridad, en la lista de los 275 materiales más peligrosos (Bertin y Averbeck, 2006; Khairy y col., 2014). La exposición al Cd también se asocia con numerosos efectos que dañan la estructura, fisiología y bioquímica de riñones, hígado, pulmones, páncreas, testículos, placenta y huesos (Sarkar y col., 2013). Las principales fuentes de Cd para personas no-ocupacionalmente expuestas son: el cigarro en fumadores y el consumo de agua y alimentos contaminados con este metal (ATSDR, 2005).

El Cd llega a los cuerpos de agua proveniente de los desechos industriales, por lixiviación, falta de tratamiento y/o del descuido de la industria minero-metalúrgica, durante la obtención de hierro, acero, aleaciones y metales no ferrosos (García-Arreola y col., 2015; Mohamed y col., 2011). El uso de tuberías galvanizadas, los desechos de las industrias que emplean Cd, como baterías Ni-Cd, galvanizados y pigmentos y el escurrimiento de fertilizantes fosfatados, también son una fuente de contaminación importante (Kulkarni y Kaware, 2013). Entre los métodos convencionales para remover Cd de aguas industriales se encuentran: precipitación química, intercambio iónico, filtración, ósmosis inversa, tratamiento electroquímico, evaporación y procesos de oxidación o reducción (Fu y Wang, 2011). Sin embargo, estas técnicas pueden resultar costosas e inefectivas, cuando se trata de eliminar bajas concentraciones (1-100 mg/L) de Cd, como sería el caso del agua para consumo humano, por lo que en esos casos, se prefieren técnicas como la adsorción (Purkayastha y col., 2014).

La adsorción es el método más efectivo para remover pequeñas concentraciones de metales pesados en agua. Consiste en promover la unión de un sólido soluble a otro, para retirarlo del agua (Carey y Migliaccio, 2009). Cuando se usan compuestos biológicos para este propósito, el término correcto es bio-sorción ya que, además de adsorción (interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals), se presentan otros fenómenos como el intercambio iónico, la absorción, la formación de complejos químicos y la precipitación (Fomina y Gadd, 2014). Diversos compuestos de origen biológico como alginato, quitosano y celulosa microcristalina, así como algunos microorganismos, pueden bio-sorber metales pesados (González-Olivares y col., 2016; Khairy y col., 2014). Otra forma de retirar metales pesados es por fitorremediación

a través de la bioacumulación en plantas (Ruiz-Marín y col., 2013; Buendía-González y col., 2010). Entre las diversas opciones de descontaminación biológica, el uso de levaduras resulta prometedor ya que, además de unir Cd a su pared celular, puede captarlo y almacenarlo en algunos de sus organelos (Cabuk y col., 2007; Nagy y col., 2013). Entre las especies con mayor potencial para remover Cd en agua se encuentra *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura, reconocida como inocua (GRAS, por sus siglas en inglés), es la más utilizada en la alimentación humana. Otra ventaja es que se han desarrollado procesos económicos a gran escala, que permiten obtener grandes cantidades de su biomasa. Incluso puede aprovecharse la biomasa de levadura remanente de la fabricación de la cerveza (Ferreira y col., 2010). Todas estas propiedades hacen de la levadura de panadería un buen candidato para escalar procesos económicos de bio-remediación.

Se conoce que diferentes cepas de levadura unen diferentes metales pesados y toxinas a su superficie, estableciendo interacciones con algunas moléculas presentes en su pared celular (Zoghi y col., 2014). Con el fin de utilizar a estos microorganismos como una alternativa para la remediación de Cd, es importante caracterizar sus propiedades superficiales, los cambios que produce el metal en su superficie celular y los grupos moleculares involucrados en la interacción. Estas características contribuirán a un mayor conocimiento del fenómeno y a determinar las mejores condiciones de remoción.

Además de unir metales en su superficie, las levaduras también pueden internalizarlos. Por lo tanto, antes de escalar procesos de biosorción que involucren levaduras activas, es importante estudiar el efecto de la bio-acumulación del Cd. El efecto tóxico de un metal sobre la levadura depende del mecanismo de transporte que utilice para entrar a la célula, del estado de oxidación y especiación del metal, de su distribución intracelular y de las interacciones que establezca con diferentes biomoléculas (Wysocki y Tamás, 2010). En el caso del Cd, la mayor vía de entrada es el transportador de Fe/Zn IRT1 y los grupos a los que se une con mayor afinidad son los azufrados, especialmente los sulfhidrilos, provocando la inactivación de diversas proteínas por desplazamiento de Ca, Fe y Zn (Rajakumar y col., 2016; Cyert y Philpott, 2013). La acumulación de Cd en la levadura produce estrés oxidativo presuntamente al desplazar al Fe, cuya liberación induce la producción de radicales hidroxilos altamente reactivos que oxidan a las proteínas y a los lípidos (Kuang y col., 2015). Además, induce eventos de

recombinación, sustitución de bases y mutaciones con desplazamiento del marco de lectura, al provocar un desajuste en el sistema de reparación del ADN. Este efecto genotóxico causa alteraciones tanto genotípicas como fenotípicas en la levadura (Filipič, 2012).

La respuesta celular al Cd involucra múltiples estrategias entre las que destacan la compartimentalización en organelos como la vacuola; activación de mecanismos de defensa mediados por grupos-tiol; entre los que se incluyen glutatión y metaloproteínas; modificaciones en el metabolismo de azufre en respuesta a las demandas de biosíntesis de glutatión y regulación transcripcional activada por el estrés oxidativo, entre otros (Guo y col., 2012). En varios organismos también se activa la producción de enzimas con efecto antioxidante, de proteasas y de algunas enzimas metabólicas (Wysocki y Tamás, 2010).

El estrés oxidativo producido por la acumulación de Cd puede llegar a inducir la agregación y el plegado incorrecto de proteínas esenciales para la levadura, inactivando su función (Tamas y col., 2014). Para reparar este daño proteotóxico, existe una respuesta evolutivamente conservada que es la producción de proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés). La gran mayoría de las HSP actúan como chaperonas, coadyuvando al restablecimiento del plegado correcto de las proteínas dañadas por estrés (Morano y col., 2012). En cambio, la HSP104 es la única con la capacidad de re-solubilizar agregados proteicos, aunque para ello tenga que ser asistida por otras chaperonas (Saleh y col., 2014). Además, ha sido catalogada como un factor importante para la tolerancia al estrés en las levaduras ya que, en condiciones normales, su ausencia no afecta el crecimiento de la levadura; sin embargo, los mutantes que no expresan HSP104, no son capaces de adaptarse a la presencia de etanol o a temperaturas entre 42 y 50°C (Grimminger-Marquardt, y Lashuel, 2010).

Por otro lado, cuando se escogen materiales para bio-sorber metales, es importante considerar no solo el costo de los mismos y su amplia disponibilidad en la naturaleza, como es el caso de la levadura de panadería, sino también, si tienen la capacidad de adaptarse y propagarse rápidamente en las condiciones en que serán utilizados (Vieira y Volesky, 2000). En este sentido es importante investigar tanto el efecto del Cd en el crecimiento de la levadura, como sus posibles respuestas al estrés inducido por el metal, en particular, la de las HSP104. Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue realizar una caracterización fisicoquímica y biológica de la levadura de panadería,

Saccharomyces cerevisiae como una alternativa para la biosorción de Cd en agua.

2 Materiales y métodos

2.1 Materiales, reactivos y microorganismos

El estándar certificado de Cd se adquirió de la compañía Sigma Aldrich (St. Louis, MI, Estados Unidos de América). Para el análisis de expresión de proteínas se emplearon reactivos de la compañía Bio-Rad (Hercules, CA, Estados Unidos de América). Los ingredientes para formular los medios de cultivo de la levadura fueron de Difco (Difco Laboratories/Becton, Dickinson and Co., MD, Estados Unidos de América). El resto de los reactivos usados en el estudio se obtuvieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MI, Estados Unidos de América), a menos que se especifique lo contrario.

Se partió de una solución estándar de Cd de 1000 mg/L. Los procedimientos de dilución se hicieron siguiendo la NOM-117-SSA1-1994. Se obtuvo una solución madre a concentración de 100 mg/L, diluyendo con agua deionizada hasta alcanzar las concentraciones de trabajo de 5 y 10 mg/L.

La levadura estudiada de *Saccharomyces cerevisiae* fue la comercial, utilizada en panadería (Magidely®, Edo. de México, México). Se trabajó con 2 lotes (2 muestras por lote). Antes de iniciar el estudio se hizo un análisis para descartar la presencia de Cd en los lotes de estudio. El análisis se realizó por Espectrometría de Absorción Atómica como se describe en la sección 4.3. La levadura se liofilizó (VirTis Benchtop 3.3, Warminster, Estados Unidos de América) y se almacenó a -40 °C hasta su uso.

2.2 Hidrofobicidad superficial y capacidad de auto-agregación

La hidrofobicidad superficial se determinó por la técnica de adhesión microbiana a hidrocarburos (MATH, por sus siglas en inglés) según Rosenberg y col. (1980). La levadura se suspendió en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) 10 mM, pH 7.4 ± 0.2 , hasta una absorbancia de 0.25 ± 0.03 ($\approx 1 \times 10^6$ UFC/mL) a una longitud de onda de 600 nm en el Espectrómetro Jenway 7315 (Stone, Staffs, Reino Unido). Se añadió 1 mL de p-xileno, se agitó por 90 s en vórtex y se incubó durante 1 h a 25°C. Al término de este periodo se separó la fase acuosa y se midió absorbancia a 600 nm.

El porcentaje de células adheridas al p-xileno (hidrofobicidad) fue calculado a partir de la ec. (1):

$$\% \text{ de hidrofobicidad} = \left[\frac{(A_0 - A)}{A_0} \right] \times 100 \quad (1)$$

Donde A_0 es la densidad óptica a 600 nm de la suspensión de levadura antes de la mezcla con el p-xileno y A es la absorbancia después de la mezcla. El experimento se realizó por triplicado, con dos observaciones por réplica.

La capacidad de auto-agregación se estudió resuspendiendo la levadura en PBS como en el ensayo de hidrofobicidad (Halttunen y col., 2008). Se distribuyeron alícuotas de 1 mL de esta suspensión y se incubaron por 1, 2, 3 y 4 h, a 25°C. Posterior a la incubación se midió absorbancia tomando precaución de no agitar las muestras. El porcentaje de auto-agregación se determinó con la ec. (2):

$$\text{Índice de autoagregación} = \left[\frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \right] \times 100 \quad (2)$$

Donde A_0 representa la absorbancia de la suspensión de levaduras al tiempo 0 (0.25) y A_t la absorbancia de la suspensión, después de un tiempo n (1, 2, 3 o 4 h). Cada experimento se hizo por triplicado, con dos observaciones por réplica.

2.3 Efecto de la biosorción del Cd en la carga superficial y tamaño de la levadura

Para analizar el cambio en la carga superficial y el tamaño de *S. cerevisiae* debido a la biosorción del Cd, la levadura (1.5 g/L) se incubó con dos concentraciones del metal (5 y 10 mg/L) a pH 5.0 ± 0.2 y 6.0 ± 0.2, usando distintos tiempos de exposición (0, 15, 30, 60 min) a 25°C. Los pH's fueron seleccionados para una mayor estabilidad del metal en solución (Ibrahim y col., 2006). La carga superficial se calculó después de cada incubación, midiendo el potencial zeta (Zetasizer Nano-ZS90, Malvern Instruments Ltd., Worchestershire, Reino Unido). El diámetro de las levaduras se determinó con el mismo aparato. Las determinaciones se hicieron por triplicado usando el software Zetasizer versión 7.01.

2.4 Biosorción de Cd y estudio con Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)

Los estudios de remoción de Cd se hicieron usando los mismos parámetros de pH y concentración de Cd

y levadura, que en el ensayo de carga superficial. Para los tiempos de incubación, se añadió una determinación a los 5 min de exposición de la levadura al Cd. Posteriormente se centrifugó a 1200 x g, 15 min, 4°C (Allegra 6R, Beckman, Estados Unidos de Norteamérica). El sobrenadante se acidificó con HNO₃ ultrapuro para determinar la presencia de Cd no adsorbido; la biomasa se liofilizó para realizar los estudios de FT-IR. Las determinaciones de Cd se hicieron en un Espectrómetro de Absorción Atómica 240FS-AA con software SpectrAA Pro versión 5.2 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos de Norteamérica) por el método de atomización por flama, de acuerdo a la NOM-117-SSA1-1994. La concentración de Cd adsorbida se obtuvo de la diferencia entre la concentración de Cd inicial y la obtenida en el análisis de los sobrenadantes.

La biomasa liofilizada se mezcló individualmente con KBr como sal base y se analizó utilizando un rango espectral de 4000 a 400 cm⁻¹ en un Espectrómetro NICOLET Protegé 460 (Cole Palmer, IL, Estados Unidos de Norteamérica). Los espectros FT-IR se obtuvieron en el software WinFirst versión 2.0 (Analytical Madison Technology, WI, Estados Unidos de Norteamérica). Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado utilizando como controles levaduras no expuestas al Cd.

2.5 Cambios en la morfología de *S. cerevisiae* por exposición al Cd

El efecto del Cd en la morfología de la levadura se observó por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés). El estudio se realizó en el Laboratorio de Microscopia de Alta Resolución de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, empleando un microscopio de barrido JEOL-JSM-5900LV (JEOL USA, Inc.). Las muestras se deshidrataron y montaron en cilindros de aluminio sobre cintas de grafito y se recubrieron con una capa de oro de 60 Å de espesor. La morfología superficial de *S. cerevisiae* se obtuvo utilizando alto vacío y un detector de electrones. El voltaje de aceleración fue de 10 KV, con una distancia de la lente al plano focal (WD) de 10 mm.

2.6 Influencia del Cd en el crecimiento de *S. cerevisiae*

Para determinar el efecto del Cd sobre el desarrollo de *S. cerevisiae* se hicieron cinéticas de crecimiento en presencia de 5 y 10 mg/L de Cd, utilizando la

técnica de micro-dilución en placa (Griffiths y col., 2003). Se ajustó la concentración de la levadura con PBS, pH 7.2 ± 0.2 a una absorbancia de 0.50 a 600 nm ($\approx 1 \times 10^8$ UFC/mL). Se colocaron 100 μ L de caldo peptona dextrosa, levadura (YPD) en los pocillos de placas de cultivo estériles tipo ELISA y se añadieron 100 μ L del inóculo preparado. La cinética de crecimiento se determinó a 37°C, durante 24 h, en un Espectrómetro Anthos Zenyth 340st (Alcobendas, Madrid). Se efectuaron lecturas de la muestra cada 30 min a 620 nm. Como controles se usaron caldo YPD sin inóculo y sin Cd y caldo YPD con inóculo, sin Cd. El análisis se realizó por triplicado, con ocho observaciones por réplica. Los valores de fase de acondicionamiento (lag), la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria se estimaron a partir del modelo primario bifásico de Baranyi y Roberts (1994), empleando el programa DMFit (Dynamic Modeling 3.0, USDA Agricultural Research Service, Estados Unidos de América).

2.7 Efecto del Cd en la expresión de proteínas de choque térmico

Para estudiar cambios en la expresión de proteínas por efecto del Cd se siguió el procedimiento descrito por Vido y col. (2001). La levadura fue cultivada en caldo YPD a 30°C, con agitación (50 rpm), midiendo la absorbancia a 600 nm cada 30 min hasta alcanzar un valor de 0.40 ($\approx 1 \times 10^7$ UFC/mL), correspondiente a la fase de crecimiento exponencial. Se tomaron inóculos de 10 mL y se ajustó la concentración de Cd a 10 mg/L, incubando a 30°C, durante 1 h. Las células se recuperaron centrifugando (Allegra 6R, Beckman, Estados Unidos de Norteamérica) a 1200 x g, 15 min a 25 °C. Las células precipitadas se lavaron 3 veces con agua deionizada y se congelaron a -40°C hasta su uso. Los experimentos se hicieron por duplicado usando como control biomasa sin Cd.

Para extraer la proteína se utilizó la técnica propuesta por Maillet y col. (1996). Las células se resuspendieron en alícuotas de 200 μ L de regulador de lisis (Tris-HCl, 0.1 M, pH 8.0 ± 0.2 , Tritón X-100, 0.66%) frío y se lisaron por agitación ultrasónica (Mini-BeadBeater-16, BioSpec Products, Bartlesville, OK, Estados Unidos de América), en presencia de perlas de vidrio. Posteriormente, se añadieron 15 μ L de DTT 1M, urea y tiourea hasta una molaridad final de 7.0 y 2.0 M, respectivamente, y 50 μ L de solución amortiguadora conteniendo 4% de CHAPS (3-[(3-

colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato) y 1% de anfolitos. La mezcla se incubó durante 5 min a 25°C y se centrifugó a 1100 x g, por 15 min a 4 °C. El contenido de proteína en los extractos crudos (sobrenadante) se estimó por el método de Bradford (1976). Posteriormente fueron analizados mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras. Los extractos de proteína (30 μ g) se separaron en geles de poliacrilamida al 12% en una cámara Mini-PROTEAN (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos de América) con una corriente de 100V. El gel se tiñó con plata de acuerdo con Wray y col. (1981).

Para detectar la expresión de HSP se hizo un ensayo de inmunodetección de acuerdo a la técnica de Towbin y col., (1979). Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, utilizando una cámara con sistema semi seco (LABCONCO, Kansas, MO, Estados Unidos de América) a 0.8 mA/cm² por 45 min. Para evitar interacciones no específicas se bloqueó con albúmina de suero bovino (BSA) (2.5 % (p/v), en PBST (KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0.02 M, NaCl 0.9%, Tween-20 0.1% (v/v), pH 7.2 ± 0.2) durante 16 h a 4 °C. Después de 3 lavados con PBST, la membrana se incubó por 16 h a 4 °C con anti *S. cerevisiae*-HSP104 obtenido en ratón (1:1000) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos de América). Se lavó nuevamente con PBST y se incubó con Anti- IgG de ratón biotinilado por 1.5 h a 25 °C. Después de 3 lavados con PBST la membrana se incubó con el conjugado estreptavidina peroxidasa (1:2000) durante 1.5 h a 25 °C, se lavó nuevamente y se reveló la interacción con 3,3'-diaminobencidina 4 HCl (DAB) al 0.075%.

2.8 Análisis estadístico

Se aplicó la estadística descriptiva para los análisis de hidrofobicidad, y remoción de Cd, presentando las medias de los resultados y sus desviaciones estándar. Los resultados de potencial zeta, del tamaño de las levaduras y los parámetros de cinética de crecimiento en presencia de Cd se analizaron por análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de significancia de 0.05. La comparación de medias se hizo por el método de Tukey-Kramer. Los resultados de auto-agregación fueron sometidos a una regresión lineal. En todos los casos se usó el programa NCSS 2007 (Statistical Analysis and Graphics, Kaysville, UT, Estados Unidos de América).

3 Resultados y discusión

3.1 Hidrofobicidad superficial y capacidad de auto-agregación

Las propiedades superficiales de los microorganismos son determinantes en las interacciones que establecen con los metales y dependen de la naturaleza química de las moléculas presentes en la pared celular (Purkayastha y col., 2014). Los metales se adsorben a las levaduras principalmente por interacciones electrostáticas, aunque pueden llegar a presentarse interacciones hidrofóbicas como las fuerzas de van del Waals. No obstante, y de manera general, los valores de hidrofobicidad altos, se relacionan con una menor eficiencia de remoción de cationes como el Cd (Van Holle y col., 2012). El porcentaje de hidrofobicidad encontrado para la levadura estudiada fue bajo ($22.8 \pm 2.9\%$), indicando que existe una mayor cantidad de moléculas hidrofílicas que hidrofóbicas (no-polares). Otros autores han encontrado valores de hidrofobicidad para *S. cerevisiae* distintos a los de este trabajo. Sin embargo, en todos los casos fueron porcentajes bajos. Kordialik-Bogacka (2011) observaron valores de 8.6%, mientras que Van Holle y col. (2012) entre 10 y 30%. Las variaciones pueden deberse al tipo de cepa, etapa de crecimiento del microorganismo y la composición del medio en que se desarrolló, por lo que es importante analizar la influencia de estos factores al escalar el proceso (Purkayastha y col., 2014).

Las propiedades superficiales también se relacionan con procesos de interés tecnológico como la auto-agregación de las células. Un porcentaje de hidrofobicidad alto y la presencia de lectinas llamadas floculinas, se relaciona con altos porcentajes de auto-agregación y, por tanto, con bajas eficiencias de remoción de metales ya que disminuye la superficie de contacto (Van Holle y col., 2012). En este estudio el porcentaje de auto-agregación de *S. cerevisiae* dependió del tiempo ($R^2 = 0.98$), siendo del 20% durante la primera hora de incubación y llegando al 90% al término de las 4 h (figura 1). Considerando únicamente este aspecto, el resultado obtenido sugiere que el tiempo de contacto más efectivo para que la levadura remueva Cd en agua es menor o igual a 1 h.

3.2 Efecto de la biosorción de Cd en la carga superficial de *S. cerevisiae*

Los estudios de carga superficial son útiles para obtener información acerca de la interacción de los

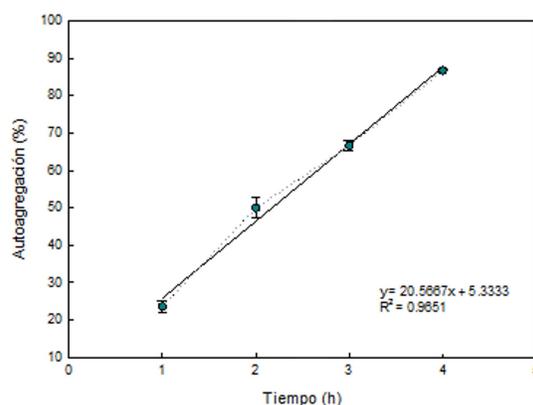


Fig. 1. Porcentaje de auto-agregación de *S. cerevisiae*. El ensayo se realizó detectando los cambios de absorbancia a 600 nm en función del tiempo de incubación de la levadura.

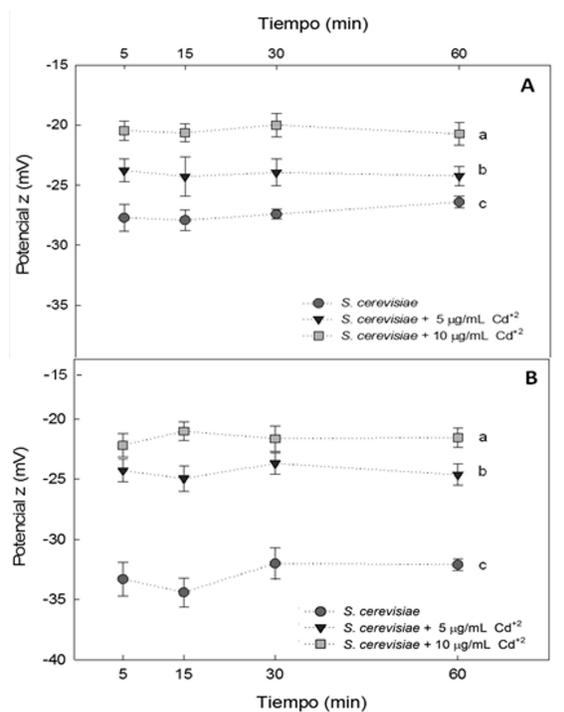


Fig. 2. Efecto de la biosorción de Cd en la carga superficial de *S. cerevisiae* A) pH 5.0 ± 0.2 , B) pH 6.0 ± 0.2 , a distintos tiempos de contacto con dos concentraciones (5 y 10 mg/L). Distintas letras en un mismo recuadro indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

microorganismos con diferentes compuestos. Una forma de conocer esta carga, es determinando el potencial zeta o potencial eléctrico entre la superficie celular y el líquido que la rodea (Strevett y Chen,

2003). En las figuras 2A y 2B, se observa que la carga superficial de *S. cerevisiae* fue negativa, lo cual concuerda con otros estudios, atribuyéndose a grupos funcionales cargados negativamente, presentes en los polisacáridos y proteínas de la pared celular de las levaduras (Orlean, 2012). Sin embargo, la carga fue menos negativa ($p < 0.05$) a pH 5.0 ± 0.2 (-27.4 ± 0.66) que de 6.0 ± 0.2 (-33.0 ± 1.13). El pH del solvente que rodea a un microorganismo es el factor que más influye en su potencial zeta (Strevett y Chen, 2003). Al disminuir, aumenta la presencia de iones hidronio que interaccionan con la levadura incrementando su potencial zeta. El efecto contrario sucede al aumentar el pH, donde lo que aumenta, es la cantidad de iones hidroxilos. El pH también es determinante en la solubilidad del Cd en agua; normalmente, el Cd es más soluble en agua a pH entre 5.0 y 6.0 (Khairy y col., 2014).

La composición de la pared celular de los microorganismos juega un papel preponderante en diferentes fenómenos de interés biotecnológico; por ejemplo, formación de biopelículas, adhesión microbiana, bioaumentación y biosorción (Orlean, 2012). En este sentido, la presencia de moléculas cargadas negativamente en la superficie de *S. cerevisiae* es fundamental para la interacción con cationes como el Cd y por tanto, para la eficiencia de su remoción (Purkayastha y col., 2014). Al poner en contacto a la levadura con las soluciones acuosas conteniendo Cd se observó una disminución de su carga superficial ($p < 0.05$), en comparación con la carga superficial de los controles no expuestos (figuras 2A y 2B). Esto es un indicio de que el Cd neutralizó algunas cargas al interaccionar con la levadura (Cabuk y col., 2007). Un comportamiento similar se observó, tanto al usar *S. cerevisiae* como *Bacillus subtilis* para la biosorción de Cd, Pb y Sr, corroborando que la principal unión entre la pared celular y los metales pesados se da a través de interacciones electrostáticas (Guo y col., 2016; Sulaymon y col., 2013; Singh y col., 2010).

El tiempo de incubación no influyó ($p > 0.05$) en la carga superficial de la levadura sugiriendo que la interacción podría estarse dando en los primeros momentos del contacto. En contraste, el cambio en la carga original de la levadura fue mayor ($p < 0.05$) a pH de 6.0 (9 y 11 unidades para 5 y 10 mg/L de Cd, respectivamente) que a pH de 5.0 (3.3 y 6.8 unidades para 5 y 10 mg/L de Cd, respectivamente). Este comportamiento indica una mayor interacción del metal con la superficie de la levadura a pH de 6.0; ha sido observado en otros estudios de biosorción de Cd y deriva del aumento en cargas negativas en la superficie

de la levadura (Cabuk y col., 2007).

3.3 Biosorción de Cd y estudio con Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)

La Tabla 1 muestra el comportamiento de biosorción de Cd a concentraciones de 5 y 10 mg/L. En ambos casos se observó una mayor eficiencia de remoción a pH de 6.0 ± 0.2 , lo cual concuerda con los resultados de los cambios en la carga superficial de la levadura y corrobora que la presencia de protones en el medio, interfiere con la remoción. Vasudevan y col. (2003), encontraron que la mayor capacidad de adsorción de Cd por *S. cerevisiae* se presenta a un pH de 6.5; a partir de este punto, el Cd empieza a interaccionar con los iones hidroxilo para formar hidróxidos que precipitan en el agua a pH de 8.0.

En todos los experimentos la interacción del Cd con la *S. cerevisiae* se dio en los primeros minutos de contacto. Otros estudios con bacterias probióticas y *S. cerevisiae* expuestos a diferentes iones metálicos, coinciden en tiempos de adsorción rápidos con escasa fluctuación en la concentración adsorbida entre los 5 y 30 minutos de contacto (Mrvcic y col., 2012; Cabuk y col., 2007; Halttunen y col., 2007; Ibrahim y col., 2006). Este fenómeno confirma que las interacciones microorganismo-metal más importantes, son de origen electrostático (Sulaymon y col., 2013). Además, coincide con las determinaciones de carga superficial donde tampoco se observaron cambios en el potencial zeta de la levadura a los tiempos de incubación de 15, 30 y 60 min. Una adsorción rápida del metal es deseable para el establecimiento de operaciones de biorremediación continuas, ya que, además de acortar el proceso, se requerirían de espacios y tanques de residencia para la levadura, más pequeños (Vieira y Volesky, 2000).

La eficiencia de remoción de Cd se vio afectada por la concentración inicial del metal, siendo menor, cuando se inició con concentraciones más altas. Cuando se trabajó a pH 5.0 y concentración inicial de 5 mg/L, la levadura captó 2.5 ± 0.05 mg/L (49.5 % de remoción); al iniciar con 10 mg/L, la levadura captó 3.9 ± 0.14 mg/L (39 % de remoción). A pH 6.0 y 5 mg/L de Cd inicial, la remoción fue de 3.8 ± 0.06 mg/L que correspondió al 75 % del metal presente. Al iniciar con 10 mg/L, la remoción de Cd fue de 6.57 ± 0.09 mg/L indicando un 65.7 % de eficiencia de remoción. Kordialik-Bogacka (2011) observó comportamientos similares al estudiar la biosorción de

Tabla 1. Biosorción de cadmio por *S. cerevisiae*. La levadura (1.5g/L) se incubó a diferentes tiempos en soluciones acuosas conteniendo 5 y 10 mg/L de Cd.

Tiempo de incubación (min)	Concentración inicial de Cd [mg/L]			
	5.0		10.0	
	pH			
	5.0	6.0	5.0	6.0
	Biosorción de Cd [mg/L]*			
0	5.0 ± 0.01 (0%)	5.0 ± 0.01 (0%)	10.0± 0.02 (0%)	10.0 ± 0.01 (0%)
5	2.5± 0.04 (50%)	3.8 ± 0.01 (76%)	3.7± 0.06 (37%)	6.5 ± 0.04 (65%)
15	2.4± 0.02 (48%)	3.7 ± 0.03 (74%)	4.0± 0.03 (40%)	6.6 ± 0.04 (65%)
30	2.5± 0.04 (50%)	3.7 ± 0.04 (74%)	3.9± 0.05 (39%)	6.5 ± 0.03 (66%)
60	2.5± 0.07 (50%)	3.8 ± 0.02 (76%)	4.0± 0.03 (40%)	6.7 ± 0.01 (67%)

*Los valores indican las medias y desviaciones estándar de 2 repeticiones.

Pb por *S. cerevisiae* y *S. pastorianus*, que pudieran estar indicando una mayor competencia del metal por los sitios de unión.

La pared celular de *S. cerevisiae* está compuesta principalmente por dos tipos de macromoléculas: polisacáridos (~85%) y proteínas (~15%). Entre los polisacáridos predominan mananos, β 1-3 y β 1-6 glucanos, y pequeñas cantidades de quitina (1-2%). Las proteínas importantes se dividen en a), aquellas que pueden participar en la construcción de la pared (hidrolasas y transglicosidasas); b), aglutininas, floculinas y conectores de β 1-3 glucanos y c). glicoconjugados entre los que destacan N-glicoproteínas del tipo altas en manosa, anclas GPI y algunas O-glicoproteínas (Orlean, 2012). Estas macromoléculas contienen diversos grupos funcionales que pueden interaccionar con el Cd, siendo el análisis de FT-IR una herramienta efectiva para identificarlos.

La figura 3 presenta los espectros FT-IR de la levadura en un rango espectral de 4000 a 400 cm⁻¹ antes (control) y después de su incubación con 5 y 10 mg/L de Cd. El espectro FT-IR de los controles mostró las siguientes bandas de vibración: una banda ancha en el rango de 3002.6 a 3787.5 cm⁻¹, indicando la presencia -NH de grupos aminos y -OH provenientes de grupos carboxilos (Singh y col., 2010). Un pico a 2923 cm⁻¹ que representa estiramientos de C-H derivados de cadenas alquílicas (-CH, -CH₂ y CH₃) (Sulaymon y cols., 2013). Los picos a 1656.5 cm⁻¹ (banda de flexión de N-H) y 1542.7 cm⁻¹ (estiramiento H-N-C) indicaron la presencia de grupos aminos. La presencia de grupos COO⁻ se evidenció en las bandas a 1456 y 1403 cm⁻¹ y de

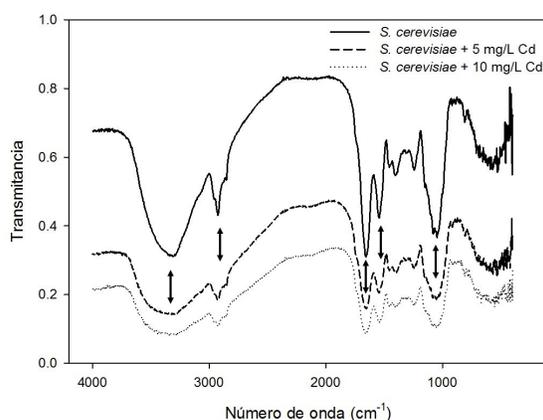


Fig. 3. Espectro infrarrojo (FI-TR) de *S. cerevisiae* en presencia de cadmio. Cada flecha indica el número de onda en el que disminuyó la señal.

grupos S=O y COO⁻, en la banda de 1243.8 cm⁻¹. El pico a 1049 cm⁻¹ se atribuyó a los enlaces P-O-C de grupos fosfato. El patrón de los espectros FT-IR después de la biosorción de Cd (5 y 10 mg/L), fue muy similar al de los controles; sin embargo, una disminución de la señal de transmitancia en los picos mencionados, indicó la presencia del Cd en la pared celular de la levadura (Chakravarty y Banerjee, 2012). En base a las diferencias observadas, las moléculas involucradas en la unión del Cd a la levadura son aquellas que contienen grupos carboxílicos, hidroxilos y fosfatos, así como el átomo de nitrógeno del grupo amino. Estos grupos también se han relacionado con la interacción de levaduras con otros metales pesados (Cabuk y col., 2007).

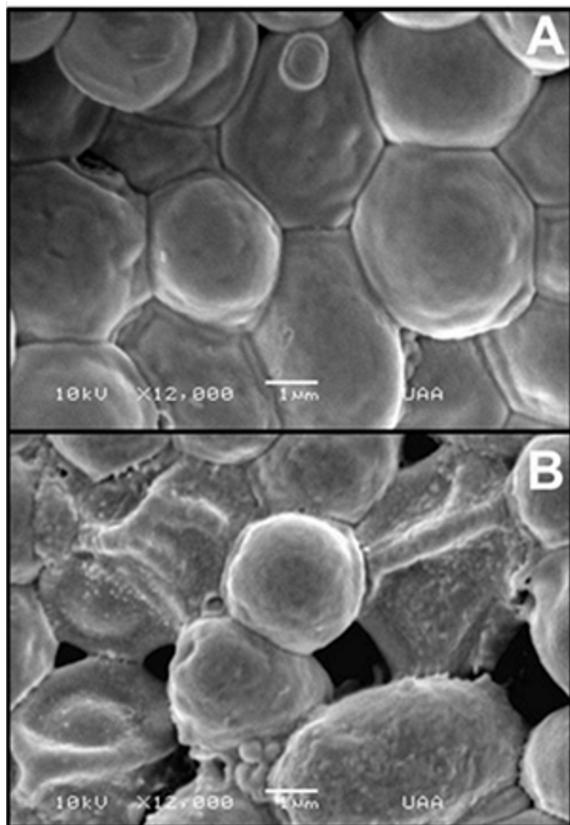


Fig. 4. Micrografías de *S. cerevisiae* incubado a pH 6.0 ± 0.2 . A) Control en agua sin Cd; B) Tratamiento expuesto a 10 mg/L de Cd en agua durante 60 min.

3.4 Efecto del Cd en la forma y tamaño de *S. cerevisiae*

Para determinar posibles cambios en la morfología de las levaduras expuestas al Cd se hicieron observaciones usando un microscopio electrónico de barrido, después de incubar a las levaduras a concentraciones de 5 y 10 mg/L de 0 a 60 min. Los cambios más evidentes se presentaron después de 60 min de incubación, independientemente del pH de estudio. En la figura 4 se presentan las micrografías de levaduras incubadas durante 60 min, a pH 6.0 ± 0.02 . Las levaduras control presentaron morfología uniforme y continua (figura 4A), en cambio, las que fueron incubadas con Cd mostraron cambios de forma, rugosidades en su superficie, y una aparente reducción de contacto entre células (figura 4B). La aparición de rugosidades en la superficie de *S. cerevisiae* también se ha observado después de exponer a la levadura a diferentes concentraciones de plomo y se atribuye a la acumulación de los metales pesados en su pared celular (El-Sayed, 2013). Por otro lado, la pérdida

de contacto celular se adjudica al efecto tóxico del metal sobre la levadura, efecto que también se observa al exponer a la levadura a plomo, uranio y arsénico (Liu y col., 2010; Thippeswamy y col., 2014). Por otro lado, la incubación con Cd no afectó ($p > 0.05$) el tamaño de las células expuestas. Las levaduras control presentaron diámetros de 3.3 ± 0.47 , mientras que las expuestas a 5 mg/L y 10 mg/L de 3.4 ± 0.72 y 3.3 ± 0.49 , respectivamente. Este resultado es contrario al de El-Sayed (2013), quien observó una disminución en el tamaño de *S. cerevisiae* expuesto a Pb. La diferencia entre ambos resultados pudo deberse al estado fisiológico en que se encontraban las células al momento de los ensayos (Liu y col., 2010).

3.5 Crecimiento de *S. cerevisiae* en presencia de Cd

Para determinar el efecto del Cd sobre *S. cerevisiae* se obtuvieron 24 curvas de crecimiento tanto de los controles como de los tratamientos y se analizaron los datos con el software DMFit (Tabla 2). Se observaron diferencias ($p < 0.05$) entre todos los parámetros de crecimiento de los controles y las levaduras expuestas, cuyo efecto dependió, en los casos de acondicionamiento y crecimiento exponencial, de la concentración de Cd inicial. La fase de acondicionamiento de las levaduras control fue de 10.1 h mientras que en las levaduras expuestas a 5 y 10 mg/L de Cd esta etapa se alargó a 16.4 h (1.6 veces) y 21.0 h (2 veces), respectivamente. Lo anterior indica una posible etapa de adaptación de la levadura a este metal (Wysocki y col., 2010). Por otro lado, la velocidad de crecimiento exponencial decayó en presencia del Cd. Los valores de las unidades de cambio de absorbancia/unidad de tiempo para los controles fueron de 2.1×10^{-3} disminuyendo a 8.8×10^{-4} y 7.2×10^{-4} para las levaduras expuestas a 5 y 10 mg/L de Cd, respectivamente. Además, se observó que, en la fase estacionaria, las levaduras expuestas al metal pesado alcanzaron densidades ópticas menores que las de los controles, independientemente de la concentración de Cd utilizada. Estos valores representan una menor cantidad de biomasa al finalizar la etapa de crecimiento (Wan y Zhang, 2012).

La acumulación de Cd en eucariotes produce estrés oxidativo, interfiere con la función de las proteínas y afecta la función de reparación de ADN (Kuang y col., 2015; Filipič, 2012). En respuesta a la exposición a este metal se producen cambios importantes en la levadura relacionados con su crecimiento, entre

Tabla 2. Parámetros de crecimiento para *S. cerevisiae* en presencia de cadmio. Se realizaron curvas de crecimiento de 24 h incubando a la levadura (1.5 g/L) en soluciones acuosas conteniendo 5 y 10 mg/L de Cd. Los parámetros se obtuvieron a partir del modelo primario bifásico de Baranyi y Roberts (1994). Los resultados expresados son la media de tres repeticiones con ocho observaciones cada una.

Tratamiento	Fase lag (h)	Tasa de crecimiento (DO ₆₂₀ /min)	Fase estacionaria (DO ₆₂₀)
Control	10.1 ^{a*}	2.10E-03 ^a	0.88 ^a
5 µg/mL	16.4 ^b	8.76E-04 ^b	0.67 ^b
10 µg/mL	21.0 ^c	7.21E-04 ^c	0.65 ^b

* Valores con letras distintas en una misma columna indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$)

ellos, la alteración de la expresión genética y de su metabolismo. La actividad metabólica cambia en respuesta al factor de estrés, debido a la represión en la síntesis de varias proteínas que se producen en la célula en condiciones fisiológicas normales y a la inducción de la producción de proteínas específicas en respuesta al estrés. Estos cambios vienen acompañados por una disminución temporal o una completa inhibición del ciclo de crecimiento, que dependerá de la capacidad de adaptación del organismo (Swiecilo, 2016). Cambios relacionados con el arresto del ciclo celular incluyen: ajustes en el proceso de transporte para salvaguardar la integridad genética y disturbios en vías de señalización relacionadas con la entrada de nutrientes a la célula (proteínas TOR1) o del control del metabolismo energético (ruta de la proteína cinasa A) (Kuang y col., 2015; Ruta y col., 2014; Filipič, 2012; Wysocki y col., 2010).

El efecto de la concentración de Cd en el crecimiento de *S. cerevisiae* es un parámetro que debe evaluarse antes del escalamiento de un proceso de bio-remediación, como un indicador de la pertinencia de utilizar biomasa viva (Bhakta y col., 2012). El uso de microorganismos vivos o muertos para la remoción de metales es cuestión de debate. En el caso de las levaduras, varios estudios indicaron que, el uso células vivas, permite eliminar una mayor concentración de metales pesados debido a que parte de estos son transportados al interior de la célula; sin contar con que la biomasa (biodegradable), puede ser reemplazada por nuevas células en crecimiento (Avery y Tobin 1992; Volesky y col., 1993). En contraste, otros autores enfatizan que utilizar células muertas permite ahorrar en almacenamiento y evita el daño del metal, a los microorganismos (Machado y col., 2009). Lo recomendable para tomar la decisión del estado en que se usará la biomasa es realizar un análisis económico antes de escalar el proceso; de los costos de cultivo y producción de la levadura en el

caso de utilizarla viva, y del costo por reemplazo de la biomasa, en caso de utilizarla muerta (Park y col., 2010).

3.5.1 Expresión de proteínas de choque térmico por exposición al Cd

Los organismos vivos detectan y responden a los estreses fisiológicos y ambientales que pueden dañarlos. *S. cerevisiae* responde al estrés con diversos mecanismos que actúan de manera concertada. Entre estas respuestas destaca la producción de chaperonas HSP, que actúan como primera línea para recuperar la homeostasis proteica, revirtiendo los cambios conformacionales inducidos por el estrés oxidativo (Swiecilo, 2016). En particular, la HSP104 es un factor esencial para la adaptación de la levadura al etanol y a temperaturas altas. Además, es indispensable en la disgregación o resolubilización de agregados proteicos producidos durante situaciones de estrés, restaurando así, funciones proteicas cruciales para la célula (Grimminger-Marquardt y Lashuel, 2010). También, protege a las nuevas generaciones de levaduras durante la mitosis, reteniendo en las progenitoras, proteínas carboniladas producto del estrés oxidativo (Tessarz y col., 2009; Erjavec y col., 2007).

Con la finalidad de explorar la inducción de HSP104 en *S. cerevisiae* por su exposición al Cd, se prepararon extractos crudos de proteína a partir de la biomasa control y la expuesta a 10 mg/L de Cd durante 1h y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS PAGE. Al comparar el patrón de proteínas de las levaduras control (figura 5A1) con el de las levaduras expuestas (figura 5B1) se observó un aumento en la intensidad de una banda con masa aproximada de 102-104 kDa que coincide con la masa de la HSP104. La expresión de la HSP104 es nula o muy baja bajo condiciones normales de crecimiento (De Virgilio y col., 1991; Grimminger-Marquardt y Lashue, 2010).

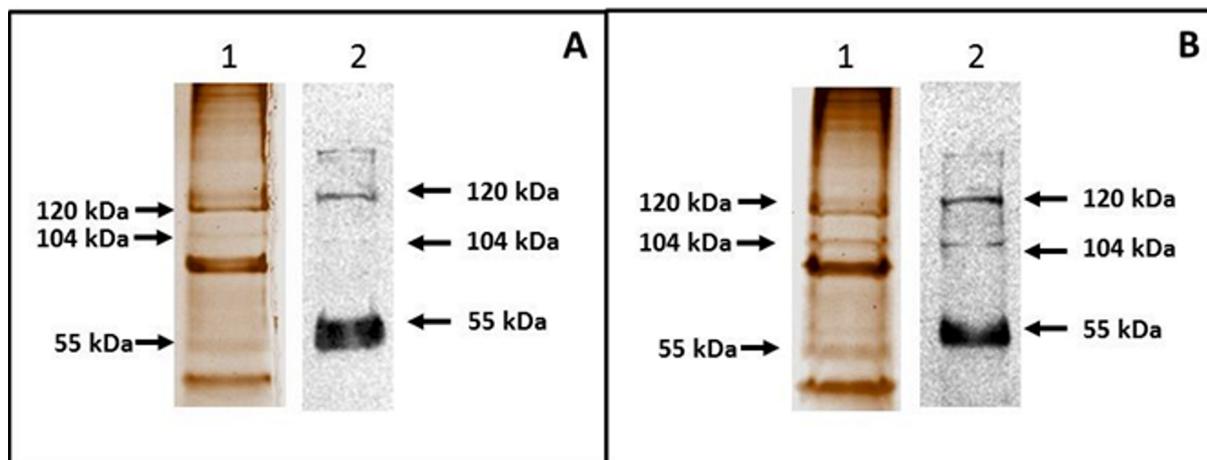


Fig. 5. Efecto de la exposición al cadmio en la expresión de proteínas de choque térmico en *S. cerevisiae*. A. Controles (1) SDS PAGE y (2) inmunodetección con anti HSP104. B. *S. cerevisiae* expuesta a 10 mg/L de Cd durante 1h (1) SDS PAGE y (2) inmunodetección con anti HSP104.

Para comprobar la identidad de la banda de 104 kDa se hizo un ensayo de inmunodetección con un anticuerpo específico dirigido hacia el extremo carboxilo terminal (aminoácidos 894 a 908) de la HSP104 de *S. cerevisiae*. En la levadura control (figura 5A2), la proteína no fue detectada. En cambio, el anticuerpo reconoció la banda de 102-104 kDa en las levaduras expuestas al Cd, aunque la intensidad de la banda fue ligera (figura 5B2). Esto pudo deberse a que el tiempo de exposición de la levadura al Cd fue de sólo una hora, por lo que es conveniente que en futuros ensayos se prueben diferentes tiempos de exposición al metal, a fin de dar un mejor seguimiento al comportamiento en la expresión de la HSP104. Por otra parte, anti-HSP104 reconoció otras proteínas con masas moleculares de 55 y 120 kDa cuya presencia fue observada tanto en el SDS PAGE de los controles, como en el de las levaduras expuestas al Cd. Este reconocimiento no-específico ha sido observado en otras investigaciones y puede deberse a que estas proteínas compartan alguna similitud en la secuencia a la que está dirigida el HSP104 (Singh y col., 2013; Holubaroba y col., 2000; Sánchez y Lindquist, 1990).

Existe un consenso general de que las proteínas son el blanco principal de los metales tóxicos, a través de interacciones con sus grupos tioles, sustitución de metales esenciales o catalizando la oxidación de algunas cadenas laterales de aminoácidos (Choong y col., 2014; Wysocki y col., 2010). Recientemente también se ha probado que algunos metales como Cd, As y Hg, interfieren con el correcto plegado de las proteínas y además promueven la formación de agregados proteicos (Tamas y col., 2014; Guo y col.,

2012; Jacobson y col., 2012). El mal funcionamiento o inactivación provocado por la agregación proteica puede llegar a causar daño severo e incluso la muerte celular (Tamas y col., 2014; Morano y col., 2012). En este sentido cobra importancia la función disgregante de la HSP104, cuya inducción se ha observado, tanto en este estudio, como en otros en los que se ha expuesto a las levaduras tanto al Cd (Vido y col., 2001), como al cromo (Fujs y col., 2007) o al arsénico (Menesez y col., 2008). Sin la presencia de HSP104 no inicia el proceso para deshacer agregados proteicos; sin embargo, para que funcione correctamente, requiere de la asistencia de otras HSP, como la HSP70 (Grimminger-Marquardt y Lashue, 2010). Debido a lo anterior, es importante que en estudios subsecuentes se estudie la expresión de otras proteínas relacionadas con el estrés, a fin de conocer mejor la respuesta de la levadura al Cd.

Conclusiones

En este estudio se investigaron las propiedades de la levadura de panadería relacionadas con la biosorción de Cd en soluciones acuosas. El pH del medio, la concentración inicial de Cd, y el tiempo de contacto influyeron en la captación del Cd que en las mejores condiciones fue del 76 %. El proceso de sorción se llevó a cabo en los primeros 5 minutos de contacto, implicando a los grupos carboxilo, amida y fosfatos en la interacción levadura-Cd. La bio-acumulación de Cd retrasó la fase lag y afectó a las fases exponencial y estacionaria de crecimiento, evidenciando un periodo

de adaptación que se relacionó con la expresión de la HSP104. En conjunto los resultados muestran que la levadura de panadería podría ser un bio-sorbente adecuado para el Cd. Sin embargo, se requieren estudios a nivel piloto, en sistemas continuos, para investigar la factibilidad de llevar el proceso a gran escala.

Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento al proyecto CB-2011-169658, así como por la beca otorgada a la estudiante de maestría. Los autores agradecen el apoyo técnico de Haydé Hayamaí González Carrillo y de Erika Fierros Bujanda.

Referencias

- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2012). *Toxicological Profile for Cadmium*. Atlanta, GA. Recuperado a partir de <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=48&tid=15>
- Avery, S. V., y Tobin, J. M. (1992). Mechanisms of strontium uptake by laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3883-3889.
- Baranyi, J., y Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.
- Bertin, G., y Averbek, D. (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 88, 1549-1559.
- Bhakta, J. N., Ohnishi, K., Munekage, Y., Iwasaki, K., y Wei, M. Q. (2012). Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. *Journal of Applied Microbiology* 112, 1193-1206.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Estrada-Zúñiga, M. E., Barrera Díaz, C. E., Vernon-Carter, E. J., y Cruz-Sosa, F. (2010). *In vitro* lead and nickel accumulation in mesquite (*Prosopis laevigata*) seedlings. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 9, 01-09.
- Cabuk, A., Akar, T., Tunali, S., y Gedikli, S. (2007). Biosorption of Pb(II) by industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on the biomatrix of cone biomass of *Pinus nigra*: Equilibrium and mechanism analysis. *Chemical Engineering Journal* 131, 293-300.
- Carey, R. O., y Migliaccio, K. W. (2009). Contribution of wastewater treatment plant effluents to nutrient dynamics in aquatic systems. *Environmental Management* 44, 205-217.
- Chakravarty, R., y Banerjee, P. C. (2012). Mechanism of cadmium binding on the cell wall of an acidophilic bacterium. *Bioresource Technology* 108, 176-183.
- Choong, G., Liu, Y., y Templeton, D. M. (2014). Interplay of calcium and cadmium in mediating cadmium toxicity. *Chemical Biology Interactions* 211, 54-65.
- Cyert, M. S., y Philpott, C. C. (2013). Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 193, 677-713.
- El-Sayed, M. T. (2013). Removal of lead(II) by *Saccharomyces cerevisiae* AUMC 3875. *Annals of Microbiology* 63, 1459-1470.
- Erjavec, N., Larsson, L., Grantham, J., y Nyström, T. (2007). Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p. *Genes & Development* 21, 2410-2421.
- Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., Vieira, E., y Tavarela, J. G. (2010). Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends in Food Science and Technology* 21, 77-84.
- Filipič, M. (2012). Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 733, 69-77.

- Fomina, M. y Gadd, G. M. (2014). Biosorption: Current perspectives on concept, definition and application. *Bioresource Technology* 160, 3-14.
- Fu, F., y Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management* 92, 407-418.
- Fujs, Š., Ekert, M., Ščančar, J., y Raspor, P. (2007). Induced cross-protection responses against Cr(III) and Fe(III) ions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Basic Microbiology* 47, 301-308.
- García-Arreola, M. E., Soriano-Pérez, S. H., Flores-Vélez, L. M., Cano-Rodríguez, I., y Alonso-Dávila, P. A. (2015). Comparación de ensayos de lixiviación estáticos de elementos tóxicos en residuos mineros. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14, 109-117.
- González-Olivares, L.G., Rodríguez-Serrano, G.M., Flores-Aguilar, J.F., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E., Cruz-Guerrero, A.E., Añorve-Morga, J., y Jaimez-Ordaz, J. (2016). Inorganic selenium uptake by *Lactobacillus* ssp. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 33-38.
- Griffiths, E., Duffy, L., Schanbacher, F., Dryja, D., Leavens, A., Neiswander, R., ... Ogra, P. (2003). In vitro growth responses of bifidobacteria and enteropathogens to bovine and human lactoferrin. *Digestive Diseases and Sciences* 48, 1324-1332.
- Grimminger-Marquardt, V., y Lashuel, H. A. (2010). Structure and function of the molecular chaperone Hsp104 from yeast. *Biopolymers* 93, 252-276.
- Guo, Y., Du, W., Wang, S., y Tan, L. (2016). The biosorption of Sr(II) on *Bacillus subtilis*: A combined batch and modeling study. *Journal of Molecular Liquids* 220, 762-767.
- Guo, L., Ghassemian, M., Komives, E. A., y Russell, P. (2012). Cadmium-induced proteome remodeling regulated by Spc1/Sty1 and Zip1 in fission yeast. *Toxicological Sciences* 129, 200-212.
- Halttunen, T., Collado, M. C., El-Nezami, H., Meriluoto, J., y Salminen, S. (2008). Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution. *Letters in Applied Microbiology* 46, 160-165.
- Holubarova, A., Muller, P., y Svoboda, A. (2000). A response of yeast cells to heat stress: cell viability and the stability of cytoskeletal structures. *Scripta Medica (BRNO)* 73, 381-392.
- Ibrahim, F., Halttunen, T., Tahvonen, R., y Salminen, S. (2006). Probiotic bacteria as potential detoxification tools: assessing their heavy metal binding isotherms. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 877-885.
- Jacobson, T., Navarrete, C., Sharma, S. K., Sideri, T. C., Ibstedt, S., Priya, S., Grant, C. M., Christen, P., Goloubinoff, P., y Tamas, M. J. (2012). Arsenite interferes with protein folding and triggers formation of protein aggregates in yeast. *Journal of Cell Science* 125, 5073-5083.
- Khairy, M., El-Safty, S. A., y Shenashen, M. A. (2014). Environmental remediation and monitoring of cadmium. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 62, 56-68.
- Kordialik-Bogacka, E. (2011). Surface properties of yeast cells during heavy metal biosorption. *Central European Journal of Chemistry* 9, 348-351.
- Kuang, X., Fang, Z., Wang, S., Shi, P., y Huang, Z. (2015). Effects of cadmium on intracellular cation homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicological & Environmental Chemistry* 97, 922-930.
- Kulkarni, S. J., y Kaware, J. P. (2013). A review on research for cadmium removal from effluent. *International Journal of Engineering Science and Innovative Technology* 2, 465-469.
- Liu, M., Dong, F., Yan, X., Zeng, W., Hou, L., y Pang, X. (2010). Biosorption of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and surface interactions under culture conditions. *Bioresource Technology* 101, 8573-8580.
- Maillet, I., Lagniel, G., Perrot, M., Boucherie, H., y Labarre, J. (1996). Rapid identification of yeast proteins on 2-dimensional gels. *Journal of Biological Chemistry* 271, 10263-10270.

- Menezes, Regina A., Amaral, C., Batista-Nascimento, L., Santos, C., Ferreira, Ricardo B., Devaux, F., Eleutherio, E, C. A., y Rodrigues-Pousada, C. (2008). Contribution of Yap1 towards *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to arsenic-mediated oxidative stress. *Biochemical Journal* 414, 301-311.
- Mohammed, A. S., Kapri, A., y Goel, R. (2011). Heavy Metal Pollution: Source, impact, and remedies. In S. M. Khan, A. Zaidi, R. Goel, y J. Musarrat (Eds.), *Biomangement of Metal-Contaminated Soils* (pp. 1-28).
- Morano, K. A., Grant, C. M., y Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190, 1157-1195.
- Mrvic, J., Stanzer, D., Solic, E., y Stehlik-Tomas, V. (2012). Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: opportunities for improving food safety and quality. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 2771-2782.
- Nagy, B., Tonk, S., Cerasella, I., Măicăneanu, A., y Majdik, C. (2013). Biosorption of cadmium ions by unmodified, microwave and ultrasound modified brewery and pure strain yeast biomass. *American Journal of Analytical Chemistry* 4, 63-71.
- NOM-117-SSA1-1994. (1994). Norma Oficial Mexicana. NOM-117-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica.
- Orlean, P. (2012). Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics* 192, 775-818.
- Park, D., Yun, Y.-S., y Park, J. M. (2010). The past, present, and future trends of biosorption. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 15, 86-102.
- Purkayastha, D., Mishra, U., y Biswas, S. (2014). A comprehensive review on Cd(II) removal from aqueous solution. *Journal of Water Process Engineering* 2, 105-128.
- Rajakumar, S., Ravi, C., y Nachiappan, V. (2016). Defect of zinc transporter ZRT1 ameliorates cadmium induced lipid accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metallomics* 8, 453-460.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 9, 29-33.
- Ruiz-Marín, A., Zavala-Loria, J. C., Canedo-López, Y., y Cordova-Quiroz, A. V. (2013). Tropical bacteria isolated from oil-contaminated mangrove soil: bioremediation by natural attenuation and bioaugmentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12, 553-560.
- Ruta, L. L., Popa, V. C., Nicolau, I., Danet, A. F., Iordache, V., Neagoe, A. D., y Farcasanu, I. C. (2014). Calcium signaling mediates the response to cadmium toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEBS Letters* 588, 3202-3212.
- Saleh, A. A., Gune, U. S., Chaudhary, R. K., Turakhiya, A. P., y Roy, I. (2014). Roles of Hsp104 and trehalose in solubilisation of mutant huntingtin in heat shocked *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843, 746-757.
- Sarkar, A., Ravindran, G., Krishnamurthy, V., y Campus, K. K. B. G. (2013). A brief review on the effect of cadmium toxicity: From cellular to organ level. *International Journal of Bio-Technology and Research* 3, 17-36.
- Singh, R., Chadetrik, R., Kumar, R., Bishnoi, K., Bhatia, D., Kumar, A., Bishnoi, N. R., y Singh, N. (2010). Biosorption optimization of lead(II), cadmium(II) and copper(II) using response surface methodology and applicability in isotherms and thermodynamics modeling. *Journal of Hazardous Materials* 174, 623-634.
- Singh, K., Saleh, Aliabbas A., Bhadra, Ankan K., y Roy, I. (2013). Hsp104 as a key modulator of prion-mediated oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal* 454, 217-225.
- Strevett, K. A., y Chen, G. (2003). Microbial surface thermodynamics and applications. *Research in Microbiology* 154, 329-335.

- Sulaymon, A. H., Mohammed, A. A., y Al-Musawi, T. J. (2013). Competitive biosorption of lead, cadmium, copper, and arsenic ions using algae. *Environmental Science and Pollution Research International* 20, 3011-3023.
- Tamas, M. J., Sharma, S. K., Ibstedt, S., Jacobson, T., y Christen, P. (2014). Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. *Biomolecules* 4, 252-267.
- Tessarz, P., Schwarz, M., Mogk, A., y Bukau, B. (2009). The Yeast AAA(+) Chaperone Hsp104 is part of a network that links the actin cytoskeleton with the inheritance of damaged proteins. *Molecular and Cellular Biology* 29, 3738-3745.
- Thippeswamy, B., Shivakumar, C. K., y Krishnappa, M. (2014). Study on heavy metals biosorption ability of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Biological Research* 2, 106-115.
- Towbin, H., Staehelin, T., y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4.
- Van Holle, A., MacHado, M. D., y Soares, E. V. (2012). Flocculation in ale brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Re-evaluation of the role of cell surface charge and hydrophobicity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93, 1221-1229.
- Vasudevan, P., Padmavathy, V., y Dhingra, S. C. (2003). Kinetics of biosorption of cadmium on Baker's yeast. *Bioresourcer Technology* 89, 281-287.
- Vieira, R. H., y Volesky, B. (2000). Biosorption: a solution to pollution? *International Microbiology* 3, 17-24.
- Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M. B., y Labarre, J. (2001). A Proteome Analysis of the Cadmium Response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 8469-8474.
- Volesky, B., May, H., y Holan, Z. R. (1993). Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 41, 826-829.
- Wan, L., y Zhang, H. (2012). Cadmium toxicity. *Plant Signaling and Behavior* 7, 345-348.
- Wray, W., Boulikas, T., Wray, V. P., y Hancock, R. (1981). Silver staining of proteins in polyacrylamide. *Analytical Biochemistry* 203, 197-203.
- Wysocki, R., y Tamás, M. J. (2010). How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS Microbiology Reviews* 34, 925-951.
- Zoghi, A., Khosravi-Darani, K., y Sohrabvandi, S. (2014). Surface binding of toxins and heavy metals by probiotics. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 14, 84-98.