



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

CAPACIDAD DE BIOSORCIÓN DE METALES PESADOS EN *Saccharomyces cerevisiae* APORTADO EN LA DIETA DE GANADO BOVINO PRODUCTOR DE LECHE

SERGIO SAMUEL SILVA MORALES

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2022



COLEGIO DE POSTGRADUADOS


INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **Capacidad de biosorción de metales pesados en *Saccharomyces cerevisiae* aportado en la dieta de ganado bovino productor de leche**, realizada por el (la) estudiante: **Sergio Samuel Silva Morales**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:




Dr. David Hernández Sánchez

CODIRECTOR:



Dr. Francisco Calderón Sánchez

ASESORA:



Dra. María Magdalena Crosby Galván

ASESOR:



Dr. Numa Pompilio Castro González

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, junio de 2022

CAPACIDAD DE BIOSORCIÓN DE METALES PESADOS EN *Saccharomyces cerevisiae* APORTADO A LA DIETA DE GANADO BOVINO PRODUCTOR DE LECHE

Sergio Samuel Silva Morales, MC
Colegio de Postgraduados, 2022

RESUMEN

El presente estudio evaluó la capacidad de biosorción de metales pesados en *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) aportado en la dieta de ganado bovino productor de leche. En el primer ensayo se determinó la viabilidad y la capacidad de biosorción de Sc en un sistema *in vitro* contaminado con As, Cr, Cd y Pb, simulando el ambiente ruminal y las barreras gástrica y biliar del tubo digestivo en rumiantes, con los siguientes tratamientos: (T), T1= 3.7×10^5 , T2= 1.5×10^6 , T3= 2.6×10^6 y T4= 3.7×10^6 UFC mL⁻¹. Se determinó la viabilidad de la levadura y su capacidad de biosorción en medio ruminal, ácido y alcalino. El segundo ensayo (*in vivo*) se realizó en dos comunidades pertenecientes al Estado de Tlaxcala, México, con antecedentes de contaminación con metales pesados. Se usaron 35 vacas Holstein de 450 ± 30 kg PV, entre 1 y 6 meses de lactancia y de 2 a 4 partos. Los animales fueron suplementados con cantidades crecientes de levadura Yea Sacch, 1026 Altech, con los siguientes tratamientos (T): T0= sin Sc, T1= 5×10^8 , T2= 20×10^8 , T3= 35×10^8 y T4= 50×10^8 UFC de Sc d⁻¹, para evaluar la biosorción de metales pesados en tubo digestivo y su presencia en leche. Se recolectaron muestras de alimento, heces, orina y leche. Las muestras fueron digeridas en microondas (CEM MarsX) y los metales fueron analizados mediante espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP). Los datos se analizaron con paquete estadístico IBM SPSS STATISTICS ver. 26, viabilidad mediante prueba HSD Tukey y la biosorción *in vitro* e *in vivo* con prueba de Kruskal Wallis. Se determinó alta viabilidad *in vitro* de Sc en las tres barreras evaluadas (ruminal, acida y biliar) destacando el medio alcalino por presentar la mayor cantidad de UFC (7.7×10^{14}); de igual manera, la capacidad de biosorción fue demostrada, siendo el medio alcalino donde se dieron las mejores condiciones para este proceso (As: T2, 53.503% y Pb: T8, 91.794% de biosorción). Se evidenció contaminación por As, Pb y Cr en el alimento concentrado y As y Pb en agua. Asimismo, se comprobó la capacidad promedio de Sc para disminuir As en leche cuando se adicionan a $50 \text{ g animal}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (T4) con respecto al tratamiento testigo (T0) ($2.12 \text{ vs } 3.89 \text{ mg/kg}^{-1}$), así como el aumento de excreción en heces con el T1 ($4.61 \text{ vs } 1.53 \text{ mg/kg}^{-1}$) y orina el T4 ($0.24 \text{ vs } 0.16 \text{ mg/kg}^{-1}$); sin embargo, Sc no tuvo capacidad para disminuir los niveles de Pb en leche o excretarlo en orina, pero si en heces, aunque de forma inestable.

Palabras clave: Biosorción, metales pesados, *Saccharomyces cerevisiae*, leche.

BIOSORPTION CAPACITY OF HEAVY METALS IN *Saccharomyces cerevisiae* PROVIDED IN THE DIET OF DAIRY CATTLE

Sergio Samuel Silva Morales, MC
Colegio de Postgraduados, 2022

ABSTRACT

The present study evaluated the biosorption capacity of heavy metals in *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) provided in the diet of dairy cattle. In the first trial, the viability and the biosorption capacity of Sc were determined in an *in vitro* system contaminated with As, Cr, Cd and Pb, simulating the ruminal environment, gastric and biliary barriers of the digestive tract in ruminants, with the following treatments: (T): T1= 3.7×10^5 , T2= 1.5×10^6 , T3= 2.6×10^6 and T4= 3.7×10^6 CFU of Sc mL⁻¹. The viability of the yeast and its biosorption capacity in ruminal, acid and alkaline medium were determined. The second test (*in vivo*) was carried out in two communities belonging to the State of Tlaxcala, Mexico, with background of contamination by heavy metals. Thirty five Holstein cows of 450 ± 30 kg LW, between 1 and 6 months of lactation and 2 to 4 calvings were used. The animals were supplemented with increasing amounts of Yea Sacch yeast, 1026 Altech, with the following treatments (T): T0= without Sc, T1= 5×10^8 , T2= 20×10^8 , T3= 35×10^8 and T4= 50×10^8 CFU of Sc d⁻¹, to evaluate the biosorption of heavy metals in the digestive tract and their presence in milk. Food, feces, urine and milk were sampled. Samples were digested in microwaves (CEM MarsX) and metals were analyzed by inductively coupled plasma (ICP) optical emission spectroscopy. The data was analyzed with the statistical package IBM SPSS STATISTICS ver. 26, viability by HSD Tukey test and biosorption *in vitro* and *in vivo* with Kruskal Wallis test. High *in vitro* viability of Sc was determined in the three barriers (ruminal, acid and biliary), highlighting the alkaline medium for presenting the highest amount of CFU (7.7×10^{14}); likewise, the biosorption capacity was demonstrated, being the alkaline medium where the best conditions were given to carry out said process (As: T2, 53.503% and Pb: T8, 91.794% of biosorption). Contamination by As, Pb and Cr in food was evidenced, as well as As and Pb in water. In the same sense, the ability of Sc to decrease As up stably in milk when SC was added to $50 \text{ g animal}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (T4) was verified, as well as its excretion in feces with T1 and urine with T4 however, Sc did not have the capacity to decrease Pb levels in milk or excrete them in urine, but in faeces yes.

Key words: biosorption, heavy metals, *Saccharomyces cerevisiae*, milk.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser el pilar en mi vida, mi fuerza en los momentos de tormento y el impulso para seguir adelante. Gracias por llenarme de alegrías, bendiciones y retos. Lo que soy y pueda llegar a ser será para glorificarte.

A los Doctores David Hernández Sánchez, Francisco Calderón Sánchez, Numa Pompilio Castro González, Dra. María Magdalena Crosby Galván e Ingeniero Margarita Crosby Galvan, gracias por su apoyo y paciencia en el desarrollo de este proyecto de investigación, sus conocimientos y experiencia fueron clave para llevar a término esta etapa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico para llevar a cabo mi preparación académica.

Al Colegio de Postgraduados, en especial al Campus Montecillo por facilitar mi estadía y el cumplimiento de mi investigación.

Al Programa de Recursos Genéticos y productividad- Ganadería, y su cuerpo académico por ser parte de mi formación profesional.

A los amigos que hice durante mi estancia en el Colegio, les agradezco el tiempo y risas que me brindaron, hicieron de la maestría un periodo muy agradable.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres Concepción y Sonia, por su apoyo incondicional en el término de mi formación académica y agradezco sean partícipes de este paso importante en mi vida. Siempre los llevo en mi mente como modelo a seguir.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vi
LISTAS DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
I.INTRODUCCIÓN	1
II.OBJETIVOS E HIPÓTESIS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
2.3 Hipótesis	3
III.REVISIÓN DE LITERATURA	4
3. 1 Metales pesados (plomo, cadmio, arsénico y cromo)	4
3. 2 Metales en aguas residuales	4
3. 3 Metales pesados en suelo	9
3. 4 Regiones de México con incidencia de contaminación con metales pesados	11
3. 5 Intoxicación por plomo, cadmio, arsénico y cromo.....	12
3. 6 Contaminantes en los alimentos	13
3. 6.1 Niveles máximos permisibles de arsénico, cromo, cadmio y plomo en alimentos	14
3. 6. 2 Presencia de metales pesados en los seres vivos.....	16
3. 7 Generalidades de leche	18
3. 7. 1 Contaminación de la leche con metales pesados	18
3. 8 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
3. 8.1 Biosorción	20
3. 8. 2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y su capacidad de biosorción	22
3. 8. 3 Biosorción de metales pesados por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en leche	24
3. 8. 4 Viabilidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en el tubo digestivo	26

3. 8. 5 Resistencia al estrés de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
3. 9 Índice de contaminación por metales pesados (HMI) en leche	29
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	32
4.1 Ubicación	32
4. 2 Ensayo <i>in vitro</i> : viabilidad y capacidad de biosorción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio ruminal, ácido y alcalino	33
4. 2 .1 Preparación y reactivación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
4. 2. 2 Viabilidad <i>in vitro</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en el ambiente ruminal	35
4. 2. 2. 1 Inoculación de los medios de cultivo	35
4. 2. 3 Viabilidad <i>in vitro</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio ácido	36
4. 2. 4 Viabilidad a sales biliares.....	37
4. 2. 5 Biosorción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en ambiente ruminal	37
4. 2. 6 Capacidad de biosorción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio ácido	38
4. 2. 7 Capacidad de biosorción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio con sales biliares	39
4. 3 Digestión de muestras	39
4. 4 Evaluación de remoción	40
4. 5 Ensayo <i>in vivo</i> : biosorción de metales pesados por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en ganado lechero	40
4. 5. 1 Tratamientos experimentales.....	40
4. 5. 2 Animales	41
4. 5. 3 Alimentación	41
4. 5. 4 Toma de muestras	42
4. 5. 4. 1 Agua	42
4. 5. 4. 2 Alimento concentrado	42
4. 5. 4. 3 Forraje	42
4. 5. 4. 4 Leche	43
4. 5. 4. 5 Heces	43
4. 5. 4. 6 Orina.....	43

4. 5 .5 Tratamiento de muestras	43
4. 5. 5. 1 Agua	43
4. 5. 5. 2 Alimento concentrado	44
4. 5. 5. 3 Forraje y ensilado	44
4. 5. 5. 4 Leche.....	44
4. 5. 5. 5 Heces	44
4. 5. 5. 6 Orina.....	44
4. 6 Determinación de metales pesados	45
4. 7 Índice de contaminación por metales pesados (HMI)	45
4. 8 Diseño experimental	45
4. 9 Estadístico	46
V.RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL	47
5.1 Viabilidad in vitro de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en diferentes condiciones del tubo digestivo	47
5.2 Biosorción in vitro de <i>S. cerevisiae</i>	51
5. 2. 1 Biosorción de <i>S. cerevisiae</i> en medio ruminal	51
5. 2. 2 Biosorción de <i>S. cerevisiae</i> en medio ácido	52
5. 2. 3 Biosorción de <i>S. cerevisiae</i> en medio con sales biliares.....	54
5. 3 Ensayo <i>in vivo</i> : Presencia de metales pesados en agua y alimentos	56
5. 3. 1 Determinación de metales pesados en forrajes y concentrados en la zona de estudio	56
5. 3. 2 Determinación de metales pesados en agua en la zona de estudio	57
5. 4 Biosorción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en tubo digestivo de ganado lechero	59
5. 4. 1 Excreción de arsénico en orina y heces	59
5. 4. 2 Presencia de arsénico en leche.....	63
5. 4. 3 Excreción de plomo en orina y heces	67
5. 4. 4 Presencia de plomo en leche.....	72
5.5 Índice de contaminación por metales pesados (HMI)	74
VI. CONCLUSIÓN.....	76
VII. LITERATURA CITADA	77

LISTAS DE CUADROS

Cuadro 1. Entidades con mayor disponibilidad del servicio de tratamiento de aguas residuales municipales	6
Cuadro 2. Límites máximos permisibles de metales pesados en diferentes tipos de agua	8
Cuadro 3. Concentraciones de referencia totales por tipo de uso de suelo	10
Cuadro 4. Legislación de la Unión Europea de contaminantes químicos en productos alimentarios	14
Cuadro 5. Análisis del arsénico inorgánico, el plomo y los hidrocarburos aromáticos policíclicos, y a determinados criterios de funcionamiento aplicables al análisis - piensos y alimentos para consumo animal.	15
Cuadro 6. Norma general del CODEX para contaminantes y toxinas presentes en alimentos y piensos	15
Cuadro 7. Valores de referencia de algunos metales pesados	17
Cuadro 8. Metales pesados en leche	19
Cuadro 9. Concentraciones máximas de arsénico, cadmio y plomo en leche cruda	19
Cuadro 10. Índice de contaminación por metales pesados en diferentes países.....	31
Cuadro 11. Medio de cultivo anaerobio.....	36
Cuadro 12. Tratamientos experimentales	41
Cuadro 13. Viabilidad in vitro de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio ruminal, ácido y alcalino.....	50
Cuadro 14. Biosorción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio ruminal.....	52
Cuadro 15. Biosorción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio ácido	54
Cuadro 16. Biosorción de <i>S. cerevisiae</i> en un medio alcalino.....	56
Cuadro 17. Contenido de metales pesados en forrajes y concentrado empleados en la zona de estudio	57
Cuadro 18. Metales pesados en agua de abastecimiento en unidades productivas (UP) de ganado lechero	59
Cuadro 19. Biosorción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en tubo digestivo de ganado lechero y su efecto en la excreción de arsénico en orina.....	60

Cuadro 20. Biosorción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en tubo digestivo de ganado lechero y su efecto en la excreción de arsénico en heces	62
Cuadro 21. Biosorción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en tubo digestivo de ganado lechero y su efecto en la disminución de arsénico en leche.....	65
Cuadro 22. Biosorción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en tubo digestivo de ganado lechero y su efecto en la excreción de plomo en orina.....	68
Cuadro 23. Biosorción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en tubo digestivo de ganado lechero y su efecto en la excreción de plomo en heces	70
Cuadro 24. Biosorción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en tubo digestivo de ganado lechero y su efecto en la disminución de plomo en leche	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de la zona de estudio en el Estado de Tlaxcala, México.	33
--	----

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación del medio ambiente por metales pesados, así como con metaloides, se considera como uno de los grandes problemas actuales que compromete la salud pública, esto en razón a su presencia en los diferentes ecosistemas y en la cadena alimentaria (Reyes *et al.*, 2016). La intoxicación crónica como la forma más común de exposición, puede traer consigo defectos congénitos y cancerígenos (García *et al.*, 2016), representando así un riesgo latente debido a su persistencia, biotransformación, bioacumulación y la elevada toxicidad; Aunado a lo anterior, se menciona que estos compuestos son acumulativos y no biodegradables. (Rodríguez, 2017).

La leche es uno de los alimentos más importantes en la dieta mexicana y la actividad relacionada a su producción y transformación, figura dentro de las tres de mayor relevancia en la industria de los alimentos (Durán, 2016); de la misma forma, la leche es un alimento equilibrado y completo que proporciona un elevado contenido de nutrientes considerados necesarios durante el desarrollo de las personas (Fernández *et al.*, 2015). Sin embargo, estudios desarrollados por diferentes autores, confirman la presencia de metales pesados en la leche producida en zonas agrícolas que son irrigadas con aguas residuales, tal es el caso de Castro-González *et al.* (2019), quienes corroboran dichos elementos en la cuenca del Alto Balsas, en los estados de Puebla y Tlaxcala.

Bajo el escenario anterior, resulta necesario el constante monitoreo de las diferentes matrices biológicas (agua, suelo, alimentos etc.) en cuanto a su contenido de metales pesados, como una herramienta para disminuir el riesgo en la salud., ya que no deben ser subestimados aun cuando estos contaminantes se encuentren en pequeñas cantidades (González *et al.*, 2018; Falero, 2021). Una de las ventajas de la determinación de este tipo de contaminantes en la cadena alimentaria, es que permite el cálculo del cociente de peligro de padecer enfermedades cancerígenas y no cancerígenas, así como el riesgo total de cáncer (Castro-González *et al.*, 2017).

Actualmente se han desarrollado diferentes estrategias con el objetivo de disminuir la presencia de contaminantes metálicos en el ambiente y los alimentos. Una de estas y más estudiadas es la biosorción (Massoud *et al.*, 2020). En este proceso, se usa biomasa

y microorganismos como agentes adsorbentes; tal es el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual muestra esta capacidad en soluciones acuosas (Wang y Chen, 2006; Moreno y Montfort, 2019) y en muestras de leche (Massoud *et al.*, 2019; Massoud *et al.*, 2020;) al capturar iones metálicos por diferentes mecanismos.

Los suelos de las zonas aledañas a los municipios de Tepetitla de Lardizabal e Ixtacuixtla de Mariano Matamoros, Tlaxcala son irrigados con aguas residuales de origen industrial, algunos de esos sitios representan riesgos para la población debido al contacto continuo con suelo contaminado (Castro-González *et al.*, 2017), así mismo; se han reportado presencia de metales pesados en forrajes usados en la alimentación de ganado lechero (Castro-González *et al.*, 2018), de igual forma en leche, orina y sangre de vacas que se alimentan con dichos insumos (Castro-González *et al.*, 2021). Por lo anterior, en este estudio se evalúa la capacidad de biosorción de metales pesados usando células viables de *Saccharomyces cerevisiae* en la dieta de ganado bovino productor de leche, para reducir la absorción de estos contaminantes en el tubo digestivo y minimizar su presencia en la leche.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad de biosorción de *Saccharomyces cerevisiae* sobre arsénico, cromo, cadmio y plomo en el tubo digestivo bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*, cuando se adiciona a cuatro niveles en la dieta de ganado bovino productor de leche que consume dietas contaminadas con metales pesados.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* en un sistema *in vitro* simulando el ambiente ruminal, las barreras gástrica y biliar del tubo digestivo en rumiantes.
- Establecer la concentración de *Saccharomyces cerevisiae* adecuada que permita mayor biosorción en presencia de medio con arsénico, cromo, cadmio y plomo bajo condiciones *in vitro* simulando ambiente ruminal y las barreras gástrica y biliar del tubo digestivo en rumiantes.
- Cuantificar la concentración de arsénico, cromo, cadmio y plomo en heces, orina y leche de ganado bovino que consume dietas contaminadas con metales pesados y adicionadas con cuatro niveles de *Saccharomyces cerevisiae* como biosorbente.

2.3 Hipótesis

Saccharomyces cerevisiae tiene potencial de sobrevivencia, así como biosorción de arsénico, cromo, cadmio y plomo en diferentes condiciones ambientales *in vitro* del tubo digestivo, y su inclusión en niveles crecientes en la dieta de ganado bovino alimentado con forrajes y concentrados contaminados con metales pesados, disminuirá de forma proporcional la concentración de estos en leche.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3. 1 Metales pesados (plomo, cadmio, arsénico y cromo)

Son elementos de elevado peso atómico potencial y ambientalmente tóxicos debido a su bioacumulación y persistencia. Los metales pesados pueden ser emitidos naturalmente o de forma antropogénica, esta última como la fuente más peligrosa. Entre los metales pesados empleados en procesos industriales, son el cadmio, cobre, plomo, mercurio, cromo y metaloides como el arsénico que, incluso en pequeñas concentraciones pueden ser nocivos para las plantas y animales (Barreiro *et al.*, 2000).

El plomo es un metal pesado y blando de color grisáceo el cual se puede encontrar asociado a otros metales como el cobre, cinc, hierro y plata. Las principales fuentes de contaminación por este metal en el medio están relacionadas con la industria de la elaboración de pinturas, latas, baterías, cerámica y fundición de metales (Ferrer, 2003). El cadmio es un metal presente en la naturaleza que suele formar parte de sulfuros y carbonatos de zinc. Los subproductos de procesamiento de metales como el cobre y actividades relacionadas con la fabricación de pinturas, cerámica baterías de níquel son los principales contaminantes (Pérez y Azcona, 2012).

El arsénico es un metaloide ampliamente distribuido en la naturaleza, forma parte de minerales junto al hierro, níquel, cobre y sulfuros. Los compuestos de arsénico se emplean en plaguicidas, conservantes de madera, aleaciones de plomo y cobre. En cuanto al cromo (Cr) su estado hexavalente es el más importante en cuando a su toxicidad se refiere y las principales vías de exposición son la inhalatoria y por ingestión (productos contaminados). La toxicidad por Cr en plantas se ve reflejado en una disminución del crecimiento, manifestación de clorosis, hojas con poco desarrollo, pardas o de color púrpura (sobre todo en maíz), fuerte disminución del crecimiento radicular e inhibición el crecimiento (Poschenrieder *et al.*, 2015).

3. 2 Metales en aguas residuales

La actual escasez de agua provocada por el crecimiento demográfico y la urbanización ha dado lugar al uso de aguas residuales como un recurso en las actividades agrícolas,

aunque si bien el uso de las aguas residuales es una forma de reciclar el agua, su uso no controlado puede tener impacto negativo sobre la sanidad alimentaria (Winpenny *et al.*, 2010). En el estado de Puebla se ubican 217 municipios, de los cuales 34 cuentan con servicio de tratamiento de aguas residuales, mientras que los otros 183 no lo tienen. Esto señala que gran parte del agua residual no ha sido sometida a procesos que aseguren su uso (INEGI, 2017),

En el Cuadro 1 se puede observar la relación de algunos estados que tienen mayor disponibilidad de tratamiento de aguas con el número de servicios activos de tratamiento de aguas residuales, algunos presentando menos de la mitad de los municipios con este servicio.

Cuadro 1. Entidades con mayor disponibilidad del servicio de tratamiento de aguas residuales municipales

Entidad federativa	Total, de municipios/delegaciones	Con servicio de tratamiento de aguas residuales	Sin servicio de tratamiento de aguas residuales	Sin información
Estados Unidos Mexicanos	2457	827	1628	2
Chihuahua	67	36	31	0
Durango	39	35	4	0
Guanajuato	46	36	10	0
Jalisco	125	63	62	0
México	125	57	68	0
Nuevo León	51	48	3	0
Oaxaca	570	117	451	2
Puebla	217	34	183	0
Veracruz	212	57	155	0
Zacatecas	58	34	24	0

Fuente: INEGI, 2017.

El uso más común del agua residual es la actividad agrícola; representando un alto riesgo en la salud humana y ambiental (Arreguin *et al.*, 2000). A pesar de esto, el seguimiento es casi nulo y los impactos como la contaminación de aguas superficiales/subterráneas, salinización de suelos y fijación de contaminantes en suelos y plantas se hacen más evidentes (Guadarrama y Galván, 2015). Los contaminantes presentes en aguas residuales se pueden tipificar por calidad microbiológica y química, mismos que están relacionados con los aspectos a verificar como el microbiológico, químico, radiológico y

de aceptabilidad (OMS, 2006). Abdel *et al.* (2003) señalan que la razón de encontrar metales pesados en este tipo de agua es debido a las diferentes actividades que se realizan a su paso, ya que recoge sustancias o se vierten compuestos de zonas industriales y agrícolas, permitiendo al mismo tiempo su propagación y sedimentación (Vera *et al.*, 2016).

En las últimas décadas se han encontrado sitios que presentan un riesgo a la salud humana debido al uso de aguas residuales por tiempo prolongado. Mancilla *et al.* (2012) determinaron la cantidad de metales pesados presentes en agua para riego en los Estados de Puebla y Veracruz, concluyendo que, aunque se hallaron valores bajos en el agua residual, el constante vertido de este tipo de contaminantes en un futuro no muy lejano podría sobrepasar los límites permisibles. Al respecto, Reyes *et al.* (2016) insisten en la importancia de realizar estudios sistemáticos, científicos y complementarios del contenido de metales pesados en aguas residuales, que permitan conocer el estado de las fuentes y cuerpos de agua, dado el riesgo que representa este tipo de contaminante a la salud de los seres vivos.

En México existe la norma NOM-001 ECOL- 1996, que establece los niveles máximos de metales pesados para diferentes tipos de uso de agua (Cuadro 2).

Cuadro 2. Límites máximos permisibles de metales pesados en diferentes tipos de agua

Parámetro (mg L ⁻¹)	Promedio mensual (ríos/uso agrícola)	Promedio diario (ríos/uso agrícola)	Promedio diario (ríos/uso urbano)	Promedio mensual (ríos/uso urbano)	Aguas naturales (EPA 1986)	Riego agrícola (SEDUE 1989)	Fuente de abastecimiento de agua potable (SEDUE 1989)
Arsénico	0.2	0.4	0.1	0.2	0.05	0.1	0.05
Cadmio	0.2	0.4	0.1	0.2	0.01	0.01	0.01
Cobre	4	6	4	6	1.5	0.2	1
Cromo	1	1.5	0.5	1	0.1	1	0.05
Mercurio	0.01	0.02	0.01	0.01	0.002	0	0
Niquel	2	4	2	4	0.632	0.2	0.01
Plomo	0.5	1	0.2	0.04	0.0015	5	0.05
Zinc	10	20	10	20	5	2	5

Fuente: NOM-001 ECOL- 1996

3. 3 Metales pesados en suelo

Es conocido que los metales pesados están presentes en el suelo como un componente natural, producto de actividades antropogénicas o por ser vertidos mediante el uso de aguas residuales, (Prieto *et al.*, 2009). La minería, industrial textil y la aplicación intensiva de fertilizantes y pesticidas son algunos de los factores que se suman a la contaminación de suelos (González *et al.*, 2015; Covarrubias y Cabriales, 2017)) los cuales al mismo tiempo aumentan la probabilidad de transferir estos elementos a los productos agroalimentarios (Nava y Méndez, 2011); asimismo, se considera un suelo contaminado con metales pesados cuando el contenido de estos alcanza niveles por encima de los límites máximos permitidos (Cuadro 3), en otros casos más severos se pueden presentar crecimiento anormal de plantas (Méndez *et al.*, 2009).

Cuadro 3. Concentraciones de referencia totales por tipo de uso de suelo

Contaminante	Uso agrícola/ residencial/comercial, mg kg ⁻¹	Uso industrial, mg kg ⁻¹
Arsénico	22	260
Bario	5400	67000
Berilio	150	1900
Cadmio	37	450
Cromo Hexavalente	280	510
Mercurio	23	310
Níquel	1600	20000
Plata	390	5100
Plomo	400	800
Selenio	390	5100
Talio	5.2	67
Vanadio	78	1000

Fuente: Nom-147-SEMARNAT.

Los elementos metálicos en el suelo se pueden encontrar en diferentes formas: en adsorción, absorbidos, en disolución o en partículas como fase sólida (Rulkens *et al.*, 1995) y todas ellas van a depender de la relación con los poros del suelo, esto significa que algunos se hallarán en el agua intersticial, rodeando partículas o en la periferia de estos. Existen factores que intervienen en la movilidad de iones metálicos como el pH, contenido de materia orgánica, textura de suelo y capacidad de intercambio catiónico (Galán y Romero, 2008) de manera que la mayoría de los metales pesados se encontrarán más biodisponibles a pH ácido, a excepción de As, Mo, Se y Cr, mayormente móviles en medios alcalinos (Föstner, 1987; Galán y Romero, 2008).

3. 4 Regiones de México con incidencia de contaminación con metales pesados

En México, la contaminación por metales pesados es un problema cuyo conocimiento se limita principalmente al ámbito científico, aunque los efectos sean ya visibles en varias partes del país. Hasta hace apenas algunas décadas se sabe de la presencia de contaminantes metálicos en diferentes ambientes y seres vivos (Dávila *et al.*, 2012).

Diversos son los elementos potencialmente tóxicos (EPT) que se reportan, entre ellos figuran el arsénico, mercurio, cromo y plomo. Su presencia y concentración depende de la fuente de contaminación (Covarrubias y Cabriales, 2017), destacando las actividades humanas como la industria, metalurgia, agricultura intensiva, vehículos o en otros casos fuentes naturales (Covarrubias y Cabriales, 2017; Villanueva y Botello, 1992.)

Con base a lo antes citado, Villanueva y Botello (1992) mencionan que las concentraciones de mercurio y plomo en zonas costeras industriales mexicanas (Tabasco y Veracruz) contrastan con la ausencia de estos en regiones donde no hay industrialización. Así mismo, Dávila *et al.* (2012) señalan que la contaminación no sólo se limita a zonas industriales o mineras, sino que los EPT generados puede llegar a formar parte de suelos y plantas debido al uso de aguas residuales contaminadas, como ocurre en zonas agrícolas del Estado de Zacatecas, México. Congruente con esto, Tun-Canto *et al.* (2017) evidenciaron la presencia de cadmio, mercurio y cobre en sedimentos superficiales de canales usados como desagüe en zonas cañeras del Estado de Quintana Roo. Por su parte, Buenfil *et al.* (2015) detectaron niveles de mercurio y cadmio, así como metalotioneinas en plasma y tejido de cocodrilo de pantano para esa misma zona.

Es importante señalar que la existencia de estos elementos en zonas de riego agrícolas revela la alta vulnerabilidad del suelo a ser receptor de residuos (Sánchez *et al.*, 2015), y no sólo en zonas mineras se han encontrado concentraciones altas de metales pesados. De esta forma, Castro-González *et al.* (2018) reportaron niveles de 0.039 a 0.059 mg de Pb kg⁻¹ de leche obtenida de vacas alimentadas con forrajes contaminados en zonas periféricas al Estado de Puebla y Tlaxcala. Esto sugiere que el uso de aguas

residuales con origen industrial puede aportar contaminantes de esta naturaleza e incluso hacer que estos formen parte de la cadena alimenticia (Prieto *et al.*, 2009). En el estudio conducido por Mancilla *et al.* (2012) se reportaron concentraciones de Cd, Hg y Pb por encima de los límites permisibles para consumo humano, en agua de riego de Puebla y Veracruz, y concluyen que las descargas constantes de contaminantes en los ríos aumentan el riesgo de que los metales pesados lleguen a mantos acuíferos usados para consumo humano.

3. 5 Intoxicación por plomo, cadmio, arsénico y cromo

Padecimientos como dolor muscular, neuropatías, alteraciones renales y hepáticas, así como nefritis crónica, entre otras afecciones, están implicadas a la exposición prolongada al plomo en humanos (Rodríguez, 2017). En plantas se ha observado que provoca estrés oxidativo, ocasionando inestabilidad de las membranas celulares y al mismo tiempo alteración de procesos fisiológicos, involucrando desordenes en germinación y crecimiento de tallos (Guzmán *et al.*, 2013).

En cuanto a la exposición crónica a cromo en humanos, puede ocasionar pérdida de la capacidad de absorción de nutrientes y disfunción renal. Las personas afectadas comparten signos similares con el Síndrome de Falconi (Satarug *et al.*, 2011). Este metal en plantas interfiere en la absorción de nutrientes esenciales para las plantas (Ca, Mg, P y K), así como en la apertura estomática, fotosíntesis y transpiración (Rodríguez *et al.*, 2008). De Souza (2015) menciona que a partir de concentraciones de 0.03 mM absorbidas por la especie *Triticum aestivum*, hay una disminución del porcentaje de germinación y un efecto inhibitor en el crecimiento de las raíces.

El metaloide arsénico es considerado un agente cancerígeno humano, causante de tumores epidermoides. En intoxicación crónica se pueden evidenciar dermatitis y alteraciones hematológicas (Ferrer, 2003). Rico *et al.* (2013) relacionaron altas concentraciones de arsénico con daños genotóxicos en las células meristemáticas de las raíces de plantas, expresado por la aparición de micronúcleos en dichas células.

La exposición al cromo en humanos se asocia con actividades de riesgo como la minería, industria del cemento, metales etc. y suele estar acompañada de afecciones como

sensibilización cutánea, citotoxicidad e inflamación de neumocitos. En exposición respiratoria se eleva la incidencia a desarrollar cáncer pulmonar (Cuberos, 2009). Delgado *et al.* (2013) menciona que el efecto citotóxico del cromo actúa sobre los hepatocitos induciendo apoptosis además de promover fragmentación del ADN.

3. 6 Contaminantes en los alimentos

El constante crecimiento demográfico, el desarrollo industrial, los escasos de agua y la intensificación de la agricultura son factores que han generado cambios en la forma de producir los alimentos, repercutiendo al mismo tiempo en la calidad del aire, agua y suelos agrícolas (Reyes *et al.*, 2016). Esto a su vez ha obligado a hacer un sobreuso de tecnologías y recursos, prácticas que en su mayoría generan problemas para la población en materia de seguridad alimentaria (García *et al.*, 2002).

Friedrich (2014) hace referencia al concepto de seguridad alimentaria como un derecho de las personas al acceso físico, social, inocuo y nutritivo de alimentos que satisfagan sus necesidades alimentarias. No obstante, la situación actual muchas veces no permite cumplir con estos criterios, siendo una de las causas las enfermedades de origen alimentario; las cuales implican agentes de origen ambiental o antropogénico, catalogados como físicos, biológicos y químicos (De Plata, 2003). Algunos de los contaminantes presentes son los metales pesados, caracterizados por su elevada toxicidad y capacidad de bioacumulación en ecosistemas y seres vivos (Nava y Méndez, 2011; Reyes *et al.*, 2016). Nava y Méndez (2011) mencionan que la acción de estos elementos sobre la salud humana es ocasionada vía medio ambiente (aire, suelo y agua) y por acumulación en la cadena alimenticia.

Hoy se sabe que la presencia y la toxicidad de los metales pesados está ligada a la naturaleza en la que se encuentren, ya que de eso depende la biodisponibilidad (Carusso *et al.*, 2003); de igual manera, la constante revisión de los límites permisibles que hay en cada país juega un papel importante en la reducción del riesgo a padecer enfermedades ocasionadas por metales pesados. A pesar de esto, resulta necesaria la modificación de los límites para elementos metálicos en alimentos, suelo, agua y aire, ya que muchos contrastan con las normas internacionales (Castro *et al.*, 2017).

3. 6.1 Niveles máximos permisibles de arsénico, cromo, cadmio y plomo en alimentos

El arsénico, cromo y plomo son algunos de los principales elementos potencialmente tóxicos en México debido a su toxicidad e incidencia en el ambiente (Covarrubias y Cabriales, 2017); otros como el cadmio recurrentemente suele aparecer en los alimentos (Sierra *et al.*, 2005). A pesar de esto, el criterio para decidir si un alimento está contaminado depende de cada país, debido a los niveles máximos permisibles establecidos en cada uno de éstos. En los Cuadros 4, 5 y 6 se muestran algunas regulaciones internaciones de metales pesados en diferentes alimentos.

Cuadro 4. Legislación de la Unión Europea de contaminantes químicos en productos alimentarios

Cadmio	Plomo
Producto y contenido máximo mg kg ⁻¹ peso fresco	Producto y contenido máximo mg kg ⁻¹ peso fresco
Carne de bovino, ovino, cerdos y aves de corral: 0.05	Leche de vaca: 0.02
Crustáceos: 0.5	Preparados para lactantes:0.02
Hígado de vaca, oveja, cerdo y aves de corral: 0.5	Carne de bovino, ovino, cerdos y aves de corral: 0.1
Cereales: 0.1	Despojos comestibles de animales: 0.5
Hortalizas: 0.05	Crustáceos: 0.5
Hortalizas de hoja, hierbas aromáticas y setas cultivadas: 0.2	Cereales: 0.2
Tallos, hortalizas de raíz y patatas: 0.1	Hortalizas, hierbas frescas y setas: 0.3

Fuente: Reglamento CE No 1881/2006.

Cuadro 5. Análisis del arsénico inorgánico, el plomo y los hidrocarburos aromáticos policíclicos, y a determinados criterios de funcionamiento aplicables al análisis - piensos y alimentos para consumo animal.

Metal	Nivel máximo, mg kg ⁻¹
Arsénico	0.1
Cadmio	0.1
Plomo	0.01

Fuente: Reglamento UE 2016/582.

Cuadro 6. Norma general del CODEX para contaminantes y toxinas presentes en alimentos y piensos.

Arsénico	Cadmio	Plomo
Producto y Contenido máximo, mg kg ⁻¹	Producto y Contenido máximo, mg kg ⁻¹	Producto y Contenido máximo, mg kg ⁻¹
Grasas y aceites comestibles: 0.1	Hortalizas (bulbo y fruto): 0.05	Hortalizas (bulbo y fruto): 0.05
Grasas animales: 0.1	Legumbres: 0.1	Legumbres: 0.1
Aceites: 0.1	Raíces y tubérculos: 0.1	Cereales: 0.1
Agua mineral natural: 0.01	Aguas minerales naturales: 0.003	Aguas minerales naturales: 0.003
Sal de calidad alimentaria: 0.5	Hortalizas de hoja: 0.2	Hortalizas de hoja: 0.2

Fuente: CODEX STAN 193-1995.

Aunque la mayoría de los límites máximos permisibles suelen ser parecidos entre Codex y la comisión europea como en el caso de hortalizas/cereales, se aprecian otras diferencias, por ejemplo; la ausencia de límites máximos para el cromo en el Codex o la falta de contenido máximo de más elementos potencialmente tóxicos en leche, ya que solo existe para plomo y en las últimas décadas se ha evidenciado la presencia de metales pesados y metaloides en dicho producto de origen animal, esto también sugiere un problema de legislación al no tener límites que eviten la presencia excesiva de estos.

3. 6. 2 Presencia de metales pesados en los seres vivos

Los metales pesados tienen alta persistencia en los seres vivos, esto significa que el periodo de excreción puede durar varios años, involucrando una amplia gama de efectos tóxicos y teratogénicos (Tchounwou *et al.*, 2012). La mayor fuente de exposición es por la ingestión de alimentos contaminados, seguido del aire, agua y por último el suelo, sin embargo, estos factores son dependientes del medio (Ferrer, 2003).

La cuantificación de metales pesados en muestras biológicas permite tener un amplio panorama en base a la dinámica de estas sustancias en el cuerpo de los seres vivos. Así lo mencionan Tirado *et al.* (2015) en su trabajo, donde toma como matriz de referencia la sangre con el fin de encontrar resultados que reflejen la concentración real en el organismo vivo; sin embargo, también existen otras alternativas de uso de matrices biológicas como son la recolección de uñas, cabello, saliva y orina, de esta forma según el estudio realizado por el la cantidad de metales pesados en las matrices biológicas quedan de la siguiente manera: uñas (Cu > Zn > Pb > Hg > Ca), cabello (Zn > Cu > Pb > Ca > Hg), saliva (Zn > Hg > Ca > Pb > Cu), orina (Pb > Hg > Zn > Ca > Cu) y sangre (Hg > Pb > Cu > Zn > Ca) En el Cuadro 7 se muestran valores de referencia de metales pesados en diferentes matrices biológicas.

Cuadro 7. Valores de referencia de algunos metales pesados.

Metales/ Muestras	Uñas	Cabello	Saliva	Orina	Sangre
Cadmio	0.018 $\mu\text{g g}^{-1}$	0.41 $\mu\text{g g}^{-1}$	0.43 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.32 g L^{-1}	0.55 $\mu\text{g L}^{-1}$
Mercurio	0.033 $\mu\text{g g}^{-1}$	0.037 $\mu\text{g g}^{-1}$	0.015 mg 100 mL^{-1}	0.89 g L^{-1}	0.95 g L^{-1}
Plomo	0.062 $\mu\text{g g}^{-1}$	4.06 $\mu\text{g g}^{-1}$	25.5 $\mu\text{g L}^{-1}$	1.63 g L^{-1}	56.8 mg L^{-1}
Zinc	129-179 $\mu\text{g g}^{-1}$	102 $\mu\text{g g}^{-1}$	23-70 mg g^{-1}	0.5 mg g^{-1}	0.70 mg L^{-1}
Cobre	65.8 \pm 17 ppm	5.0 $\mu\text{g g}^{-1}$	19.6 $\mu\text{g L}^{-1}$	11.38 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.75 mg L^{-1}

Fuente: Tirado *et al.*, 2015.

Durante su paso por el tubo digestivo en rumiantes, los metales pesados pueden sufrir cambios en su naturaleza, algunas de estas modificaciones son debido al incremento de sulfuros por acción de microorganismos, metilación e incremento de toxicidad (Marounek y Joch, 2014). Forsberg (1977) también menciona los microorganismos presentes en rumen y su importancia en la precipitación de iones metálicos en líquido ruminal.

Factores que tienen lugar en el tubo digestivo como la quelación de metales por proteínas de unión en microorganismos y cambios de absorción por inhibición competitiva con otros nutrientes pueden ser la razón de que estos elementos tengan órganos y tejidos diana (hígado, cabello, pezuñas, hueso, riñón) (Phillips y Mohamed, 2011). Del mismo modo, Engwa *et al.* (2019) muestran que cuando los metales llegan a un medio muy ácido (abomaso en rumiantes) estos sufren oxidación que los hace fácilmente disponibles para formar puentes con proteínas y enzimas, dada su afinidad por los grupos tiol. Asimismo, Foulkes. (1991) indica que la absorción de dichos contaminantes depende de dos fases, una de unión con componentes de las membranas celulares y otra con la internalización de este a la célula, esto puede indicar que es necesaria la interacción o formación de

complejos con moléculas biológicas para formar parte de sistemas biológicos (Foulkes, 2000).

Existen otros factores que dificultan el proceso de absorción (antagonismo), tal es el caso del Cd que compite con el Cu, ya sea por los sitios de absorción o la inducción de metalotioneinas que se unen a Cu (Gawthorne, 1987) o la absorción de Cd afectada por Zn (Wilkinson y Phillips, 2003). Kello y Kostial (1977) mencionan otros factores limitantes en la absorción de metales como lo son la especie de metal, pH del medio en tubo digestivo, proporción o ingesta y la edad del animal (mayor en jóvenes).

3. 7 Generalidades de leche

La leche puede definirse como la secreción normal de la glándula mamaria obtenida por el ordeño completo de bovinos sanos cuya composición no es estable durante la lactancia y esta puede ser afectada por factores internos y externos al animal. (Gómez y Mejía, 2005).

3. 7. 1 Contaminación de la leche con metales pesados

Como se ha mencionado, el estudio de los metales pesados es de gran interés en materia de inocuidad y en el caso de la leche un tema en particular de riesgo, ya que se ha comprobado que la leche de bovinos que consumen forrajes que crecen a orilla de ríos contaminados suelen tener concentraciones considerables de estos contaminantes (Fuentes *et al.*, 2005). Paralelamente Reyes *et al.* (2016) mencionan que la leche de bovinos que pastorean e ingieren agua, pastos o forrajes contaminados con metales pesados (Hg, As, Cd, y Pb) influye sobre las concentraciones de dichos elementos en la leche y carne. Aunado a esto, Castro-González *et al.* (2017) indica que el consumo de leche contaminada puede provocar efectos negativos como el desarrollo de enfermedades cancerígenas.

En el Cuadro 8 se muestran los niveles de algunos metales pesados en leche encontrados por diferentes autores en México y otros países, tal es el caso de la concentración reportada por Suarez. (2017) de As, Pb y Cd en Perú, la cual se observa por encima de las demás, mientras que, en Cr el rango presentado por Iqbal *et al.* (2020)

en Pakistán también es el más elevado para este ejemplo. En el cuadro 9 se muestran los niveles máximos de algunos metales pesados en leche.

Cuadro 8. Metales pesados en leche

País y autor	Concentración de metal pesado en leche
Castro-González <i>et al.</i> (2018), México.	As: 0.029-0.039, Cr: 0.010-0.017, Cd: 0.001-0.003 y Pb: 0.039-0.059 mg/Kg ⁻¹ MS
Suarez. (2017), Perú.	As: 0.039, Cd: 0.57 y Pb: 0.78 mg/L ⁻¹
Meshref <i>et al.</i> , (2014), Egipto.	Cd: 0.179 y Pb: 0.044 ppm
Yasotha <i>et al.</i> (2021), India.	Cd: 0.18 y Pb: 0.37 mg/L ⁻¹
Iqbal <i>et al.</i> (2020), Pakistan.	Cr: 0.05-1.4, Cd: 0.0012-0.104 y Pb: 0.0071-0.36 mg/Kg ⁻¹
Su <i>et al.</i> , (2021), China.	As: 0.43, Cr: 1.21, Cd: 0.15 y Pb: 2.86 µg/L ⁻¹
De la Cueva <i>et al.</i> (2021), Ecuador.	As: 0.0001 y Pb: 0.339 mg/Kg ⁻¹

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 9. Concentraciones máximas de arsénico, cadmio y plomo en leche cruda

Contenido	
Metales	mg kg ⁻¹
Arsénico	0.2**
Plomo	0.5*

Fuente: CODEX, 1995*, NOM-243-SSA1-2010

3. 8 *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los probióticos más usados en la nutrición de rumiantes, destacando como estimulador y modificador de la fermentación ruminal, ayudando de esta manera al crecimiento microbiano (Rodríguez, 2018).

Varios estudios se han realizado con el objetivo de evaluar la respuesta productiva en rumiantes, algunos de estos sin encontrar efectos positivos como la investigación desarrollada por Castillo *et al.* (2018), quienes evaluaron la inclusión del 0.3 % de esta levadura (2×10^9 UFC g⁻¹) adicionada con un alimento iniciador en becerros lactantes y ofrecida entre los 5 y 27 días de edad, sin observar cambios en la ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia por efecto de la levadura. Por otro lado, Lee *et al.* (2017) evaluaron diferentes niveles de levadura (0, 1.4, 2.5 y 5.0×10^9 UFC) en terneras Holstein bajo estrés calórico observando reducción en incidencia de diarreas, frecuencia cardíaca, y de enterobacterias en heces cuando se usó *S. cerevisiae*, pero sin registrarse cambios en el crecimiento. Villot *et al.* (2019) reveló el efecto de *Saccharomyces boulardii* sobre la reducción de diarreas, lo cual permitió concluir que la inclusión de levadura en becerros permite la manipulación de enterobacterias no deseables.

3. 8.1 Biosorción

En años recientes se ha visto reflejado un incremento en el uso de sistemas biológicos (bacterias, hongos, algas) para disminuir contaminantes como los metales pesados (Mendoza, 2010). La forma en la que pueden actuar estos sistemas biológicos es variable, pero se pueden resumir en tres categorías: (1): bioadsorción, (2): precipitación en el área extracelular y (3): captación, al mismo tiempo, la relación entre el organismo usado para la bioadsorción y el contaminante involucra una serie de fenómenos físicos, químicos y biológicos indispensables para su unión (Tur *et al.*, 2013). Si bien la biosorción es presentada como una alternativa en la remoción de iones metálicos amigable con el ambiente, tiene otras ventajas como su bajo costo de aplicación, uso en diferentes matrices biológicas y fácil adquisición (Tejada *et al.*, 2015).

El proceso de sorción biológica puede ser diferenciado por dos procesos: 1: Bioacumulación, el cual se relaciona con la absorción de los elementos metálicos por medio de mecanismos acumulativos dentro del microorganismo o células de biomasa vivas, en general las levaduras como *Saccharomyces* lo llevan a cabo por medio de canales transportadores de nutrientes esenciales como el Fe, Mg, Zn, fosfatos, óxidos de azufre y carbohidratos (Moreno y Montfort, 2019; Tejada *et al.*, 2015), de manera que el As (como arsenito As^3) puede ser captado por canales de acuaglicerolporina (Fps1) y el arseniato (As^V) debido a su similitud con fosfatos por permeasas fosfatos como el Pho84d El Cd ingresa a las levaduras por canales proteicos afines al Zn, Mn, Fe y Ca. En el caso de Pb se internaliza por canales de calcio (Wysocki *et al.*, 2001).

2: Bioadsorción, significa la adherencia de las partículas, iones metálicos o contaminantes en una superficie celular, puede ser ocasionado por atracción electrostática, precipitación, formación de complejos cuando cationes se unen a grupos funcionales presentes en la pared celular (o aniones con pares de electrones libres) e intercambio catiónico donde un ion es sustituido por otro de carga igual (Na, Ca, K y Mg por algún metal pesado positivo) (Reyes *et al.*, 2006; Tejada *et al.*, 2015; Moreno y Montfort, 2019). Es preciso señalar que el éxito de la adsorción yace también por afinidad entre grupos funcionales del organismo y los metales pesados, en otras palabras, la presencia de grupos carboxilo, sulfatos, hidroxilo, fosfatos y amino facilitan la captación de iones metálicos (Tejada *et al.*, 2015). Llevado a cabo la adsorción en un sistema biológico el cual implica la unión entera o parcial de un elemento tóxico a una superficie biológica se distinguen tres tipos de uniones: unión eléctrica la cual hace referencia a la atracción electrostática o intercambio iónico, fuerzas de Van der Waals y adsorción química (UV, 2009; Tejada *et al.*, 2015).

El método de bioadsorción para descontaminar cuerpos de agua ha sido constantemente estudiado y diversas investigaciones demuestran que varias especies de organismos (*Lactobacillus* y Levaduras), tienen la capacidad de absorber metales como cadmio, cobre, plomo y zinc (Moreno y Montfort, 2019).

Cuando se usa el término bio se entiende que se hará uso de componentes cuyo origen biológico puede estar vivo o no, de igual forma es preciso mencionar que adsorción se

refiere a la unión entre el analito y una superficie; mientras que absorción, implica la internalización de una partícula con el medio superficial estudiado (Fomina y Gadd, 2014). Existen otros factores importantes en el modo de acción de los agentes biológicos en el proceso de adsorción y absorción de contaminantes metálicos.

El factor biológico comprende género, especie y cepa del organismo, y los factores fisicoquímicos pH y temperatura (Wang y Chen, 2006). El pH es de gran importancia ya que afecta la funcionalidad de la membrana celular, así como la estructura química de los metales y, por ende, la especiación de estos en solución; de esta forma, los metales catiónicos como el Pb y Cd a pH ácidos tendrán menor remoción por competencia con iones hidronio. Esto no quiere decir que estos elementos no puedan ser removidos, ya que existen otros procesos como la quelación que suele presentarse en pH básicos (contrario de intercambio iónico). Wang y Chen (2006) mencionan que en *Saccharomyces cerevisiae* el pH óptimo en soluciones acuosas para absorber Cd es entre 6 y 7 y para el Cu es de 5 a 9. La concentración del metal, tiempo y temperatura también juegan un papel importante en la capacidad de biosorción, la cual es dependiente y proporcional a la cantidad de grupos funcionales con los que puede interactuar el metal.

3. 8. 2 *Saccharomyces cerevisiae* y su capacidad de biosorción

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha usado ampliamente en la industria agroalimentaria, así como probiótico en la alimentación de rumiantes; además es conocida su capacidad para remover elementos metálicos en soluciones acuosas (Wysocki *et al.*, 2010), tales como el Pb, Cu, Cd, Zn, Hg, Ni, Cr y As (Wang y Chen, 2006). Esta capacidad de biosorción de *Saccharomyces cerevisiae* se ha estudiado en diferentes formas, en biomasa viva, muerta, inmovilizada o libre.

La determinación del rango de ingreso del metal por el bioabsorbente se suele expresar en mg g⁻¹ aunque esta variable es dependiente de las condiciones del medio (Kratochvil *et al.*, 1998). Un determinante importante de su capacidad de remoción es la pared celular, la cual se caracteriza por ser afín a cationes (por ejemplo, Pb y Cd), en su mayoría por la negatividad a pH con un rango de 5 a 6. Respecto a su composición esta

se constituye en su mayoría por polisacáridos (90%), proteínas (5-10%) y lípidos (1-2%) (Oliva *et al.*, 2008). Las capas que la constituyen son una capa exterior gruesa con proporción aproximada de 58% B-glucanos (1-3 y 1-6), 40% manoproteínas y una capa interior delgada formada por fibras de quitina (Aguilar *et al.*, 2005).

Los grupos funcionales de las moléculas presentes en la pared celular tienen la capacidad de interactuar con cationes por medio de interacciones electrostáticas (Tejada *et al.*, 2015), ésta es la base del fundamento sorción/precipitación de metales por parte de la levadura. Wang y Chen. (2006) indican dos mecanismos básicos que tienen lugar en la pared celular de las levaduras los cuales son interacción estequiométrica por interacción de grupos funcionales (fosfato, carboxilos, aminos) y deposición fisicoquímica inorgánica por adsorción o precipitación. Simmons y Singleton (1996) afirman que las proteínas también tienen capacidad de retención con metales, tras observar una disminución del 29.5% de sorción metálica después de removerlas de la pared celular mediante el uso de pronasas, también mencionan que las proteínas denominadas metalotioneinas están asociadas a metales en presencia de cisteína. Este último, es un mecanismo de importancia como los demás, la existencia de metalotioneinas o unión proteínica.

Las metalotioneinas (MT) son un ejemplo de detoxificación, se encuentran presentes en diferentes seres vivos y las levaduras no están exentas (Farcasanu y Ruta, 2017). Este tipo de proteínas son de bajo peso molecular y ricas en cisteína. En *Saccharomyces cerevisiae* hay dos tipos, Cup1p y Crs5P, diferenciadas estructuralmente ya que Cup1p es un polipéptido de 53 aminoácidos con homología limitada a mamíferos afín a Cu, Cd y Zn, mientras que Crs5P está conformado por 69 aminoácidos, ricos en cisteína y muestra mayor similitud con MT de otros organismos, ambas son mayormente expresadas en medios con alta presencia de metales (Wysocki y Tamas, 2010), como por ejemplo Cd, Cu, Hg y Zn, entre otros (Vijver *et al.*, 2004).

La función y capacidad de las MT para unirse a metales reside en su estructura antes mencionada (cisteína 15-30%) que le confiere la formación de grupos tiolatos metálicos como en el caso de Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{1+} , Ag^{1+} , Au^{1+} , Bi^{3+} , As^{3+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} , Pt^{2+} y Tc^{4+} , esto se puede observar de mejor manera por su afinidad de iones metálicos/ligandos tiolato de

la siguiente forma: $Fe^{2+} = Zn^{2+} = Co^{2+} < Pb^{2+} < Cd^{2+} < Cu^{1+} < Au^{1+} \approx Ag^{1+} < Hg^{2+} < Bi^{3+}$ (Captevilla *et al.*, 2012; Farcasanu y Ruta, 2017). Por otro lado, Farhan y Khadom (2015) mencionan otro orden de biosorción: $Pb^{2+} > Zn^{2+} > Cr^{2+} > Co^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+}$ y señalan que los grupos carboxilo, amino y fosfato son los principales sitios de sorción de iones metálicos.

La capacidad de sorción por parte de *Saccharomyces* puede variar dependiendo de la naturaleza de la pared celular, por lo que otro factor determinante es la especie, fase de crecimiento y cepa de la levadura. Wang y Chen (2006) reportan eficiencias de hasta 80% de remoción de Cd, del cual el 20% corresponde al encontrado en el medio intracelular lo que significa que la mayor remoción es llevada a cabo en la pared celular. De la misma forma, Moreno y Montfort (2019) mencionan que *Saccharomyces cerevisiae* puede remover As III en soluciones acuosas con una eficiencia del 85.5% a pH de 6, también hace énfasis que esta capacidad se ve aumentada en medios deficientes de nutrientes debido a la poca competencia entre iones por ocupar los sitios de sorción.

Marques y Pinheiro. (2000) en un estudio sobre el efecto del pH en la retención de metales por *S. cerevisiae* encontraron que la sorción es mayor cuando el pH aumento, notando un cambio a partir de 4.5 hasta 8, adicionalmente mencionan que pH bajos conllevan a la desactivación de sitios de adsorción. Rodríguez *et al.* (2008) informan que el pH, concentración de biomasa y tratamiento sobre la levadura tiene efecto sobre la sorción de Pb II, para Cr la sorción es afectada por el pH y la concentración de biomasa y para Cd la sorción está en función de los mismos factores que afectan al Pb y Cr, más la presencia de otros iones presentes en solución; de esta manera a pH 5 se extrae 47 y 56% de Cr y Pb, respectivamente, y a pH 3 habrá baja retención para todos los metales.

3. 8. 3 Biosorción de metales pesados por *Saccharomyces cerevisiae* en leche

Pocos estudios se han realizado en leche usando *Saccharomyces cerevisiae* como agente de sorción y la mayoría de estos se enfocan en el producto, es decir, aun no se ha implementado en la alimentación de rumiantes en busca de la disminución de metales pesados partiendo desde la reducción en la absorción de estos en el tubo digestivo. Massoud *et al.* (2020) reportan 70% de absorción de Cd efectuada por *S. cerevisiae* (30

x 10⁸ UFC) cuando se tenía una concentración de 80 µg L⁻¹ del metal en una muestra de leche, al 4° día de incubación, con un pH que osciló entre 6.7 y 7, y sin afectarse las características sensoriales de la leche. Congruente con este estudio, Massoud *et al.* (2019) determinaron incrementos de 0 a 80% de sorción de Pb en leche (70 µg L⁻¹) cuando la biomasa de *S. cerevisiae* y el tiempo de contacto aumentaron de 0 a 22 x 10⁸ UFC y 0 a 4 días, pero cuando se aumentó la biomasa de la levadura sobre 22 x 10⁸ UFC la absorción de Pb se vio disminuida.

Implementar el uso de *S. cerevisiae* en la alimentación de ganado lechero para crear un efecto bioadsorbente de metales pesados implica un reto, debido a las condiciones de pH requeridas por la levadura, las cuales también pueden variar dependiendo de la temperatura, cepa y cantidad de oxígeno en el medio, aunque de forma general este tipo de levadura se considera acidófila y puede crecer en un rango de pH de 4-6 (Narendranath y Power, 2005), pH 5.3 (Shafaghat *et al.*, 2010), pH 4 y oxígeno disuelto 5% (Salari y Salari, 2017), pH 4- 9 (Peña *et al.*, 2015) contrastante con los valores de pH ruminal (6.2 a 7) observados bajo condiciones normales. Sin embargo, el pH en el rumen está en función de los componentes de la dieta, como la cantidad de carbohidratos fácilmente fermentables o forraje presentes, observándose valores de pH de 5.5 a 6 por la actividad de microorganismos amilolíticos y cuando la actividad de microorganismos celulolíticos predomina, se registran valores de pH entre 6 a 6.9 (Rellin y Mattioli, 2003).

Existe evidencia como la presentada por El-Hassan *et al.* (1993) donde observaron el establecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en el rumen a un pH de 6.6, sin cambios significativos en su biomasa, afirmando que mientras la suplementación sea constante, la disminución después de suspender la adición decrece gradualmente y estará en función de la dosis inicial aportada. Adicionalmente, Doležal *et al.* (2005) reportaron valores estables de pH ruminal (6.14 a 6.30) cuando se evaluaron diferentes niveles de inclusión de *Saccharomyces cerevisiae* en la dieta de vacas lecheras, del mismo modo, Thrune *et al.* (2009) obtuvo un pH promedio de 6.53 en rumen de vacas suplementadas con levadura (0.5g/animal/día) en contraste con el grupo control (pH 6.23),

Las levaduras mantienen su actividad metabólica mediante mecanismos de resistencia a estrés en condiciones anaerobias (Arcos *et al.*, 2007). Posiblemente esta sea una de

las razones de la mejora de las condiciones ruminales tras la adición de *Saccharomyces* que permiten el uso de lactato por parte de las bacterias.

Otro punto importante es la regulación del pH mediado por dos tipos de antiportadores de Na^+/H^+ , Nha1p en membrana plasmática y Nhxp1 en compartimento endosomal prevacuolar, estas proteínas catalizan el intercambio de cationes monovalentes (Na^+ y K^+) y los hidrogeniones regulando los mismos nivel citoplasmático (Ortiz *et al.*, 2008), igualmente en medios alcalinos la levadura puede cambiar acidificando el medio a un pH idóneo dado por ATPasas codificadas mediante el gen PMA1, los cuales permiten la extrusión activa de protones (Ariño, 2010).

La temperatura también juega un rol importante, Arcos *et al.* (2007) señalan como óptima para el crecimiento de levaduras, 28° a 30°C, y el rumen presenta una temperatura normal de 39°C, lo que puede afectar su crecimiento y viabilidad a las 42 horas. No obstante, después de 30 horas de la suplementación con esta levadura en la dieta de borregos, se ha determinado entre 17 y 30% de células vivas de *S. cerevisiae* en el tránsito del tubo digestivo (Auclair, 2001). Fiems *et al.* (1993) indica que la capacidad de *S. cerevisiae* para colonizar el rumen es muy baja y sus beneficios pueden ser más apreciables mientras la concentración de biomasa sea constante, conviene mencionar que la diferencia de la viabilidad de la *Saccharomyces cerevisiae* en fluido ruminal y heces (mayor sobrevivencia en heces) se debe a la tasa de paso y posiblemente a las condiciones de pH del intestino delgado (5 a 7) y grueso (8) (Vásquez *et al.*, 2012).

3. 8. 4 Viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* en el tubo digestivo

El uso de probióticos en la alimentación debe cumplir ciertas características, las cuales le permitirán desarrollarse y cumplir sus objetivos, algunos de los requisitos son los siguientes: aporte de efecto benéfico en animal hospedero, no ser tóxico o patógeno, metabolismo selectivo, viabilidad y estabilidad en tubo digestivo (Collins y Gibson, 1999). Castro y Rodríguez (2005) definen a las levaduras con limitada capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal, comparadas con otros microorganismos usados como probióticos; sin embargo, diversos estudios relacionan al *Saccharomyces cerevisiae* con

efectos positivos en la disminución de diarreas y mayor estabilidad en el intestino delgado (Etienne *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2017).

Cuando se adiciona una sola dosis de *Saccharomyces cerevisiae* de 2×10^9 UFC, es posible encontrar concentraciones de 10^5 UFC mL⁻¹ de la levadura en rumen a las 24 h, y a las 8 h se pueden detectar células vivas en heces, pero la excreción máxima ocurre entre las 16 y 36 h después de su ingestión, observándose mayores concentraciones de la levadura en heces en comparación con la prevalencias en el rumen (10^5 vs 10^6); al final de la evaluación se detectó un máximo de 30% de las células iniciales vivas en heces indicando la poca adherencia y estabilidad de la levadura en el tubo digestivo (Durand *et al.*, 1998). En contraste, Fonty y Chaucheyras (2006) destacan la estabilidad en la concentración de la levadura observada al inicio del suministro en rumen hasta las 24 o 30 h, posteriormente las células viables disminuirán siendo el 4° o 5° día, tiempo en el que ya no es detectable.

En no rumiantes, la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* puede estimular la producción de disacaridasas en las vellosidades intestinales, lo que demuestra su paso por el intestino delgado y su capacidad probiótica (Alvarado *et al.*, 2017). Mejía *et al.* (2016) señalan el efecto de especies de *Saccharomyces* como transportadores/liberadores de enzimas y proteínas, aunque no se dé una adhesión a las paredes intestinales. Pérez (2008) señala la falta de adherencia permanente de *Saccharomyces spp.* a la mucosa intestinal, pero la suplementación continua garantiza una estabilidad temporal en no rumiantes y rumiantes, y permite hallar concentraciones significativas en duodeno, ciego, colon y heces en lechones.

La viabilidad en el tubo digestivo es variable, se conoce que *Saccharomyces cerevisiae* aumenta su concentración de biomasa durante su tránsito por duodeno, yeyuno e íleon cuando es adicionado a 0.3% en el alimento de cerdos (García, 2000). Un estudio *in vitro* donde se evaluó la viabilidad de la cepa CNCM I-3856 de *Saccharomyces cerevisiae* usando el modelo gastro intestinal TIM (Gastro-Intestinal Model), demostró la disminución significativa de la levadura en el estómago, pero el escape de células vivas permite un crecimiento de 15 a 30% en yeyuno a las 3 h y 5 a 30% en íleon a las 5 h, con respecto a la biomasa ingerida (Etienne *et al.*, 2010). Importante es mencionar la

configuración de parámetros para la digestión de un alimento en el TIM, implicando un pH gástrico de 1.7 a 5.2 (curva gástrica a 0, 30, 60 y 120 min), pH de 6.2, 6.5 y 7.4 en duodeno, yeyuno e íleon, respectivamente (Minekus, 2015). La microencapsulación es una alternativa para aumentar la viabilidad y los efectos probióticos de la levadura ante las condiciones de pH en el tracto gastrointestinal de rumiantes y no rumiantes (Ghorbani *et al.*, 2019).

3. 8. 5 Resistencia al estrés de *Saccharomyces cerevisiae*

Durante el crecimiento los organismos experimentan cambios en su estado físico como parte del desarrollo o adaptación al medio. Las condiciones del ambiente pueden variar en el tiempo y espacio, existiendo momentos alejados de las condiciones óptimas para reproducción y crecimiento de estos (Folch *et al.*, 2004). La capacidad de adaptación depende de la etapa de crecimiento del individuo y esta es mayor cuando no existe movimiento, reproducción u alguna actividad relacionada con gasto de energía excesivo, denominado estado quiescente (Larcher, 1995).

En *Saccharomyces cerevisiae* se diferencian cinco etapas de crecimiento: fase lag, fase logarítmica, cambio diaúxico, cambio postiaúxico y estacionario (Werner *et al.*, 1993; Folch *et al.*, 2004). Werner *et al.* (1993) menciona que en la fase de crecimiento exponencial (logarítmica) se observa la máxima concentración de biomasa y se lleva a cabo un metabolismo fermentativo caracterizado por la producción de etanol, entre otros compuestos orgánicos; el cambio diaúxico se inicia cuando la glucosa se agota permitiendo una adaptación metabólica de respiración; durante el periodo postdiaúxico la división celular es muy lenta y el cambio de fermentación a respiración se hace más evidente, la célula usa sus reservas para llevar a cabo dicho proceso, el periodo estacionario se caracteriza por la acumulación de nutrientes, mayor resistencia y engrosamiento de la pared celular, aunque con casi nulo crecimiento de biomasa; finalmente la fase lag implica un periodo de adaptación donde la levadura se prepara para su división.

Las células capaces de sobrevivir en la etapa estacionaria pueden subsistir en medios sin alimento hasta por tres meses (Lillie y Pringle, 1980). Mager y Moradas (1993) y Piper

(1993) mencionan algunos factores y condiciones de estrés en células de levaduras y destacan el déficit de nutrientes, altas y bajas temperaturas, iones de metales pesados, alta y baja osmolaridad, diferencias de pH, altas concentraciones de etanol y desecación. Así mismo, Ruis y Schüller (1995) indican la presencia de tres elementos de controles transcripcionales activados por estrés en *Saccharomyces cerevisiae*, estos son los elementos de choque térmico (HSE), los mediadores de factores de transcripción de estrés por alta osmolaridad (STRE) y los elementos de respuesta AP-1. De igual manera, las enzimas implicadas en la adaptación por estrés en medios ácidos son la catalasa (durante la adaptación) y superóxido dismutasa (Giannattasio *et al.*, 2005); estas enzimas se relacionan con procesos de destrucción del peróxido de hidrógeno generado durante el metabolismo celular (Cespedes *et al.*, 1996).

3. 9 Índice de contaminación por metales pesados (HMI) en leche

Actualmente, la contaminación ambiental por metales pesados resulta alarmante debido a su impacto en la salud humana (Reyes *et al.*, 2016); así mismo, la presencia de estos en alimentos y en especial en los de origen lácteo, sugiere una contaminación en la cadena alimentaria a través de la cual se obtienen dichos productos (Fuentes *et al.*, 2005). La deposición de metales pesados en suelos y su capacidad de traslocación a forrajes juega un papel importante en la aparición en diferentes tejidos de los animales alimentados con forrajes contaminados, consecuentemente la concentración encontrada a través de la cadena alimentaria se verá reflejada en productos como la leche (Castro-Gonzales *et al.*, 2018). Los metales pesados, así como su prevalencia en leche varían debido a diferentes actividades relacionadas con la fuente de contaminación; sin embargo, globalmente se reporta un incremento en las concentraciones en plomo y cadmio, y disminución de mercurio y arsénico en leche (Ismail *et al.*, 2019).

El índice de contaminación por metales (HMI) es una herramienta útil en el análisis de la calidad de un área, partiendo de los datos de concentración de metales pesados encontrados y los límites máximos permisibles establecidos (Singha *et al.*, 2020). De esta manera, dicho índice se puede calcular de la siguiente forma:

$$\text{HMI} = \text{Cn/Sv}$$

Donde:

Cn: representa la concentración del elemento en el sitio muestreado

Sv: son los valores permisibles para cada metal.

Los datos obtenidos en valores de HMI son categorizados en cuatro grupos: < 1 indica baja contaminación, entre 1 y 3 se relaciona con moderada contaminación, entre 3 y 6 implica alta contaminación y un valor de 6 denota muy alta contaminación (Nnabugwu y Uchenna, 2019).

En el Cuadro 10 se muestran diferentes índices de contaminación por metales pesados en leche, partiendo de los límites máximos permisibles señalados en el Codex y NOM-243-SSAI-2010 (Ziarati *et al.*, 2018).

Cuadro 10. Índice de contaminación por metales pesados en diferentes países.

País	Elementos	Concentración del elemento	HMI*	Fuente
Brasil	Pb	0.00221 mg kg ⁻¹ concentración mínima	0.0044-baja contaminación	Oliveira <i>et al.</i> , 2017.
México	Pb y As	0.03 y 0.12 mg kg ⁻¹ promedio	0.06 baja y 1.2- moderada contaminación	Castro-González <i>et al.</i> , 2017.
Irán	Pb y Cd	0.014 y 0.0011 mg kg ⁻¹	0.028 y 0.37- baja contaminación	Shahbazi <i>et al.</i> , 2016.
Pakistán	Pb	0.738 mg kg ⁻¹	1.47- moderada contaminación	Ismail <i>et al.</i> , 2015.
Egipto	Pb y Cd	0.044 y 0.008 ppm mínimo encontrado	0.088 baja y 2.6- moderada contaminación	Meshref <i>et al.</i> , 2014.

Fuente: Ziarati *et al.*, 2018.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación

La investigación se llevó a cabo en unidades de producción lechera de tipo familiar, ubicadas en las localidades de Villa Alta y San Diego Xocoyucan, pertenecientes respectivamente a los municipios de Tepetitla de Lardizabal con coordenadas geográficas de 19° 16´ Latitud norte y 98° 22´ Longitud oeste y de Ixtacuixtla de Mariano Matamoros con 19° 20´ Latitud norte y 98° 23´ Longitud oeste en el estado de Tlaxcala (Figura 1), ubicados a una altura de 2226 msnm, con clima templado subhúmedo, precipitación media 720 mm (INEGI, 2020; INAFED, sd).

El ensayo *in vitro*, la digestión de muestras y los análisis químicos correspondientes se desarrollaron en el Laboratorio de Nutrición Animal perteneciente al Posgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, en el Estado de México. El contenido de metales pesados en las muestras recolectadas se determinó en los laboratorios pertenecientes al postgrado de Edafología e Hidrociencias, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

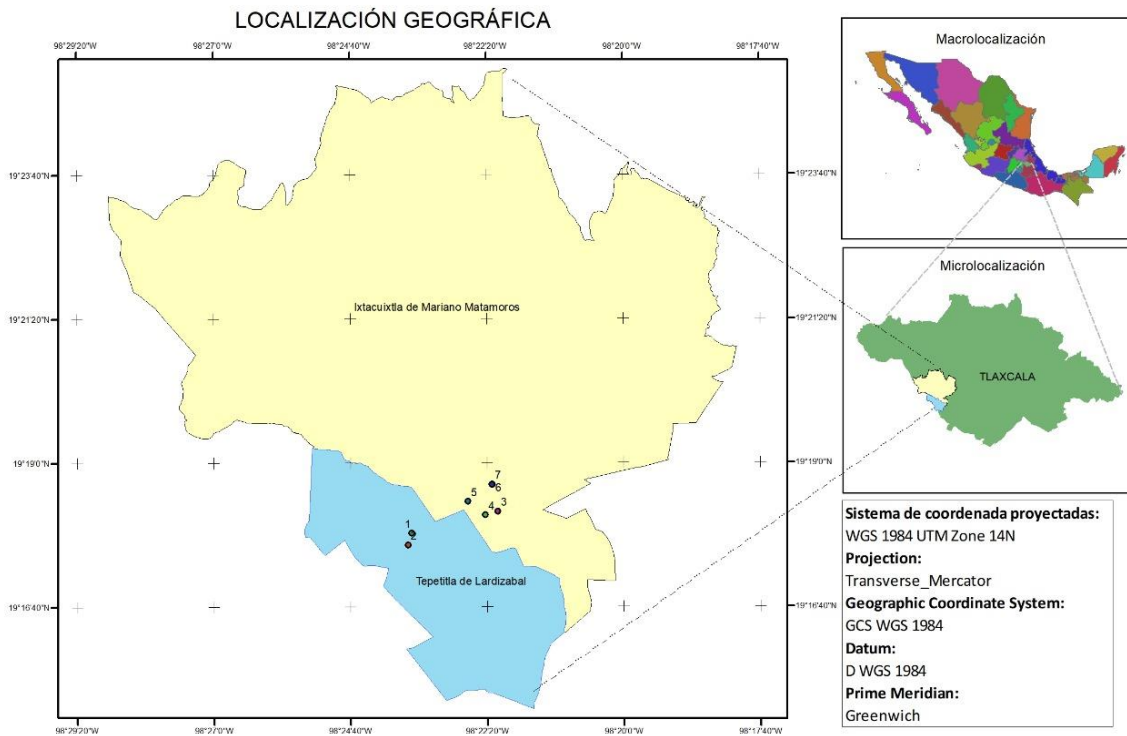


Figura 1. Ubicación de la zona de estudio en el Estado de Tlaxcala, México.

4. 2 Ensayo *in vitro*: viabilidad y capacidad de biosorción de *Saccharomyces cerevisiae* en medio ruminal, ácido y alcalino

Se realizó un ensayo *in vitro* para conocer la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* cuando se expone a condiciones de estrés causadas por cambios en las condiciones ambientales (pH) del rumen, abomaso e intestino delgado, y determinar su capacidad de biosorción de metales pesados en estas secciones del tubo digestivo. La levadura se evaluó a diferentes concentraciones en el medio de cultivo y se contaminó intencionalmente el sustrato del medio adicionando niveles de metales pesados (As, Cr, Cd y Pb) que previamente se determinaron en forrajes y granos de una zona del estado de Tlaxcala (Castro *et al.*, 2018), donde posteriormente se desarrolló el estudio *in vivo*. Los resultados de este ensayo permitieron establecer los niveles de suplementación de *S. cerevisiae* en campo, para propiciar una mejor biosorción de metales pesados en tubo digestivo de ganado bovino (ensayo *in vivo*) y reducir la presencia de metales pesados en leche.

4. 2 .1 Preparación y reactivación de *Saccharomyces cerevisiae*

Se utilizó la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Yea Sacc[®] 1026 de la empresa Altech, Inc (USA). Para la reactivación de la levadura se usó caldo YPD (Sigma-Aldrich, México), previamente esterilizado en autoclave (Geo-Lab, México) a 121°C por 15 min. Después se colocaron 9 mL⁻¹ de medio en tubos de cultivo con capacidad de 10 mL⁻¹, por triplicado, y fueron inoculados con 1 g de levadura (proporción 1/9), se homogenizó e incubó a 30°C por 24 h (Aguirre, 2003).

Terminada la reactivación se llevó a cabo una prueba de calidad de la siguiente manera: se tomó 1 mL⁻¹ del cultivo de levadura reactivado para realizar diluciones seriadas (10⁻¹ a 10⁻¹⁰) con agua peptonada al 0.1%. Se tomaron 100 µL⁻¹ de cada dilución y se sembraron en placa con espátula de Drigalsky en medio agar sólido YPD (Sigma-Aldrich, México) estéril, se incubó a 30°C por 24 h (Vázquez *et al.*, 2019). Después se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC mL⁻¹), lo cual permitió conocer la concentración de levaduras viables por gramo de producto (1 x 10⁸ UFC). Con este dato se hicieron los cálculos necesarios para determinar la cantidad de producto comercial de *S. cerevisiae* que se debería manejar a nivel *in vitro*, simulando dosificaciones en campo de 5, 20, 35 y 50 x 10⁸ UFC animal d⁻¹, considerando un bovino de 400 kg, con capacidad ruminal de 60 L. De aquí se determinó que para un vial que contenía 45 mL de medio YPD se debería agregar 0.0037, 0.015, 0.026 y 0.037 g del producto comercial de *S. cerevisiae*, para igualar las UFC arriba señaladas. Esta información fue corroborada reactivando estas cantidades de producto comercial en viales de 100 mL⁻¹ con caldo YPD previamente esterilizado en autoclave a 121°C por 15 min, se incubaron a 30°C por 24 h (Vázquez *et al.*, 2019). Después, se tomó 1 mL⁻¹ de cultivo de levadura para realizar diluciones seriadas (10⁻¹ a 10⁻¹⁰) con agua peptonada al 0.1%. Se tomaron 100 µL⁻¹ de cada dilución y se sembraron en placa con espátula de Drigalsky en medio agar sólido YPD (Sigma-Aldrich, México) estéril, se incubó a 30°C por 24 h (Vázquez *et al.*, 2019). Después se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC mL⁻¹).

4. 2. 2 Viabilidad *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* en el ambiente ruminal

Se elaboró un medio de cultivo anaerobio, detallado en el Cuadro 11 (Theodorou *et al.*, 1994), en matraces Erlenmeyer de 250 mL⁻¹, ajustando el pH a 7.0 ±0.2 y se esterilizó en autoclave (Geo-Lab, México) durante 15 min a 121°C. Después, se depositaron 45 mL⁻¹ de medio bajo flujo de CO₂ en viales estériles de 100 mL⁻¹, se sellaron con tapones de neopreno e incubaron a 38°C por 24 h para comprobar esterilidad. Los medios de cultivo estériles se usaron en las etapas posteriores.

4. 2. 2. 1 Inoculación de los medios de cultivo

Se usó líquido ruminal fresco extraído de la parte ventral del rumen de una vaca Holstein de aproximadamente 700 kg de PV, provista con fistula ruminal. El protocolo experimental relacionado con el manejo del animal se basó en el Reglamento para el uso y cuidado de animales destinados a la investigación del Colegio de Postgraduados. El líquido se filtró a través de tela velo de novia para eliminar partículas. A los medios de cultivo preparados con anterioridad, se les agregaron bajo fluido de CO₂, 5 mL de líquido ruminal y diferentes cantidades de producto comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (0.0037, 0.015, 0.026 y 0.037 g) a partir de las cuales se originaron los siguientes tratamientos (T): T1= 3.7 x 10⁵, T2= 1.5 x 10⁶. T3=: 2.6 x 10⁶ y T4= 3.7 x 10⁶ UFC mL⁻¹. Después, se incubó a 30°C por 24 h. Posteriormente, se tomó 1 mL de cada medio para hacer diluciones seriadas (10⁻¹ a 10⁻¹⁰), en proporción 1/9 en agua peptonada al 0.1%. Se tomaron 100 µL⁻¹ de cada dilución y se sembraron en placa en medio YPD sólido (Sigma-Aldrich, México) estéril, con el uso de una espátula de Drigalski, para posteriormente incubar a 30°C por 24 h (Vázquez *et al.*, 2019). Terminado este proceso, se realizaron conteos de unidades formadoras de colonias y se determinó la viabilidad de *S. cerevisiae* en medio ruminal.

Cuadro 11. Medio de cultivo anaerobio.

Componente	Cantidad por 1000 mL ⁻¹
Agua destilada, mL ⁻¹	780
Líquido ruminal, mL ⁻¹	100
Solución mineral 1 [†] , mL ⁻¹	75
Solución mineral 2 [‡] , mL ⁻¹	75
Carbonato de sodio [€] (8%), mL ⁻¹	50
Solución reductora [¶] , mL ⁻¹	20
Resazurina [£]	2 gotas

[†]Solución mineral 1: 6 g de K₂HPO₄ por 1000 mL de agua destilada. [‡]Solución mineral 2: 6 g KH₂PO₄, 6 g (NH₄)₂SO₄, 12 g NaCl, 2.45 g MgSO₄ y 1.6 g CaCl₂·2H₂O por 1000 mL de agua destilada. [£]Resazurina al 0.1%: disolver 0.1 gramos de resazurina en 100 mL de agua destilada y esterilizar a 121°C por 15 min. [€]Carbonato de sodio al 8%: disolver 8 g de Na₂CO₃ en 100 mL de agua destilada y esterilizar a 121°C por 15 min. [¶]Solución reductora: para 100 mL, 25 g de cisteína, 15 mL de hidróxido de sodio 2N, 2.5 g de sulfuro de sodio y 2 gotas de resazurina al 0.1%.

4. 2. 3 Viabilidad *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* en medio ácido

Se reactivó individualmente durante 24 h y 30°C, 0.0037, 0.015, 0.026 y 0.037 g del producto comercial de *S. cerevisiae* en viales de 100 mL a partir de las cuales se originan los siguientes tratamientos (T): T1= 3.7 x 10⁵, T2= 1.5 x 10⁶, T3= 2.6 x 10⁶ y T4=: 3.7 x 10⁶ UFC mL⁻¹. después se le agregó 45 mL de medio YPD estéril y se adicionó HCl (J.T, Baker, USA) 0.5 M hasta obtener un pH de 4.0 (Gómez, 2015). Cada tratamiento tuvo tres repeticiones. Los medios de cultivo inoculados se incubaron 1 h a 37°C. Después, se tomó 1 mL⁻¹ de cada cultivo para realizar diluciones seriadas (10⁻¹ a 10⁻¹⁰), 1/10 con agua peptonada al 0.1%. Se tomaron 100 µL⁻¹ de cada dilución para realizar siembra en placa en medio sólido YPD con espátula de Drigalsky e incubar por 24 horas a 30°C, para realizar conteos de UFC (Dogi *et al.*, 2011; Camacho *et al.*, 2009) y determinar la viabilidad de *S. cerevisiae* en medio ácido.

4. 2. 4 Viabilidad a sales biliares

Se reactivó individualmente durante 24 h y 30°C, 0.0037, 0.015, 0.026 y 0.037 g del producto comercial de *S. cerevisiae* en viales de 100 mL a partir de las cuales se originan los siguientes tratamientos (T): T1= 3.7×10^5 , T2= 1.5×10^6 , T3= 2.6×10^6 y T4=: 3.7×10^6 UFC mL⁻¹, después se le agregó 45 mL de cultivo YPD esterilizado a 121°C por 20 minutos, adicionado con 0.3 % de sales biliares (p/v) (Oxgall Difco, USA). Cada tratamiento tuvo tres repeticiones. Los medios de cultivo inoculados se incubaron 3 h a 37°C. Después, se tomó 1 mL⁻¹ de cultivo para realizar diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-10}), 1/10 v/v con agua peptonada al 0.1%. Se tomaron 100 µL⁻¹ de cada dilución para realizar siembra en placa en medio sólido YPD y se incubó por 24 horas a 30°C, para realizar conteos de UFC (Dogi *et al.*, 2011; Camacho *et al.*, 2009) y determinar la viabilidad de *S. cerevisiae* en medio alcalino.

4. 2. 5 Biosorción de *Saccharomyces cerevisiae* en ambiente ruminal

En viales de 100 mL⁻¹ se colocaron 45 mL de medio de cultivo anaerobio estéril (Cuadro 11) a los cuales se adicionó levadura previamente reactivada con el propósito de obtener concentraciones de la levadura en el medio: 3.7×10^5 , 1.5×10^6 , 2.6×10^6 y 3.7×10^6 UFC mL⁻¹. A cada concentración preestablecida de *S. cerevisiae* en el medio de cultivo, se le adicionó bajo flujo de CO₂ y de forma individual: 0.0067 ppm de As, 0.012 ppm de Cr, 0.00047 ppm de Cd y 0.013 ppm de Pb, originando 4 tratamientos. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones. Se integró un blanco por cada tratamiento, el cual estaba libre de levadura, para ajustar los datos de biosorción causada por *S. cerevisiae*. Los medios de cultivo inoculados se incubaron a 37°C por 48 h. Después, se tomó 1 mL⁻¹ de cultivo para realizar diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-10}), 1/10 v/v con agua peptonada al 0.1%. Se tomaron 100 µL⁻¹ de cada dilución para realizar siembra en placa en medio sólido YPD y se incubó a 30°C por 24 h, para realizar conteos de UFC (Dogi *et al.*, 2011; Camacho *et al.*, 2009; Vázquez *et al.*, 2019) y determinar la viabilidad de *S. cerevisiae* en medio alcalino.

El medio de cultivo remanente después de la incubación fue centrifugado (Beckman, USA) a 2000 x g por 15 minutos (Massoud *et al.*, 2020), en tubos de polipropileno de 50

mL se recuperó el sobrenadante en frascos de polipropileno de 100 mL, se adiciono HNO₃ (J.T. Baker, USA) hasta obtener un pH menor o igual a 2 y se conservó la muestra en refrigeración a 4°C hasta la digestión y análisis de metales pesados

4. 2. 6 Capacidad de biosorción de *Saccharomyces cerevisiae* en medio ácido

Se usó medio de cultivo YPD esterilizado a 121 °C por 20 min y adicionado con HCL al 0.5 M hasta obtener un pH de 4.0. En viales de 100 mL⁻¹ se adicionaron 45 mL⁻¹ de medio YPD y se mantuvo el inóculo por 1 hora a 37°C en medio líquido, para posteriormente ser incubado en medio solido YPD a 37 °C por 48 horas y realizar conteo de UFC (Dogi *et al.*, 2011; Camacho *et al.*, 2009) para lo cual se adicionaron cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* reactivados individualmente para generar las siguientes concentraciones de la levadura en el medio: 3.7 x 10⁵, 1.5 x 10⁶, 2.6 x 10⁶ y 3.7 x 10⁶ UFC mL⁻¹. A cada concentración preestablecida se le adicionó bajo flujo de CO₂ y de forma individual: 0.0067 ppm de As, 0.012 ppm de Cr, 0.00047 ppm de Cd y 0.013 ppm de Pb, generando 4 tratamientos. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones. Se integró un blanco por cada tratamiento, el cual estaba libre de levadura, para ajustar los datos de biosorción causada por *S. cerevisiae*. Los medios de cultivo inoculados se incubaron a 37°C por 1 h. Después, se tomó 1 mL⁻¹ de cultivo para realizar diluciones seriadas (10⁻¹ a 10⁻¹⁰), 1/10 v/v con agua peptonada al 0.1%. Se tomaron 100 µL⁻¹ de cada dilución para realizar siembra en placa en medio sólido YPD y se incubó a 30°C por 24 horas, para realizar conteos de UFC (Dogi *et al.*, 2011; Camacho *et al.*, 2009; Vázquez *et al.*, 2019) y determinar la viabilidad de *S. cerevisiae* en medio ácido.

El medio de cultivo remanente después de la incubación fue centrifugado (Beckman, USA) a 2000 x g por 15 minutos (Massoud *et al.*, 2020) en tubos de polipropileno de 50 mL, se recuperó el sobrenadante en frascos de polipropileno de 100 mL, se adiciono HNO₃ (J.T. Baker, USA) hasta obtener un pH menor o igual a 2 y se conservó la muestra en refrigeración a 4°C hasta la digestión y análisis de metales pesados.

4. 2. 7 Capacidad de biosorción de *Saccharomyces cerevisiae* en medio con sales biliares

En viales con capacidad de 100 mL⁻¹ se agregaron 45 mL⁻¹ de medio cultivo YPD que contenía 0.3 % de sales biliares (p/v) (Oxgall Difco, USA), previamente esterilizado a 121°C por 20 min. A estos medios se adicionaron cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* reactivados individualmente para generar las siguientes concentraciones de la levadura en el medio: 3.7 x 10⁵, 1.5 x 10⁶, 2.6 x 10⁶ y 3.7 x 10⁶ UFC mL⁻¹. A cada concentración preestablecida de *S. cerevisiae* en el medio de cultivo, se le adicionó bajo flujo de CO₂ y de forma individual: 0.0067 ppm de As, 0.012 ppm de Cr, 0.00047 ppm de Cd y 0.013 ppm de Pb, originando 4 tratamientos. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones y se integró un blanco por cada tratamiento, el cual estaba libre de levadura, para ajustar los datos de biosorción causada por *S. cerevisiae*. Los medios de cultivo inoculados se incubaron a 37°C por 3 h. Después, se tomó 1 mL⁻¹ de cultivo para realizar diluciones seriadas (10⁻¹ a 10⁻¹⁰), 1/10 v/v con agua peptonada al 0.1%. Se tomaron 100 µL⁻¹ de cada dilución para realizar siembra en placa en medio sólido YPD y se incubó a 30°C por 24 h, para realizar conteos de UFC (Dogi *et al.*, 2011; Camacho *et al.*, 2009; Vázquez *et al.*, 2019) y determinar la viabilidad de *S. cerevisiae* en medio alcalino.

El medio de cultivo remanente después de la incubación fue centrifugado (Beckman, USA) a 2000 x g por 15 minutos (Massoud *et al.*, 2020) en tubos de polipropileno de 50 mL se recuperó el sobrenadante en frascos de polipropileno de 100 mL, se adiciono HNO₃ (J.T. Baker, USA) hasta obtener un pH menor o igual a 2 y se conservó la muestra en refrigeración a 4°C hasta la digestión y análisis de metales pesados.

4. 3 Digestión de muestras

La digestión acida se llevó a cabo en un microondas (CEM-MARS 6, CEM corporation Mathews, NC) con las siguientes especificaciones: 200°C, tiempo de rampa 15:00 (mm:ss), espera 15:00 (mm:ss), 800 psi, 1800 w.

4. 4 Evaluación de remoción

La eficiencia de remoción de metales pesados propiciada por *S. cerevisiae* en los medios de cultivo, fue calculada con la siguiente ecuación (Massoud *et al.*, 2020):

$$\text{Remoción (\%)} = 100 \frac{(C_o - C_f)}{C_o}$$

Donde:

C_o es la concentración inicial en solución ($\mu\text{g L}^{-1}$) y C_f es la concentración final en la solución.

4. 5 Ensayo *in vivo*: biosorción de metales pesados por *Saccharomyces cerevisiae* en ganado lechero

4. 5. 1 Tratamientos experimentales

Con base a los resultados del ensayo *in vitro*, se evaluaron cinco niveles de inclusión de *Saccharomyces cerevisiae* (Cuadro 12) en la dieta de ganado bovino productor de leche, alimentado con forrajes y concentrados contaminados con metales pesados en unidades productivas lecheras pertenecientes al estado de Tlaxcala. Cada tratamiento incluyó siete repeticiones.

Cuadro 12. Tratamientos experimentales.

Tratamiento, T	Nivel de inclusión en la dieta de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> [‡] , x 10 ⁸ UFC d ⁻¹
T0	0
T1	5
T2	20
T3	35
T4	50

[‡] Yea- Sacc 1026 (Altech Inc, USA), aportado como gramos de producto comercial, previa determinación de la viabilidad de la levadura.

4. 5. 2 Animales

Se utilizaron 28 vacas Holstein de 450 ± 30 kg de PV, entre 1 y 6 meses de lactancia y de 2 a 4 partos. Los animales pertenecían a 7 unidades de producción y se distribuyeron bajo un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y siete repeticiones. La asignación de los tratamientos a las unidades experimentales se realizó de tal forma que, en cada establo se evaluaran los cuatro tratamientos. Se dio un periodo de adaptación de 21 días al manejo y a la suplementación con *Saccharomyces cerevisiae* con la dosis de 10 gramos por animal recomendada por el fabricante, antes de iniciar las evaluaciones del experimento. Los muestreos de leche, orina y heces se llevaron a cabo durante el ordeño de la mañana (6:00 am). El protocolo experimental relacionado con el manejo de los animales se basó en el Reglamento para el uso y cuidado de animales destinados a la investigación del Colegio de Postgraduados.

4. 5. 3 Alimentación

La alimentación se basó en la dieta proporcionada de forma habitual en las unidades de producción y consistió en alfalfa fresca, rastrojo de maíz, ensilado y concentrado en proporción aproximada de, 23.94%, 35.09%, 23.39% y 10.03% respectivamente. De

acuerdo con el manejo alimenticio de las explotaciones donde se desarrolló la investigación, se aportó concentrado y forraje al momento de la ordeña de la mañana y tarde (6:00 y 18:00 h). En el concentrado ofrecido por la mañana se adicionó el *Saccharomyces cerevisiae* de acuerdo con el tratamiento correspondiente (Cuadro 12).

Se recolectaron muestras durante 3 días consecutivos a intervalos de 15 días, para elaborar una muestra compuesta de forraje (1 kg), concentrado (0.5 kg) y agua (1 L) y a las muestras de forraje y concentrado se les determinó la composición química con base a materia seca, proteína total, cenizas, extracto etéreo (AOAC, 2005), fibra detergente neutro y fibra detergente ácido (Goering y Van Soest, 1972); asimismo, se realizó el análisis de metales pesados a todas las muestras recolectadas.

4. 5. 4 Toma de muestras

4. 5. 4. 1 Agua

Se recolectaron muestras de 2 L en frascos de polipropileno con capacidad de 2 L previamente sumergidos en ácido nítrico (J. T. Baker, USA) al 10% durante 1 h. La muestra se tomó a 30 cm de profundidad del bebedero y se le agregó ácido nítrico al 65% hasta obtener un pH menor a 2. Las muestras permanecieron a 4°C durante su transporte y estancia en laboratorio (NMX-AA-051-SCFI-2001).

4. 5. 4. 2 Alimento concentrado

Se tomaron 10 submuestras de concentrado directamente del comedero durante la alimentación hasta formar una muestra compuesta de 0.5 kg, por productor se colocaron en bolsas de polietileno, se identificaron y llevaron a laboratorio. Posteriormente se determinó el contenido de materia seca y se procesaron en un molino Thomas-Wiley Laboratoy Mill Model 4 (Arthur H. Company, Philadelphia PA., U.S.A) con malla de 1 mm (NMX-Y-111-SCFI-2010).

4. 5. 4. 3 Forraje

Se recolectaron 24 submuestras de distintos sitios del forraje ofrecido hasta obtener una muestra compuesta de 1 kg, por productor. Estas se guardaron en bolsas de polietileno,

se identificaron y llevaron en contenedor plástico a temperatura de 4°C a laboratorio. Después se les determinó materia seca y se procesaron en el molino y con la malla arriba citada (NMX-Y-111-SCFI-2010).

4. 5. 4. 4 Leche

Se utilizaron tubos Falcón de 50 mL, previamente lavados con HNO₃ al 10% v/v (J.T. Baker, USA) y se enjuagaron tres veces con agua desionizada para eliminar residuos ácidos y evitar alteraciones en la leche. El muestreo se realizó durante el ordeño de la mañana (6:00 am), posterior al despunte y asegurando una muestra de leche obtenida de los cuatro cuartos de la ubre, las muestras fueron transportadas y almacenadas a 4°C al laboratorio para su posterior liofilización en equipo LABCONCO 4.5 L con congelador equipado (LABCONCO, USA) y análisis.

4. 5. 4. 5 Heces

Se tomaron muestras de heces (1 kg) obtenida por estimulación rectal con un guante de nylon, se identificaron y se transportaron a 4°C en nevera al laboratorio. Posteriormente fueron puestas en bolsas de papel para deshidratarse en una estufa de secado (Riossa EFC, México) a 65°C por 24 h, se pulverizaron en un mortero y se colocaron en frascos de plástico cerrados herméticamente.

4. 5. 4. 6 Orina

Se tomaron 50 mL de orina durante la ordeña de la mañana (6:00 am) en frascos de polipropileno capacidad de 100 mL. Después se agregó ácido nítrico al 1% w/v (J.T. Baker, USA) y se mantuvieron a 4°C durante su transporte y en laboratorio.

4. 5 .5 Tratamiento de muestras

4. 5. 5. 1 Agua

Se midieron 45 mL de cada muestra y se les agregaron 5 mL de ácido nítrico al 65% w/v (J.T. Baker, USA) para después ser sometidos a un proceso de digestión en microondas (CEM-MARS 6, CEM corporation Mathews, NC) con las siguientes especificaciones: 170 °C, rampa de 10 min, espera de 10 min, 800 psi y 1800 w.

4. 5. 5. 2 Alimento concentrado

Se pesaron 0.5 g de concentrado y se agregaron 10 mL de ácido nítrico al 65% w/v (J.T. Baker, USA) más 2 mL de ácido clorhídrico al 36% w/v (J.T. Baker, USA), después se digirieron en microondas (CEM-MARS 6, CEM corporation Mathews, NC) a 200 °C, tiempo de rampa 15 min, espera 15:00 min, 800 psi y 1800 w.

4. 5. 5. 3 Forraje y ensilado

Se tomaron 0.5 g de muestra y se les añadió 10 mL de ácido nítrico al 65% w/v (J.T. Baker, USA), se llevaron a microondas de digestión (CEM-MARS 6, CEM corporation Mathews, NC) y se programaron a 200°C, tiempo de rampa 15 min, espera 15 min, 800 psi y 1800 w.

4. 5. 5. 4 Leche

Se pesaron 0.5 g de leche liofilizada y se agregaron 10 mL de HNO₃ al 65% w/v (J.T. Baker, USA), después se colocaron en microondas de digestión (CEM-MARS 6, CEM corporation Mathews, NC) a 200°C, tiempo de rampa 15 min, espera de 15 min, 800 psi y 1600 w.

4. 5. 5. 5 Heces

Se pesó 0.3 g de muestra y se agregaron 5 mL de HNO₃ al 65% w/v (J.T. Baker, USA) más 5 mL de peróxido de hidrogeno al 30% w/v (Merck, México) a 200°C, tiempo de rampa 15 min, 15 min de espera, 800 psi y 1600 w de potencia en microondas de digestión (CEM-MARS 6, CEM corporation Mathews, NC).

4. 5. 5. 6 Orina

Se midió 4 mL de orina y se agregó 4 mL de ácido nítrico (J.T. Baker, USA) + 2 mL de peróxido de hidrogeno al 30% w/v (Merck, México), para después someter la muestra a digestión en microondas (CEM-MARS 6, CEM corporation Mathews, NC), con las siguientes especificaciones: 200°C, tiempo de rampa 15 min, espera 15 min, 800 psi, 1800 w.

Al terminar la digestión, todas las muestras se filtraron en papel Wathman grado 42 (GE Healthcare, Ucrania), y se aforaron a 50 mL con agua desionizada, finalmente se colocaron en refrigeración (4 °C) hasta su análisis.

4. 6 Determinación de metales pesados

La concentración de As, Cr, Cd y Pb fue determinada por medio de espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP – OES, Varian 730) (Agilent Technologies, USA). Todos los productos químicos utilizados fueron de grado reactivo analítico. Se prepararon las soluciones en agua desionizada 18.2 MΩ cm. Los estándares de calibración para cada metal fueron preparados usando una solución patrón ICP multielemento standard XVI, compuesta de 21 elementos en HNO₃ Suprapuro 6%, con densidad de 1.032 g cm⁻³ y 20 °C (Merck KGaA, Alemania).

4. 7 Índice de contaminación por metales pesados (HMI)

$$HMI = C_n/S_v$$

Donde:

C_n: representa la concentración del elemento en el sitio muestreado

S_v: son los valores permisibles para cada metal.

Los datos obtenidos en valores de HMI son categorizados en cuatro grupos: < 1 indica baja contaminación, entre 1 y 3 se relaciona con moderada contaminación, entre 3 y 6 implica alta contaminación y un valor de 6 denota muy alta contaminación (Nnabugwu y Uchenna, 2019).

4. 8 Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones en el ensayo *in vitro* y siete repeticiones por tratamiento en datos no paramétricos para el ensayo *in vivo*:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

- Y_{ijk} : variable respuesta en el tratamiento i en la repetición j
- μ : media general
- T_i : efecto de tratamiento
- E_{ij} : error aleatorio

Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico IBM SPSS STATISTICS ver. 26 (2019). El ensayo de viabilidad fue analizado mediante prueba HSD Tukey, por otro lado, en los ensayos de biosorción *in vitro* e *in vivo* se usó la prueba de Kruskal Wallis para comparación de grupos independientes (rangos-medianas).

4. 9 Estadístico

Se realizó una prueba de normalidad Shapiro Wilk en cada matriz evaluada y se concluyó que los datos obtenidos no presentaban distribución normal, por lo que se realizaron pruebas de Kruskal Wallis para hallar diferencias entre distribución de poblaciones.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL

5.1 Viabilidad *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* en diferentes condiciones del tubo digestivo

La viabilidad *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones del medio ruminal varió ($p < 0.05$; Cuadro 13) entre los tratamientos evaluados y no estuvo relacionada con la concentración inicial de la levadura incubada. De esta manera, la viabilidad más alta ($p < 0.05$) se registró en el T3 con respecto al T4, el cual presentó una viabilidad baja ($p < 0.05$), incluso menor ($p < 0.05$) a la observada en el T1 donde se tuvo la población inicial de levaduras más baja antes de la incubación. Riyanti y Evvyernie (2016) observaron una tasa de crecimiento de $2.6\% \text{ h}^{-1}$ en tres cepas de *S. cerevisiae* bajo condiciones ruminales. Por el contrario, Durand *et al.* (1998) indicaron que una sola adición de *S. cerevisiae* con 2×10^9 UFC se relacionó con una disminución drástica de las levaduras en rumen después de las 24 h (10^5 UFC mL^{-1}). En adición, Jurkovich *et al.* (2014) mencionan que esta levadura tiene la capacidad de presentar diferentes vías metabólicas, dependiendo de la cantidad de oxígeno presente en el ambiente, lo que sugiere que sea anaerobia facultativa; además de que su actividad metabólica está modulada por la composición de la dieta en el medio ruminal (Kawas *et al.*, 2007). Adicionalmente, Kung *et al.* (1997) señalaron que las levaduras de *S. cerevisiae* permanecen metabólicamente activas mientras exista adición de nutrientes hasta las 48 horas de incubación, momento en el cual el crecimiento se ve afectado en condiciones ruminales, por consiguiente se infiere que la levadura no presenta un crecimiento exponencial en el medio ruminal; sin embargo, mantiene su viabilidad y actividad metabólica hasta determinado tiempo de incubación (Ingledew y Jones, 1982; Kutasi *et al.*, 2004), como se observó este trabajo donde la concentración de UFC fue mayor después de 24 h, a la registrada al inicio de la incubación.

Así mismo, Kutasi *et al.* (2004) determinaron que una concentración de 4.5 a 6.6×10^9 UFC de *S. cervisiae*, después de 12 h de incubación, permite que la levadura muestre una actividad metabólica apropiada al eliminar el oxígeno del medio y de esta manera, mejorar la fermentación ruminal en un medio anaerobio, similar a lo que ocurrió en el T3 donde se tuvo el conteo más alto de UFC después de 24 h. Posiblemente una inoculación

más alta de levaduras, por arriba de la evaluada en el T3 se relacionó con el agotamiento acelerado de nutrientes y propició el menor conteo de UFC a las 24 h (Kung *et al.*, 1997).

La viabilidad de *S. cerevisiae* en el medio ácido presentó cambios ($p < 0.05$; Cuadro 13) entre tratamientos después de la incubación y fue el tratamiento T4 el que presentó la mayor ($p < 0.05$) viabilidad bajo estas condiciones. Pinheiro *et al.* (2020) al evaluar la viabilidad de tres cepas de *S. cerevisiae* (A8L2, RC1 y RC2) a pH 2, observaron mínima disminución en la población de levaduras después de 12 h de incubación ($7.57, 8.17$ y 8.16×10^7 UFC mL⁻¹ inicial vs $7.56, 7.82$ y 8.06×10^7 UFC mL⁻¹ final, respectivamente). En contraste, Fakruddin *et al.* (2017) determinaron que la cepa IFST 062013 de *S. cerevisiae* disminuye de 1×10^6 a 9×10^5 UFC mL⁻¹ cuando es incubada 1 h en un medio con pH 2, pero la población viable se reduce casi al 50% a las 2 h de incubación bajo estas condiciones. De igual forma, Arias *et al.* (2017) y Azhar y Munaim (2019) reportan la sobrevivencia de diferentes cepas de *S. cerevisiae* y evidencian su capacidad para sobrevivir al menos por 24 h a pH 2, condiciones más extremas a la evaluada en el presente estudio, indicando la capacidad de las células de levadura para atravesar la barrera gástrica (abomaso) y llegar al intestino de rumiantes.

A pesar de las diferencias ($p < 0.05$) observadas entre el T4 con el resto de los tratamientos, en el conteo de UFC dentro de cada tratamiento, al final de la incubación en medio ácido mostró siempre incremento en la población de levaduras con respecto a la concentración inicial observada antes de la incubación. La adaptación de la levadura Yea sacch 1026 al medio ácido sugiere la presencia de mecanismos relacionados con la difusión de ácidos a través de la membrana plasmática, una vez dissociado en el citoplasma la activación de la H-ATPasa permitió el bombeo de los protones fuera de esta, restableciendo la homeostasis de pH (Mira *et al.*, 2010; Sanchis, 2014). Asimismo, está documentado el mecanismo regulador de pH en levaduras mediante el intercambio de Na/H (Nha1p) localizado en la membrana plasmática y en el compartimento endosomal prevacuolar (Nhx1p) (Ohgaki *et al.*, 2005). Estos mecanismos participan en la regulación de Na o K usando el gradiente de H, eliminando el exceso de cationes al citosol (Mitsui *et al.*, 2005; Ortiz *et al.*, 2008).

La viabilidad de *S. cerevisiae* en medio alcalino (0.3% de sales biliares) presentó diferencias ($p < 0.05$; Cuadro 13) entre tratamientos, observándose la mayor ($p < 0.05$) viabilidad en el T4 respecto al T1, el cual presentó la más baja viabilidad. Congruente con nuestros resultados, Arias *et al.* (2017) reportaron mantenimiento de 1×10^5 UFC mL⁻¹ de *S. cerevisiae*, cuando se incuban por 24 horas en medio con sales biliares al 0.3%. Adicionalmente, Ortiz *et al.* (2008) y Zahoor *et al.* (2021) destacan la capacidad de *S. cerevisiae* para tolerar concentraciones de sales biliares (0.3%) similares a las observadas en intestino delgado, por periodos de 1 a 2.5 h de incubación. *S. cerevisiae* presenta mejor resistencia a medios con sales que *S. boulardii* al de observarse que la cepa W303 no presentó disminución considerable al exponerse a 0.15% de sales biliares (Fietto *et al.*, 2004). Además, *S. cerevisiae* sobrevive tras 4 h de incubación en medio con sales biliares al 0.3% y muestra capacidad de replicación (Van Der Aa Kühle y Jespersen, 2005; Lara y Burgos, 2012), similar a lo observado en el T4 de nuestra investigación. En contraste, Moradi *et al.* (2018) menciona que en medios con concentraciones de sales biliares al 1, 3 y 5% y con periodo de incubación de 24 h existe una disminución de las UFC de *S. cerevisiae* cepa S28 y S34 (9.2×10^9 UFC inicial – 6.8 y 5.6×10^9 UFC final en medio al 1% y 3% mientras que 5.9×10^9 UFC final en medio al 5%). Del mismo modo, Helmy *et al.* (2019) documentaron una disminución en las UFC de *S. Cerevisiae* gBLKX237673 en medio con sales biliares al 0.2 %, 3 h de incubación (5×10^9 vs 7.5×10^5 UFC mL⁻¹). La viabilidad observada en *S. cerevisiae* cuando se expone a condiciones salinas en los estudios mencionados y en nuestra investigación, pueden estar relacionada con los componentes del medio de cultivo o la dieta (Kawas *et al.*, 2007).

Los organismos expuestos a un ambiente salino generan dos tipos de estrés, uno dependiente de la concentración de sales en el medio y otro dependiente del tipo de ion y su toxicidad. En *S. cerevisiae* se caracterizaron transportadores iónicos de membrana activados en situaciones de estrés salina (Folch *et al.*, 2004). La proteína ATPasa H (Pmap1) expulsa Na y K permitiendo un potencial negativo intracelular (Serrano, 1996). Los transportadores Trk1, Trk2, Tok1, Nha1p, Kha1p y Ena1p se relacionan con la entrada y salida de K, la afinidad de estos por el ion aumenta en situaciones de estrés salino, (Wagskog y Adler, 2003). Asimismo, la ATPasa Na vinculada con la salida de sodio, tiene

mayor actividad en situaciones de estrés salino por Na (Hohmann, 2003). En este sentido, Arias *et al.* (2017) también destaca la presencia de proteínas integrales de membrana unidas a ATP (ABC) con la capacidad de translocar sales biliares, además de transportar ácidos biliares conjugados, así como la acumulación de gliceroles y polioles para llevar a cabo una buena regulación osmótica. De esta manera, *S. cerevisiae* puede regular su sobrevivencia en medios alcalinos y presentar alta viabilidad como la observada en el T4 (Cuadro 13).

Cuadro 13. Viabilidad *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* en medio ruminal, ácido y alcalino.

Tratamiento, T€	€ ruminal	€ ácido	€ alcalino
	-----UFC mL ⁻¹ -----		
T1: 3.7 x 10 ⁵	7.85 b	7.92 b	11.11 b
T2: 1.5 x 10 ⁶	7.81 bc	8.05 b	12.69 b
T3: 2.6 x 10 ⁶	9.13 a	8.22 b	13.69 b
T4: 3.7 x 10 ⁶	7.63 c	11.45 a	14.89 a
P<	0.0001	0.0001	0.0001
EEM	8.23	10.57	13.99

a, b, c Literales distintas en la misma columna indican diferencia (p <0.05).

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* mostró capacidad de sobrevivencia en las tres barreras evaluadas (ruminal, ácida y alcalina), evidenciando mayor viabilidad en condiciones ácidas y alcalinas que en medio ruminal. Si bien, se ha documentado limitada colonización del tracto gastrointestinal por *Saccharomyces cerevisiae* (Etienne *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2017), los resultados obtenidos por Ma *et al.* (2018) sobre la reducción de enterobacterias en heces de terneros y la disminución de diarreas por Lee *et al.* (2017) con concentraciones de levadura semejantes (1.4, 2.5 y 5.0 × 10⁹ UFC), sugieren tránsito por todo el tubo digestivo. En este sentido, Fonty y Chaucheyras (2006), también subrayan la estabilidad en la concentración de la levadura en rumen hasta las 24 h y su sobrevivencia la cual se puede ver aumentada durante su paso por duodeno, yeyuno e íleon (García, 2000), esto asegura su permanencia en tubo digestivo y su uso como posible agente biosorbente de metales pesados en el tracto digestivo de rumiantes.

5.2 Biosorción in vitro de *S. cerevisiae*

No se detectó la presencia Cr y Cd en los ensayos de biosorción en medio ruminal, ácido o alcalino (sales biliares), por ello se omite mencionarlos. Sin embargo, fue posible detectar As y Pb en las matrices evaluadas y a continuación se discuten.

5. 2. 1 Biosorción de *S. cerevisiae* en medio ruminal

Los resultados de esta prueba (Cuadro 14) indican la incapacidad ($p > 0.05$) de *S. cerevisiae* de biosorber As en las condiciones del medio ruminal, con diferente concentración de la levadura. Pero al adicionar al medio ruminal una concentración de 2.6×10^6 UFC mL⁻¹ (T7) se logró el nivel más alto de biosorción de Pb, con 28.26% por arriba del resto de los tratamientos (T5, T6 y T8); aunque estadísticamente no hubo diferencias ($p > 0.05$). No se detectó Cr y Cd, por lo que no fue posible evaluar su biosorción. La ausencia de biosorción de As en el ambiente ruminal se relaciona con la composición del medio. La presencia de cationes en la solución, así como de cloruros compiten por sitios de unión de As en la pared celular de la levadura (Sahmoune, 2018). De igual manera, los electrolitos, sulfatos, cloruros y fosfatos interfieren en el mecanismo de sorción (Wang y Chen, 2006; Rodríguez *et al.*, 2008). También la afinidad de la membrana de la levadura por un metal u otro varía, reflejándose en la disminución del porcentaje de biosorción (Ali, 2020). Importante es mencionar que el medio usado en la presente investigación contenía carbonatos, sulfatos, óxidos y cloruros, los cuales pudieron interferir en la biosorción de As. Además, el pH modula la biosorción del As, observándose mayor biosorción con valores de pH cercano a 7 (Ranjan *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2012), así como en rangos de 3 a 7 (Hadiani *et al.*, 2019), aunque el efecto de la interferencia por los sitios de sorción pareció superar el factor pH.

La biosorción de Pb causada por *S. cerevisiae* (T5, T6 y T8) fue baja y pudo relacionarse al efecto de competencia con iones en el medio ruminal; aunque se han reportado capacidades de biosorción de 76.2% en medios con 0.052 mg L⁻¹ de Pb y 32.5×10^7 UFC de levadura. Es importante destacar que la biosorción más alta de Pb se relacionó con la viabilidad más elevada de *S. cerevisiae* en el medio ruminal observada en el T3 (Cuadro 12). Las bacterias ruminales también pueden contribuir a la biosorción.

Meignanalakshmi (2013) señala la capacidad de biosorción que tiene un consorcio de bacterias ruminales (hasta 150 ppm); por otra parte, Behera y Ray (2021) añaden que la microbiota extraída de heces de vaca también se ha usado como alternativa de biosorción, permitiendo la volatilización de As así como la bioquelación de Pb a un 64%. Sin embargo, en el presente estudio no se evaluó la contribución de biosorción de la microbiota ruminal.

Cuadro 14. Biosorción de *Saccharomyces cerevisiae* en medio ruminal.

Metal	Tratamiento	Biosorción, %	Rango	DE
As	T1	28.35 ^a	8	49.11
	T2	0 ^a	6	0
	T3	0 ^a	6	0
	T4	0 ^a	6	0
	P	0.39		
	EEM	7.08		
Pb	T5	10.53 ^a	7	18.25
	T6	0.40 ^a	6.67	0.70
	T7	28.26 ^a	7.33	48.96
	T8	0 ^a	5	0
	p	0.73		
	EEM	7.30		

T1, T2, T3 y T4 con 3.7×10^5 , 1.5×10^6 , 2.6×10^6 y 3.7×10^6 UFC de *S. cerevisiae* mL⁻¹, respectivamente, más 0.0067 ppm de As en cada tratamiento. T5, T6, T7 y T8 con 3.7×10^5 , 1.5×10^6 , 2.6×10^6 y 3.7×10^6 UFC de *S. cerevisiae* mL⁻¹, respectivamente, más 0.013 ppm de Pb en cada tratamiento. ^{a, b, c} Literales distintas por columna indican diferencias ($p < 0.05$). DE= Desviación estándar. EEM= error estándar.

5. 2. 2 Biosorción de *S. cerevisiae* en medio ácido

La biosorción de As en medio ácido fue mayor ($p < 0.05$; Cuadro 15) en T3 con respecto a T2, pero ambos resultan similares ($p > 0.05$) a T1 y T4. Para el caso de Pb, también se observaron diferencias entre tratamientos, donde el T8 tuvo la mejor ($p < 0.05$) biosorción, seguido del T5 y el valor más bajo se observó en el T6. Los resultados observados para la mayor biosorción de Pb entre T8 con respecto a T6 se relacionaron con la mayor

cantidad de UFC en el medio y al respecto se ha señalado que al aumentar la biomasa de levaduras es mayor la superficie y sitios activos para la sorción (Farhan y Khandom, 2015). Ranjan *et al.* (2009) indican que la máxima biosorción de As se da a pH cercano a 7. De manera similar, Hadiani *et al.* (2019) reportaron el aumento de esta capacidad hasta un 78% cuando el pH incrementa de 3 a 7 al igual que el tamaño del inóculo (3.0–7.0 a $15\text{--}50 \times 10^7$ UFC mL⁻¹). Posiblemente esto explique los bajos niveles de biosorción observados para este metal pesado a un pH de 4, los cuales se aproximaron al 50%. Valores de pH cercanos a 5 mejoran la sorción de Pb, aunque el pretratamiento con glucosa puede mejorar la capacidad de *S. cerevisiae* para biosorber metales debido al suministro de energía que representa (Massoud *et al.*, 2019). Independientemente de la reactivación que tuvo la levadura en un medio de cultivo que contenía glucosa, efectivamente se observaron niveles de sorción de Pb cercanos a 100% con un pH de 4 y cuando se utilizó el nivel más alto de *S. cerevisiae*.

Cuadro 15. Biosorción de *Saccharomyces cerevisiae* en medio ácido.

Metal	Tratamiento	Biosorción, %	Rango	DE
As	T1	38.44 ^{ab}	6.33	14.90
	T2	0 ^b	2	3.86
	T3	53.35 ^a	10	1.29
	T4	50.54 ^{ab}	7	0.98
	P	0.03		
	EEM	6.43		
Pb	T5	77.43 ^b	2	8.74
	T6	20 ^d	5	12.30
	T7	48.46 ^c	8	11.53
	T8	96.41 ^a	11	6.21
	P	0.01		
	EEM	9.08		

T1, T2, T3 y T4 con 3.7×10^5 , 1.5×10^6 , 2.6×10^6 y 3.7×10^6 UFC de *S. cerevisiae* mL⁻¹, respectivamente, más 0.0067 ppm de As en cada tratamiento. T5, T6, T7 y T8 con 3.7×10^5 , 1.5×10^6 , 2.6×10^6 y 3.7×10^6 UFC de *S. cerevisiae* mL⁻¹, respectivamente, más 0.013 ppm de Pb en cada tratamiento. ^{a, b, c} Literales distintas por columna indican diferencias ($p < 0.05$). DE= Desviación estándar. EEM= error estándar.

5. 2. 3 Biosorción de *S. cerevisiae* en medio con sales biliares

Para el caso de As, la concentración de levadura evaluada en el T2 tuvo la mayor ($p < 0.05$) biosorción en medio alcalino y resultó superior ($p < 0.05$; Cuadro 16) al resto de los tratamientos. Con plomo en el medio, la sorción de *S. cerevisiae* en ambiente alcalino fue más alta ($p < 0.05$) en el T7 y T8 con respecto a T6; no obstante, el T5 resultó similar ($p > 0.05$) al resto de los tratamientos, aunque tuvo la menor concentración de levaduras. Se han reportado porcentajes de sorción de As en medios acuosos con rangos amplios de pH desde 3 a 8; por ejemplo, Wu *et al.* (2012) indican sorción cercana a 50% en pH 7, igualmente cuando la biomasa fue aumentada (26.5 a 52.3%) de 2 a 7 g L⁻¹; sin embargo, este último criterio está sujeto a otras razones como la interacción electrostática e interferencia entre sitios de sorción (Ertugay y Bayhan. 2010). Aunado a esto, la capacidad de sorción de As es inversa a la capacidad de sorción de Pb, ya que los tratamientos con menor sorción de Pb tuvieron mayor sorción de As. Sahmoune

(2018) menciona la presencia de cationes como un factor determinante en la sorción de un metal en específico. Farcasanu y Ruta (2017) coinciden con lo anterior haciendo énfasis en la preferencia de *S. cerevisiae* por cationes metálicos como es el caso de Pb, destacando también que la cantidad inicial de Pb fue mayor a la de arsénico.

En el caso de plomo la correcta biosorción en el T8 concuerda con ensayo de viabilidad, ya que este tratamiento tuvo mayor cantidad de UFC en el mismo medio en comparación con los demás y por ende mayor biomasa para llevar a cabo dicho proceso, paralelamente, Wang y Chen (2006) añaden que el pretratamiento con glucosa (realizado durante la reactivación en medio YPD) incrementa la cantidad de remoción en metales como Cr, Pb y Cd pudiendo ser un cofactor importante en la biosorción de Pb. Respecto a pH, el medio registro un rango de 6.2 a 6.4 pH, en este sentido, Massoud *et al.* (2019) reporta capacidad de biosorción (70%) en concentración inicial de Pb 0.07 mg/L^{-1} y 22×10^8 UFC, de forma positiva también Hadiani *et al.* (2018) indica biosorción de 70.3% con 0.05 mg/L^{-1} Pb y 15×10^7 UFC, pH entre 5 y 6, datos que coinciden por los reportados en esta prueba.

Cuadro 16. Biosorción de *S. cerevisiae* en un medio alcalino

Metal	Tratamiento	Biosorción %	Rango	DE
As	T1	28.45 ^b	7.66	4.78
	T2	53.50 ^a	11	6.36
	T3	0 ^b	2.33	18.79
	T4	16.56 ^b	5	10.25
	P	0.02		
	EEM	6.70		
Pb	T5	42.56 ^a	4.83	37.25
	T6	5.64 ^a	2.83	8.47
	T7	85.64 ^a	8.67	24.87
	T8	91.79 ^a	9.67	14.21
	P	0.05		
	EEM	12.05		

T1, T2, T3 y T4 con 3.7×10^5 , 1.5×10^6 , 2.6×10^6 y 3.7×10^6 UFC de *S. cerevisiae* mL⁻¹, respectivamente, más 0.0067 ppm de As en cada tratamiento. T5, T6, T7 y T8 con 3.7×10^5 , 1.5×10^6 , 2.6×10^6 y 3.7×10^6 UFC de *S. cerevisiae* mL⁻¹, respectivamente, más 0.013 ppm de Pb en cada tratamiento. ^{a, b, c} Literales distintas por columna indican diferencias ($p < 0.05$). DE= Desviación estándar. EEM= error estándar.

5. 3 Ensayo *in vivo*: Presencia de metales pesados en agua y alimentos

5. 3. 1 Determinación de metales pesados en forrajes y concentrados en la zona de estudio

El Cuadro 17 presenta los niveles de arsénico, cromo, cadmio y plomo detectados en diferentes insumos para alimentación animal (alfalfa, concentrado, zacate y ensilado) en la zona de estudio. La contaminación con As de estos insumos fue la más evidente con niveles que van de 2.6 a 10.7 ppm, y son los forrajes los más afectados, especialmente alfalfa y zacate, explicándose por el uso de aguas contaminadas con metales pesados para su irrigación (Romero *et al.*, 2003; Castro-González *et al.*, 2018). Cromo y plomo se detectaron en forrajes y concentrado a un nivel más bajo que As, pero no se detectaron en el ensilado. Ninguno de los insumos registró contaminación por cadmio, aunque si se detectaron niveles similares de Cr en zacate y alimento concentrado. Estos resultados, en su mayoría se valoran por encima de los reportados por Castro-González *et al.* (2018)

en un estudio preliminar realizado cerca en la región de estudio donde se determinó 1.25, 1.86 y 1.56 mg de As, Pb y Cr kg⁻¹ en alfalfa. Danis y Chan (2016) también reportaron niveles de 1.2 a 1.45 µg g⁻¹ de Pb y 1.21 a 1.38 µg g⁻¹ de Cr en forraje aportado a ganado bovino, resultando inferiores a los de nuestro estudio, y además mencionan la presencia de metales en forrajes por otros medios ajenos al suelo. Poti *et al.* (2021) reportaron la presencia de metales pesados en insumos para ganado lechero (1.14, 2.12 y 0.950 mg kg⁻¹ de Pb y 0.106, 0.070 y 0.044 mg kg⁻¹ de Cr en pasto, concentrado y heno, respectivamente), resultando también inferiores a los determinados en este estudio, solamente el nivel que estos autores detectaron en concentrado se asemeja al observado en esta investigación.

Asimismo, los metales presentes en estos forrajes no están por encima de los niveles de la normativa europea para Pb y Cd (30 y 1 mg kg⁻¹, respectivamente) (2005/87/EC), mientras el cromo se encuentra por encima de lo permitido en el centro de medicina veterinaria de la FDA de USA (0.5 mg kg⁻¹ MS) mencionado por Spears *et al.* (2017). Por su parte, Khan *et al.* (2013) indican que la concentración de metales como el Pb en planta se ve reducida gradualmente con el tiempo, teniendo estrecha dependencia con las concentraciones en el suelo, aunque también se pueden ver aumentados debido al dinamismo que existe en la capa superficial del suelo (0 a 30 cm), donde se encuentran más biodisponible (Zaanouni *et al.*, 2018).

Cuadro 17. Contenido de metales pesados en forrajes y concentrado empleados en la zona de estudio.

Insumos	Metales pesados, mg kg ⁻¹ MS			
	As	Cr	Cd	Pb
Alfalfa	10.74±4.80	Nd	Nd	3.82± 4.52
Zacate	8.88±1.46	3.18±0.01	Nd	0.13±0.18
Alimento concentrado	1.34±1.90	3.41±2.89	Nd	2.78±1.96
Ensilado	4.557±0.001	Nd	Nd	Nd

Nd= no detectado.

5. 3. 2 Determinación de metales pesados en agua en la zona de estudio

Los niveles de arsénico determinados en muestras de agua (Cuadro 18) variaron de 0.012 a 0.088 mg L⁻¹, existiendo una unidad de producción donde no se detectó este

metal pesado. No se detectó contaminación con Cr y Cd. Pero los niveles de Pb variaron de 0.069 a 0.15 mg L⁻¹, con una unidad de producción donde no se detectó la presencia de este metal. Las concentraciones de As y Pb determinadas en agua de abastecimiento estuvieron por encima de las permisibles establecidas en la NOM-001 ECOL- 1996 (0.05 y 0.05 mg L⁻¹ para As y Pb, respectivamente), en la mayoría de las unidades productivas. Gougoulías *et al.* (2014) encontraron niveles menores de Pb (0.0051 mg L⁻¹) en agua a los observado en el Cuadro 18, lo cual se relaciona principalmente con el grado de contaminación de las zonas de estudio.

Kazi *et al.* (2016) sugiere que el agua es la principal fuente y vía de entrada de arsénico en el organismo del ganado lechero, aunque también deben ser consideradas otras matrices biológicas (Ziarati *et al.*, 2018). Zhou *et al.* (2019) igualmente correlacionan la presencia de As en agua con los hallazgos de este metal en leche y ensilado. Además, el consumo de alimento o agua con As, Pb, Cd y Hg se relacionan con la presencia de estos en la leche y sus productos derivados (Singh *et al.*, 2020). Por su parte, Ismail *et al.* (2015) añaden que la contaminación con Pb y su relación con la leche/agua puede provenir directamente de aguas residuales que suelen servir como vertederos de desechos industriales.

La contaminación de insumos destinados a la alimentación animal constituye un riesgo para la salud pública debido a la correlación entre su contenido de metales pesados en piensos y la acumulación en tejidos; la principal razón de la transferencia de metales pesados en la cadena alimentaria es la creciente cantidad de contaminantes en suelos o ríos, donde el uso de agua en la agricultura de estos abastecimientos es casi indispensable (Arrieta, 2015).

Cuadro 18. Metales pesados en agua de abastecimiento en unidades productivas (UP) de ganado lechero.

UP ^P	Metales pesados, mg L ⁻¹			
	As	Cr	Cd	Pb
1	Nd	Nd	Nd	0.15
2	0.04	Nd	Nd	0.09
3	0.07	Nd	Nd	Nd
4	0.08	Nd	Nd	0.15
5	0.05	Nd	Nd	0.11
6	0.01	Nd	Nd	0.06

^PEstablos lecheros donde se realizaron los muestreos del estudio.

5. 4 Biosorción de *Saccharomyces cerevisiae* en tubo digestivo de ganado lechero

En la prueba con animales, sólo se detectó As y Pb en las muestras de leche, orina y heces.

5. 4. 1 Excreción de arsénico en orina y heces

En el primer muestreo (M1), los tratamientos T1 y T4 resultaron con niveles superiores ($p < 0.05$; Cuadro 19) de As en orina en comparación con el T3, pero estos resultaron similares a T0 y T2. En el segundo muestreo (M2), el T2 resultó superior ($p < 0.05$) al T0 y T1 en el contenido de As en orina, pero estos fueron iguales ($p > 0.05$) al T3 y T4. En el último muestreo (M3), el T0 y T3 superaron ($p < 0.05$) el contenido de As observado en T2, pero resultaron similares ($p > 0.05$) al T1 y T4.

Cuadro 19. Biosorción de *Saccharomyces cerevisiae* en tubo digestivo de ganado lechero y su efecto en la excreción de arsénico en orina

		As, mg kg ⁻¹	Rango muestral
M1	T0	0.041 ^{ab}	12.43
	T1	0.209 ^a	22.86
	T2	0.149 ^{ab}	20.86
	T3	0.005 ^b	9.14
	T4	0.399 ^a	24.71
	p	0.011	
	EE	0.038	
M2	T0	0.002 ^b	12.71
	T1	0.051 ^b	12.29
	T2	0.128 ^a	26.79
	T3	0.085 ^{ab}	21.29
	T4	0.029 ^{ab}	16.93
	p	0.026	
	EE	0.015	
M3	T0	0.465 ^a	24.64
	T1	0.136 ^{ab}	12.43
	T2	0.051 ^b	11.07
	T3	0.441 ^a	23.64
	T4	0.318 ^{ab}	18.21
	p	0.029	
	EE	0.045	

M1, M2 y M3: periodos de muestreo (M1: de 1 a 15 d del experimento, M2: de 15 a 30 d del experimento y M3: de 30 a 45 d del experimento. T0= Sin suplementación con *Saccharomyces cerevisiae*, T1= 5 x10⁸ UFC T2= 20 x10⁸ UFC, T3= 35 x10⁸ UFC y T4= 50 x10⁸ UFC *S. cerevisiae*. ^{a, b, c}: Distinta literal en columna y por muestreo indican diferencias (p <0.05). EE= error estándar.

Por otro lado, durante el primer periodo de muestreo de heces (Cuadro 20), el T1 mostró el mayor (p<0.05) contenido de As al observado en T0, T3 y T4, sin diferencias (p>0.05)

con T2. Para el segundo muestreo, no se observaron diferencias ($p>0.05$) entre tratamientos. Y en el último muestreo (M3), el T1 presentó la mayor ($p<0.05$) concentración de As con respecto a T0 y T4, pero fue igual ($p>0.05$) a T2 y T3.

Cuadro 20. Biosorción de *Saccharomyces cerevisiae* en tubo digestivo de ganado lechero y su efecto en la excreción de arsénico en heces

		As, mg kg ⁻¹	Rango muestral
M1	T0	0.35 ^{bc}	14.71
	T1	6.14 ^a	28.29
	T2	3.81 ^{ab}	22.86
	T3	0.50 ^c	12.29
	T4	0.31 ^c	11.86
	p	0.002	
	EEM	0.52	
M2	T0	0.09 ^a	10.71
	T1	0.81 ^a	15.43
	T2	3.34 ^a	25.86
	T3	1.11 ^a	20.57
	T4	0.76 ^a	17.43
	p	0.05	
	EEM	0.27	
M3	T0	4.17 ^b	16.71
	T1	6.88 ^a	27.57
	T2	4.93 ^{ab}	21.43
	T3	4.64 ^{ab}	17.71
	T4	0.44 ^c	6.57
	p	0.003	
	EEM	0.52	

M1, M2 y M3: periodos de muestreo (M1: de 1 a 15 d del experimento, M2: de 15 a 30 d del experimento y M3: de 30 a 45 d del experimento. T0= Sin suplementación con *Saccharomyces cerevisiae*, T1= 5 x10⁸ UFC T2= 20 x10⁸ UFC, T3= 35 x10⁸ UFC y T4= 50 x10⁸ UFC *S. cerevisiae*. ^{a, b, c}: Distinta literal en columna y por muestreo indican diferencias (p <0.05). EE= error estándar.

Castro-González *et al.* (2021) reporta concentraciones de 0.017 mg L⁻¹ de As en orina en zonas aledañas a nuestro experimento. Sin embargo, aunque son menores, estas indican consumo o exposición crónica de alimentos contaminados (Tirado *et al.*, 2015).

Como se puede observar en los resultados de este estudio, la excreción de As en orina fue variable, independientemente del nivel de *S. cerevisiae* suplementado en cada tratamiento, esto se pudo relacionar con el efecto de la levadura al modificar la permeabilidad intestinal. Al respecto, Bolan *et al.* (2021) menciona que la presencia de la microbiota y agentes quelantes disminuyen la permeabilidad de los metales en intestino delgado, reduciendo su absorción. Posiblemente la levadura ayudo también al equilibrio del microbiota y la estructura morfológica intestinal (Elghandour *et al.*, 2020), protegiendo de la invasión y adhesión de contaminantes, ayudando a su tránsito y excreción por vía fecal (Bolan *et al.*, 2021). Congruente con lo anterior, la pérdida de As en heces fue más alta a la observada en orina. Zhang *et al.* (2012) reportan niveles de As de 2.71 mg kg⁻¹ en heces de bovino procedentes de granjas intensivas en China, relacionándolo con la presencia del metaloide en el alimento. De manera similar, Wang *et al.* (2013) reportan concentraciones de 1.5 mg kg⁻¹ de As y lo relaciona con la alta actividad industrial en las zonas agrícolas, como ocurre en la presente investigación.

Las heces representan el producto final en el proceso digestivo y es una herramienta útil en el conocimiento de la biodisponibilidad de elementos minerales en la dieta (Hejna *et al.*, 2019). Bera *et al.* (2010) relacionaron la concentración de As en agua y las concentraciones orina de vacas. Si bien el arsénico puede ser acumulado en tejidos o excretado primordialmente en orina, heces y por último en leche, una correlación positiva entre concentraciones de leche y agua consumida (Kazi *et al.*, 2016) sugiere considerar el agua como principal fuente de arsénico en ganado vacuno productor de leche, así como en las matrices biológicas para su estudio (Zhou, 2019).

5. 4. 2 Presencia de arsénico en leche

Los niveles de arsénico detectados en leche variaron ($p < 0.05$) entre tratamientos por periodo de muestreo (Cuadro 21). En el primero muestreo (M1) el T2 tuvo la máxima biosorción al presentar el valor más bajo ($p < 0.05$) de As en leche comparado con el T0,

T1 y T4, pero resultó igual ($p > 0.05$) al T3. En el segundo muestreo (M2) los tratamientos T1, T3, y T4 presentaron los niveles más bajos ($p < 0.05$) de As con respecto al T0, pero resultaron similares ($p > 0.05$) al T2. En el tercer muestreo (M3), los niveles más bajos de As se observaron en el T0 al compararse con el T1 y T3, pero fue igual ($p > 0.05$) al T2 y T4. En adición, el efecto del inoculo es evidente tras suplementar a las vacas la mayor cantidad de levadura (50×10^8 UFC).

La capacidad de *S. cerevisiae* para biosorber As fue documentada por Wu *et al.* (2012), quienes confirmaron un aumento en la remoción porcentual de 25.6 a 52.3% cuando la dosificación de *Saccharomyces* fue incrementada de 2 a 7 g L⁻¹. Sin embargo, los niveles de *S. cerevisiae* evaluados (UFC) en los tratamientos de este trabajo no muestran una tendencia definida de biosorción. Al respecto, Farhan y Khandom (2015) mencionan el efecto del pH sobre la biosorción de metales pesados, el cual se basa en la competencia de los protones con iones metálicos por ocupar sitios de sorción, en otras palabras a un pH menor a 4, la protonación de los sitios de unión reduce la intensidad de carga negativa y por ende una menor unión de cationes metálicos, de esta forma, dadas las características de un medio reductor, pH superior a 4 en el intestino delgado y la presencia de As crea las condiciones ideales para la sorción de este metal por la levadura, Hadiani *et al.* (2019) reportan niveles de recuperación de 55.2% de As con 47.5×10^7 UFC de levadura, similar a lo evaluado en el T1 Asimismo, Mohebbad *et al.* (2019) indicaron una biosorción de 85.45% de As a pH 5, con 1 g L⁻¹ de levadura, pero la remoción disminuyó entre 60 y 70% cuando el pH del medio varió de 5 a 9 con 1 mg L⁻¹ de arsénico.

Cuadro 21. Biosorción de *Saccharomyces cerevisiae* en tubo digestivo de ganado lechero y su efecto en la disminución de arsénico en leche.

		As, mg kg ⁻¹	Rango muestral
M1	T0	5.57 ^a	25.29
	T1	4.71 ^a	21
	T2	0.84 ^b	6.29
	T3	3.02 ^{ab}	15.14
	T4	5.06 ^a	22.29
	p	0.005	
	EEM	0.44	
M2	T0	5.74 ^a	28.64
	T1	0.88 ^b	11.43
	T2	2.67 ^{ab}	21.07
	T3	1.90 ^b	16.79
	T4	0.93 ^b	12.07
	p	0.007	
	EEM	0.42	
M3	T0	0.353 ^b	11.57
	T1	2.462 ^a	24.07
	T2	0.83 ^{ab}	14
	T3	2.53 ^a	24.29
	T4	0.39 ^{ab}	16.07
	p	0.04	
	EE	0.26	

M1, M2 y M3: periodos de muestreo (M1: de 1 a 15 d del experimento, M2: de 15 a 30 d del experimento y M3: de 30 a 45 d del experimento. T0= Sin suplementación con *Saccharomyces cerevisiae*, T1= 5 x10⁸ UFC T2= 20 x10⁸ UFC, T3= 35 x10⁸ UFC y T4= 50 x10⁸ UFC *S. cerevisiae*. ^{a, b, c}: Distinta literal en columna y por muestreo indican diferencias (p <0.05). EE= error estándar.

Las concentraciones de arsénico determinadas en los muestreos y por tratamiento resultaron por arriba de los niveles permisibles establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010 (0.2 mg kg^{-1}), así como de los niveles obtenidos en zonas cercanas al área de estudio (0.029 a $0.038 \text{ mg de As kg}^{-1}$ leche), reportados por Castro-González *et al.* (2018). Los estudios desarrollados por Condori y Málaga (2021) reportaron también concentraciones inferiores de arsénico en leche (0.091 mg kg^{-1}) a los de esta investigación, lo cual sugiere mayor contaminación en la zona estudio por la cercanía con la industria textil Lavartex- Tavex y cerámica Keramika-Porcelanite.

La variabilidad de los metales pesados en leche en los diferentes muestreos se relaciona con el posible daño crónico de estos en los sitios de absorción, en su paso por el intestino delgado. Sharaf *et al.* (2020) observaron un incremento de células inflamatorias mononucleares en intestino de vacas provenientes de zonas contaminadas con metales pesados, así como daño en riñón e hígado. De igual forma, Sevcikova *et al.* (2011) y Lee *et al.* (2012) señalan el daño generado por este tipo de contaminantes mediante la generación de radicales libres, los cuales se relacionan con un estrés oxidativo, daño celular e incremento de carcinogénesis

Así mismo este efecto predispone la alteración de la homeostasis y permeabilidad intestinal, aumentando la absorción de metales en función del daño (Camilleri, 2019). Además, las variaciones en la composición química de la alimentación durante el experimento pudieron propiciar cambios en la calidad de la leche, esto sugiere también variaciones en el contenido de grasa, que a su vez altera las concentraciones de metales pesados en la leche. Van Leeuwen y Pinheiro (2001) indican que una de las rutas de ingreso/internalización de metales a los organismos se debe a la formación de complejos lipofílicos. Zhou *et al.* (2019) concluye que existe correlación positiva entre el As en leche con el ensilaje y el agua, aunque la correlación puede cambiar entre metales pesados y la matriz de excreción a evaluar en este fenómeno coincide con los resultados obtenidos en esta investigación, donde la presencia de As también se vio reflejados en leche.

5. 4. 3 Excreción de plomo en orina y heces

La excreción de plomo en orina fue diferente ($p < 0.05$) entre tratamientos en los periodos de muestreo evaluados (Cuadro 22). En el primer muestreo (M1) el T0 registró la mayor ($p < 0.05$) concentración de Pb en comparación con T1 y T3, pero fue igual a T2 y T4. Durante el segundo muestreo (M2), el T0 tuvo los niveles más altos ($p < 0.05$) de Pb en comparación con T1, T2 y T4, pero sin diferencia con T3. En el último muestreo (M3), el T2 presentó el nivel más bajo ($p < 0.05$) de Pb en orina con respecto al resto de los tratamientos.

Cuadro 22. Biosorción de *Saccharomyces cerevisiae* en tubo digestivo de ganado lechero y su efecto en la excreción de plomo en orina.

		Pb, mg kg ⁻¹	Rango muestral
M1	T0	0.32 ^a	27.21
	T1	0.07 ^{bc}	12.79
	T2	0.14 ^{abc}	18
	T3	0.02 ^c	10
	T4	0.21 ^{ab}	22
	p	0.007	
	EEM	0.02	
M2	T0	0.34 ^a	27.43
	T1	0.04 ^{bc}	11.71
	T2	0.03 ^c	10
	T3	0.32 ^{ab}	25
	T4	0.09 ^{bc}	15.86
	p	0.002	
	EEM	0.03	
M3	T0	0.268 ^a	22.43
	T1	0.26 ^a	19.43
	T2	0 ^b	7.5
	T3	0.225 ^a	20.29
	T4	0.368 ^a	20.36
	p	0.038	
	EEM	0.04	

M1, M2 y M3: periodos de muestreo (M1: de 1 a 15 d del experimento, M2: de 15 a 30 d del experimento y M3: de 30 a 45 d del experimento. T0= Sin suplementación con *Saccharomyces cerevisiae*, T1= 5 x10⁸ UFC T2= 20 x10⁸ UFC, T3= 35 x10⁸ UFC y T4= 50 x10⁸ UFC *S. cerevisiae*. ^{a, b, c}: Distinta literal en columna y por muestreo indican diferencias (p <0.05). EE= error estándar.

La excreción de plomo en heces (Cuadro 23) durante el primer periodo de muestreo, evidenció mayor ($p < 0.05$) concentración de Pb en el T2 con respecto al resto de los tratamientos. En el segundo muestreo, también el T2 tuvo el nivel más alto ($p < 0.05$) de este metal pesado comparado con T1 y T3, pero resultó similar a T0 y T4. En el tercer muestreo (M3), el T0 presentó el nivel más alto ($p < 0.05$) de Pb al compararse con T2 y T3, pero fue similar a T1 y T4.

Cuadro 23. Biosorción de *Saccharomyces cerevisiae* en tubo digestivo de ganado lechero y su efecto en la excreción de plomo en heces.

		Pb, mg kg ⁻¹	Rango muestral
M1	T0	0.54 ^b	14.57
	T1	0.07 ^b	16.21
	T2	5.96 ^a	27.93
	T3	0 ^b	12.5
	T4	1.38 ^b	16.08
	p	0.003	
	EEM	0.50	
M2	T0	2.82 ^{ab}	22.93
	T1	1.27 ^b	13.86
	T2	3.39 ^a	25.36
	T3	0.15 ^b	8.57
	T4	2.65 ^{ab}	19.29
	p	0.01	
	EEM	0.34	
M3	T0	3.11 ^a	25.43
	T1	2.54 ^{ab}	23.29
	T2	0.35 ^{bc}	12.86
	T3	0.01 ^c	10.29
	T4	0.62 ^{abc}	18.14
	p	0.01	
	EEM	0.30	

M1, M2 y M3: periodos de muestreo (M1: de 1 a 15 d del experimento, M2: de 15 a 30 d del experimento y M3: de 30 a 45 d del experimento. T0= Sin suplementación con *Saccharomyces cerevisiae*, T1= 5 x10⁸ UFC T2= 20 x10⁸ UFC, T3= 35 x10⁸ UFC y T4= 50 x10⁸ UFC *S. cerevisiae*. ^{a, b, c}: Distinta literal en columna y por muestreo indican diferencias (p <0.05). EE= error estándar.

La excreción de plomo en orina siempre fue alta (p<0.05) cuando no se incluyó levadura en la dieta del ganado lechero, indicando que algunos tratamientos fueron capaces de

reducir la presencia de este metal pesado en estas muestras (M1, T1 y T3; M2, T1, T2 y T4; M3, T2). Es importante mencionar que las concentraciones determinadas en este estudio superan a las reportadas por Castro-González *et al.* (2021) en muestras de orina de ganado lechero (0.028 mg L⁻¹). También Zaznobina y Ivanova (2019) informan concentraciones menores de plomo (0.020 mg kg⁻¹) en orina de vacas, y a pesar de la baja concentración se destaca un constante consumo de insumos contaminados con metales pesados.

En el mismo sentido, se reporta una máxima sorción de plomo propiciada por *S. cerevisiae* que ocurre a pH 5 y decrece cuando el medio se acerca a la basicidad (Infante *et al.*, 2014; De Rossi *et al.*, 2020). Cuando el pH está cercano a 7, el Pb II precipita a Pb (OH)₂ debido a la concentración de iones OH⁻ (Cabuk *et al.*, 2007). Dada la fisiología de intestino delgado, el pH ácido en la región proximal del duodeno cambia a valores cercanos 6 a medida que avanza el quilo hacia el yeyuno hasta alcanzar un valor cercano a 7.4 en la región terminal del íleon, después disminuye a 5.7 en ciego y vuelve a aumentar a 6.7 en recto (Fallingborg, 199). Con estos cambios de pH en el intestino, la biosorción de Pb puede ser variable y poco representativa, aunque la razón de su excreción en heces se debió al tránsito y sobrevivencia de la levadura a su paso por el tubo digestivo (Cuadro 12). Además, el efecto de biosorción también puede ser observado aun cuando el paso de la levadura por el tubo digestivo sea transitoria y no colonizadora (Baumler y Sperandio, 2016), como ocurre con *S. cerevisiae* (Cuadro 24 vs 25). Lo anterior también explica la constante excreción de plomo en heces ya que la formación de complejos insolubles a su paso por el intestino, no se digieren y aparecen en heces (Hejna *et al.*, 2018). Yabe *et al.* (2018) también enfatizan que la presencia de Pb en heces refleja la exposición a todas las fuentes y representa la parte no absorbida, así como a la excreción endógena biliar. Zhang *et al.* (2012) reportan concentraciones de plomo en heces de 2.81 mg kg⁻¹, similares a algunos datos registrados en esta investigación. En contraste, Wang *et al.* (2013) hallaron valores más altos (8.1mg kg⁻¹) a los del presente estudio.

5. 4. 4 Presencia de plomo en leche

El Cuadro 24 presenta los resultados de la presencia de plomo en leche de ganado bovino suplementado con diferentes niveles de *S. cerevisiae*. No se encontraron diferencias ($p < 0.05$) entre tratamientos en los tres muestreos realizados.

Uno de los factores importantes que afectan la capacidad de sorción de metales por *S. cerevisiae*, es el medio y sus nutrientes (Rodríguez *et al.*, 2008); la presencia de electrolitos interfiere entre los sitios activos y iones metálicos, igualmente la presencia de aniones como sulfatos, cloruros, fosfatos, glutamatos y carbonatos afecta la biosorción de metales por su capacidad para formar complejos (Wang y Chen, 2006). Además, la levadura presenta afinidad por biosorber algunos metales sobre otros, quedando de la siguiente manera: Hg > Zn > Pb > Cd > Co > Ni > Cu (Massoud *et al.*, 2019). Aunado a esto, la capacidad máxima de sorción de Pb con *S. cerevisiae*, en soluciones acuosas se da a pH 5 (Farhan y Khandom, 2015; Moreno y Ramos, 2018). Posiblemente el pH del intestino delgado, tras el aporte de las sales biliares (pH de 7) no contribuye mucho al proceso de biosorción de Pb (Vázquez *et al.*, 2012).

Cuadro 24. Biosorción de *Saccharomyces cerevisiae* en tubo digestivo de ganado lechero y su efecto en la disminución de plomo en leche.

		Pb, mg kg ⁻¹	Rango muestral
M1	T0	0.04 ^a	17.14
	T1	0 ^a	15
	T2	0.27 ^a	20.14
	T3	0.33 ^a	17.86
	T4	0.25 ^a	19.86
	p	0.6	
	EEM	0.08	
M2	T0	0.56 ^a	18.29
	T1	0.29 ^a	21.71
	T2	0.78 ^a	16
	T3	0.95 ^a	16.14
	T4	0.36 ^a	17.86
	p	0.69	
	EEM	0.25	
M3	T0	0.57 ^a	16
	T1	0.48 ^a	15.86
	T2	0.36 ^a	14.36
	T3	0.89 ^a	20.71
	T4	0.93 ^a	20.36
	p	0.60	
	EEM	0.13	

M1, M2 y M3: periodos de muestreo (M1: de 1 a 15 d del experimento, M2: de 15 a 30 d del experimento y M3: de 30 a 45 d del experimento. T0= Sin suplementación con *Saccharomyces cerevisiae*, T1= 5 x10⁸ UFC T2= 20 x10⁸ UFC, T3= 35 x10⁸ UFC y T4= 50 x10⁸ UFC *S. cerevisiae*. ^{a, b, c}: Distinta literal en columna y por muestreo indican diferencias (p <0.05). EE= error estándar.

Las concentraciones de plomo encontradas en las muestras de leche de este estudio resultan superiores al límite máximo permisible en leche establecido por el Codex Alimentarius (0.02 ppm; CODEX, 1995) y a los valores establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010 (0.5 mg kg⁻¹) para el muestreo 2 y 3. Las causas antropogénicas de la contaminación de la leche son varias y todas relacionadas con la industrialización, urbanización y la consecuente contaminación de zonas agrícolas (Boudebouz *et al.*, 2021). Congruente con lo anterior, de Fenta (2014) reporta niveles de Pb de 0.8 mg L⁻¹ en leche producida en zonas irrigadas con efluentes de fábricas textiles en Ethiopia. Asimismo, Zwierzchowsk y Ametaj (2018) reportan concentraciones de plomo en leche de unidades convencionales y comerciales de 0.34 y 0.45 mg L⁻¹, respectivamente. Por su parte, González *et al.* (2018) obtuvieron concentraciones de Pb en leche de 0.059 y 0.041 mg L⁻¹ en dos zonas cercanas al área de nuestro estudio, en el mismo sentido, Zhou *et al.* (2019) mencionan que existe correlación positiva entre el Pb excretado en leche y el ensilado, coincidiendo con los resultados obtenidos en esta investigación, al mismo tiempo, Tahir *et al.* (2017) también sustentan lo anterior indicando un aumento de metales pesados en suelo, forraje, sangre y leche de bovinos al inicio y durante verano añadiendo que el aumento también se debe a las actividades industriales en las zonas, por su parte Castro *et al.* (2016) mencionan que la presencia de metales pesados en leche implica riesgo a la salud, principalmente para los niños, ya que es el sector de la población que consume más este producto.

5.5 Índice de contaminación por metales pesados (HMI)

Se determinó el índice de contaminación en matriz leche obteniendo resultados promedio para As de 38.9 y para Pb de 20.2, basado en la categorización expuesta por Nnabugwu y Uchenna (2019), estos índices indican “muy alta contaminación” por metales pesados. Ismail *et al.* (2015) reportan moderada contaminación de Pb en leche con valores de 1.47 HMI. En otros estudios realizados en la región de Nitra, Eslovaquia, se reporta en leche concentraciones de 3.8 mg de Pb L⁻¹ y un HMI de 7.6 (Capcarova *et al.*, 2019); asimismo, en zonas rurales de Pakistán se determinaron 2.24 mg de Pb L⁻¹ de leche y un HMI de 4.48 (Iftikhar *et al.*, 2014), los resultados de ambos estudios son superiores a los de esta investigación.

Asimismo, Condori y Málaga (2021) y Örün *et al.* (2021) hallaron niveles de As en leche que corresponden a un HMI de 0.9 y 1.49, respectivamente, los cuales se relacionan con una contaminación moderada, según la escala de Nnabugwu y Uchenna (2019). Con los datos de la investigación realizada por Castro-González *et al.* (2017) en zonas aledañas a la del presente estudio, se calculó el HMI para Pb y As en leche encontrando índices más bajos (0.06 y 1.2, para As y Pb, respectivamente) relacionándose con una contaminación baja y moderada. En este sentido, los resultados del HMI determinados en el presente estudio para As y Pb en la zona, indican efecto acumulativo de estos metales pesados y su efecto residual en el ganado que se alimenta de piensos producidos en la región, al compararse con el HMI calculado con los datos de Castro-González *et al.* (2017).

VI. CONCLUSIÓN

El ensayo *in vitro* de viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* muestran sobrevivencia en barrera ruminal, acida y biliar, indicando la capacidad probiótica de la levadura para llegar a tubo digestivo posterior. Asimismo, las pruebas de biosorción *in vitro* evidenciaron la capacidad de la levadura de remover metales pesados en medio ácido y alcalino, con poca eficiencia en medio ruminal.

La cepa *Saccharomyces cerevisiae* disminuye las concentraciones de As en leche gradualmente cuando se adicionan 50 g de Sc animal⁻¹ d⁻¹ (50 x10⁸ UFC animal⁻¹), aumentando su excreción en heces. La levadura no tuvo capacidad para disminuir Pb en leche debido a las condiciones cambiantes en tubo digestivo las cuales no coinciden a las ideales para su sorción.

Con base al HMI se evidenció que existe alto índice de contaminación en la zona de estudio y los niveles de metales detectados en leche, planta y agua superan los niveles máximos permisibles establecidos en normas nacionales e internacionales, pudiéndose visualizar un problema público de salud.

VII. LITERATURA CITADA

- Abdel-Halim, S. H., Shehata, A. M. A y El-Shahat, M. F. 2003. Removal of lead ions from industrial waste water by different types of natural materials. *Water Research*. 37(7): 1678-1683.
- Aguilar, U B., Solis, P. J y François, J. 2005. Estudio de la variación de la composición de los polisacáridos contenidos en la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *e-Gnosis*. 3:1-10.
- Aguirre, A. 2003. Obtención de un biopreparado a partir de cepas nativas de levadura para ser utilizado en animales monogástricos. *Universitas Scientiarum. Revista de la Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana*. 8(2): 69-74.
- Ali, R. A. 2020. Removal of heavy metals from aqueous media by biosorption. *Arab Journal of basic and applied sciences*. 27(1): 183-193.
- Alvarado, D. E., Bonilla, C y De león, R. L. 2017. Efecto de *Saccharomyces cerevisiae* y un Manano oligosacárido comercial en la prevención de patologías digestivas en conejos de raza Neozelandés blanco durante la fase de engorde. (Tesis de Licenciatura). Universidad del Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas; Departamento de Zootecnia.
- AOAC. 2005. Association of Official Analytical Chemists, Official methods of analysis of AOAC International. 18th edition. USA. 176 p.
- Arreguín, C. F. I., Moeller, C. G., Escalante, E. V y Rivas, H. A. 2000. El reúso del agua en México. *Hacia la Calidad: Necesidad para el Próximo Milenio. ACODAL A*. 4: 41-52.
- Arcos, J. L., López, R y Hoffman, J. A. 2007. La actividad microbiana en la fermentación ruminal y el efecto de la adición de *Saccharomyces cerevisiae*. Consultado el 10 de octubre de 2020. Obtenido de <http://www.utm.mx/temas/temas-docs/nota3t32.pdf>.
- Arias, J. M., Lara, C., Salgado, R., Torregroza, A. M., y Torregroza, A. C. 2017. Caracterización de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae* para obtener un biopreparado con perfil probiótico. *Bioagro*, 29(3): 197-206.
- Arrieta, A. S., Corredor, W y Vera, J. M. R. 2015. Valoración y cuantificación de metales pesados en carne de cerdo, pescado, pollo y res comercializados en Pamplona Norte de Santander. *Limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 13(2): 163-171.
- Ariño, J. 2010. Integrative responses to high pH stress in *S. cerevisiae*. *Omics: Journal of Integrative Biology*. 14(5): 517-523.
- Auclair, E. 2001. Yeast as an example of the mode of action of probiotics in monogastric and ruminant species. *CIHEAM*. 45-53

- Azhar, M. A y Munaim, M. S. A. 2019. Identification and evaluation of probiotic potential in yeast strains found in Kefir drink samples from Malaysia. *International Journal of Food Engineering*. 15(7).
- Barreiro, A. C y Roche, L. A. 2000. *Diccionario de términos ambientales*. Centro Félix Varela. Ciudad de La Habana, Cuba. 73 pp.
- Baumler, A. J y Sperandio, V. 2016. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*. 535: 85–93.
- Behera, S. S y Ray, R. C. 2021. Bioprospecting of cowdung microflora for sustainable agricultural, biotechnological and environmental applications. *Current Research in Microbial Sciences*. 2: 100018.
- Bera, A. K., Rana, T., Das, S., Bhattacharya, D., Bandyopadhyay, S., Pan, D y Das, S. K. 2010. Ground water arsenic contamination in West Bengal, India: A risk of sub-clinical toxicity in cattle as evident by correlation between arsenic exposure, excretion and deposition. *Toxicology and Industrial Health* 26(10): 709-716.
- Bolan, S., Seshadri, B., Keely, S., Kunhikrishnan, A., Bruce, J., Grainge, I y Naidu, R. 2021. Bioavailability of arsenic, cadmium, lead and mercury as measured by intestinal permeability. *Scientific reports*. 11(1): 1-14.
- Boudebouz, A., Boudalia, S., Bousbia, A., Habila, S., Boussadia, M. I y Gueroui, Y. 2021. Heavy metals levels in raw cow milk and health risk assessment across the globe: A systematic review. *Science of the Total Environment*. 751: 141830.
- Buenfil-Rojas, A. M., Álvarez-Legorreta, T y Cedeño-Vázquez, J. R. 2015. Metals and metallothioneins in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) from a transboundary river between Mexico and Belize. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 68(2), 265-273.
- 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(1-3): 293-300.
- Cáceres, O y García, E. G. 2000. Metodología para la determinación del valor nutritivo de los forrajes tropicales. 23 (2):.87-103.
- Camilleri, M., 2019. Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. *Gut* 68, 1516–1526.
- Capcarova, M., Binkowski, L. J., Stawarz, R., Schwarczova, L y Massanyi, P. 2019. Levels of essential and xenobiotic elements and their relationships in milk available on the Slovak market with the estimation of consumer exposure. *Biological Trace Element Research*, 188(2): 404-411.
- Capdevila, M., Bofill, R., Palacios, Ò y Atrian, S. 2012. State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century. *Coordination Chemistry*. 256:46-62.

- Castro-González, N. P., Moreno-Rojas, R., Calderón-Sánchez, F., Moreno-Ortega, A y Tamariz-Flores, J. V. 2018. Metales pesados en leche de vacas alimentadas con alfalfa producida en suelos irrigados con aguas residuales en Puebla y Tlaxcala, México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*. 9(3): 466-485.
- Castro, M y Rodríguez, F. 2005. Levaduras: probióticos y prebióticos que mejoran la producción animal. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 6(1):26-38.
- Castro-González, N. P., Moreno-Rojas, R., Calderón-Sánchez, F., Escobar-Hernández, R y Barrios-Díaz, B. 2016. Calidad de la leche de vaca en una zona de riego del estado de Puebla. *Revista Biológico-Agropecuaria Tuxpan*. 4(1): 17-24.
- Castro-Gonzalez, N. P., Moreno-Rojas, R., Calderón-Sánchez, F., Moreno-Ortega, A y Juarez-Meneses, M. 2017. Assessment risk to children's health due to consumption of cow's milk in polluted areas in Puebla and Tlaxcala, Mexico. *Food Additives & Contaminants: Part B*. 10(3): 200-207.
- Castro-González, N. P., Calderón-Sánchez, F., Moreno-Ortega, A y Tamariz-Flores, J. V. 2017. Health risks in rural populations due to heavy metals found in agricultural soils irrigated with wastewater in the Alto Balsas sub-basin in Tlaxcala and Puebla, México. *International Journal of Environmental Health Research*. 27(6): 476-486.
- Castro-González, N. P., Calderón-Sánchez, F., Moreno-Rojas, R., Tamariz-Flores, J. V y Reyes-Cervantes, E. 2019. Nivel de contaminación de metales y arsénico en aguas residuales y suelos en la subcuenca del Alto Balsas en Tlaxcala y Puebla, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 35(2): 335-348.
- Castro-González, N. P., Calderón-Sánchez, F., Fuentes, D. M. M. T., Silva, M. S. S y Gonzalez, J. F. E. 2021. Heavy metals in blood, milk and cow's urine reared in irrigated areas with wastewater. *Heliyon*. 7(4): e06693.
- Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B y Velázquez, O. 2009. *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*. 2ª ed. Facultad de Química. UNAM. México.
- Carusso, J. A., Klaue, B. Michalke, B y Rocke, D. M. 2003. Group assessment: elemental speciation. *Ecotox. Environ. Safe*. 56: 32-44.
- Castillo-Olivera, J. O., Guerra-Medina, C. E., Ley-de Coss, A., Montañez-Valdez, O. D., Reyes-Gutiérrez, J. A., Escobar-España, J. C y Posada-Cruz, S. 2018. Respuesta productiva de becerros lactantes suplementados con alimento iniciador más cultivo de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*). *Acta Universitaria*. 28(1): 9-14.
- Céspedes, M. M., Hernández, I y Llópiz, Janer. N. 1996. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 15(2): 75-81.
- Chen, C y Wang, J. 2007. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to lead ion stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74(3): 683-687.

- Cobos, P. M., Yokoyama, M. T. 1995. *Clostridium Parapurificum Var Ruminatium*: colonization and degradation of shrimp carapaces in vitro observed by scanning electron microscopy. The International Livestock Research Institute. 1995:151-162.
- CODEX, S. (1995). Norma general del codex para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos. CODEX STAN 193-1995. 1-48.
- Collins, M. D y Gibson, G. R. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. The American Journal of Clinical Nutrition. 69: 1052–1057.
- Condori, R. G y Málaga, J. 2021. Niveles de plomo y arsénico en leche y pelo de vacas lecheras del valle de Moquegua. Revista de Investigación Agropecuaria Science and Biotechnology. 1(4): 10-17.
- Covarrubias, S. A Cabriales, J. J. P. 2017. Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 33: 7-21.
- Cuberos, E. 2009. Niveles de Cromo y Alteraciones de Salud en una Población Expuesta a las Actividades de Curtiembres en Bogotá, Colombia. Revista de Salud Pública. 11(2): 278–289.
- Danish, M y Chan, K. W. 2016. Milk: Carrier of heavy metals from crops through ruminant body to human beings. J. Chem. Soc. Pak. 38(01): 39.
- Dávila, O. G., Gómez-Bernal, J. M y Ruíz-Huerta, E. A. 2012. Plants and soil contamination with heavy metals in agricultural areas of Guadalupe, Zacatecas, Mexico. Environmental Contamination. 37-50.
- De la Cueva, F., Naranjo, A., Puga, T. B y Aragón, E. 2021. Presence of heavy metals in raw bovine milk from Machachi, Ecuador. Revista de Ciencias de la Vida. 33(1): 21-30.
- De Plata, G. V. 2003. La contaminación de los alimentos, un problema por resolver. Salud UIS. 35(1): 48-57.
- De Rossi, A., Riguetto, C. V., Dettmer, A., Colla, L. M y Piccin, J. S. 2020. Synthesis, characterization, and application of *Saccharomyces cerevisiae*/alginate composites beads for adsorption of heavy metals. Journal of Environmental Chemical Engineering. 8(4): 104009.
- De Souza, G. M., y De Oliveira, M. H y Da Silva, E. 2015. Cadmium toxicity on seed germination and seedling growth of wheat *Triticum aestivum*. Acta Scientiarum. Biological Sciences. 37 (4): 499-504.
- Delgado, S. P., Vera, C y Arenas, C. 2013. Efecto in vitro del cromo (vi) sobre un biomarcador tumoral p53 y daño al adn en hepatocitos murinos. Revista de la Sociedad Química del Perú. 79 (1): 37-46.

- Dogi, C. A., Armando, R., Ludueña, R., De Moreno de LeBlanc, A., Rosa, C. A. R., Dalcerro, A y Cavaglieri, L. 2011. *Saccharomyces cerevisiae* strains retain their viability and aflatoxin B1 binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation. *Food Additives & Contaminants*.28(12): 1705-1711.
- Doležal, P., Doležal, J y Třináctý, J. 2005. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation in dairy cows. *Czech Journal of Animal Science*. 50(11): 503-510.
- Durand-Chaucheyras, F., Fonty, G., Bertin, G., Theveniot, M y Gouet, P. 1998. Fate of Levucell S C I-1077 yeast additive during digestive transit in lambs. *Reprod. Nutr. Dev.* 38: 275-280.
- Durán, M- E. 2016. Estudio del consumo de leche y sus derivados en el municipio de Oaxaca de Juárez, México. *Revista Mexicana de Agronegocios*. 39: 441-450.
- Elghandour, M. M. Y., Tan, Z. L., Abu-Hafsa, S. H., Adegbeye, M. J., Greiner, R., Ugbogu, E. A y Salem, A. Z. M. 2020. *Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic feed additive to non and pseudo-ruminant feeding: a review. *Journal of Applied Microbiology*. 128(3): 658-674.
- El Hassan, S., Newbold, C y Wallace, R. 1993. The effect of yeast culture on rumen fermentation: Growth of the yeast in the rumen and the requirement for viable yeast cells. *Proceedings of the British Society of Animal Production*.1993: 175-175.
- Engwa, G. A., Ferdinand, P. U., Nwalo, F. N y Unachukwu, M. N. 2019. Mechanism and health effects of heavy metal toxicity in humans, Poisoning in the modern world-new tricks for an old dog. *IntechOpen* 10: 77-89.
- Ertugay., N y Bayhan Y. K. 2010. The removal of copper (II) ion by using mushroom biomass (*Agaricus bisporus*) and kinetic modeling. *Desalination*. 255:137–142
- Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Privat, M., Denis, S., Cardot, J. M., Alric, M y Blanquet-Diot, S. 2010. Effect of a New Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strain on survival of Escherichia coli O157:H7 in a Dynamic Gastrointestinal Model. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(3): 1127-1131.
- Fakruddin, M. D., Hossain, M. N y Ahmed, M. M. 2017. Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 17(1): 1-11.
- Falero Alvarado, Y. 2021. Determinación de metales pesados-arsénico, cadmio, mercurio y plomo-en banano orgánico producido en el distrito de Buenos Aires, Valle Alto Piura–Morropón, Piura. (Tesis licenciatura). Universidad Nacional de Piura, Facultad de Ingeniera Industrial, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial e Industrias Alimentarias.
- Fallingborg, J. 1999. Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Danish Medical Bulletin*. 46(3): 183-196.

- Farcasanu, I. C y Ruta, L. L. 2017. Metallothioneins, *Saccharomyces cerevisiae* and Heavy Metals: A Biotechnology Triad?. IntechOpen. 198.
- Farhan, S. N y Khadom, A. A. 2015. Biosorption of heavy metals from aqueous solutions by *Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Industrial Chemistry. 6(2): 119-130.
- Fenta, M. M. 2014. Heavy Metals Concentration in Effluents of Textile Industry, Tikur Wuha River and Milk of Cows Watering on this Water Source, Hawassa, Southern Ethiopia. Research Journal of Environmental Sciences. 8(8): 422.
- Ferrer, A. 2003. Intoxicación por metales. Anales del Sistema Sanitario de Navarra, 26 (1): 141-153.
- Fernández Fernández, E., Martínez-Hernández, J. A., Martínez-Suárez, V., Moreno-Villares, J. M., Collado-Yurrita, L. R., Hernández-Cabria, M y Morán-Rey, F. J. 2015. Documento de Consenso: importancia nutricional y metabólica de la leche. Nutrición Hospitalaria. 31(1): 92-101.
- Fiems, L. O., Cottyn, B. G., Dussert, L y Vanacker, J. M. 1993. Effect of a viable yeast culture on digestibility and rumen fermentation in sheep fed different types of diets. Reprod. Nutr. Dev. 33: 43-49
- Fietto, J. L., Araújo, R. S., Valadão, F. N., Fietto, L. G., Brandão, R. L., Neves, M. J y Castro, I. M. 2004. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. Canadian journal of microbiology. 50(8): 615-621.
- Folch-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F y Robles, A. A. C. 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Revista Latinoamericana de Microbiología. 46(1-2): 24-46.
- Friedrich, T. 2014. La Seguridad Alimentaria: Retos Actuales. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 48(4): 319-322.
- Folch-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F y Robles, A. A. C. 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Revista Latinoamericana de Microbiología. 46(1-2): 24-46.
- Fomina, M y Gadd, G. M. 2014. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. Bioresource Technology. 160: 3-14.
- Fonty, G y Chaucheyras-Durand, F. 2006. Effects and modes of action of live yeasts in the rumen. Biology. 61(6): 741-750.
- Forsberg, C. W. 1977. Effects of heavy metals and other trace elements on the fermentative activity of the rumen microflora and growth of functionally important rumen bacteria. Canadian Journal of Microbiology. 24: 298-306.

- Föstner, U. 1987. Metal Speciation, Separation. Lewis Publishers, Inc., Michigan, USA. Patterson, J.W. and Passino, R. 800 pp.
- Foulkes, E. C. 2000. Transport of toxic heavy metals across cell membranes. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 223(3): 234-240.
- Foulkes, E. C. 1991. Nature of Cd and Hg effects on epithelial amino acid transport in vivo and role of chelators. Toxicology. 69:177-185.
- Fuentes, H. R., Alejo, E. S., Sánchez, M. R., Contreras, J. A. V., Askar, K. A., Turanzas, G. M y Ortíz, J. C. R. 2005. Metales pesados en leche cruda de bovino. Revista Salud Pública y Nutrición. 6(4).
- Galán, E y Romero, A. 2008. Contaminación de suelos por metales pesados. Revista de la sociedad española de mineralogía. 10: 48-60.
- García-García, N., Pedraza-Garciga, J., Montalvo, J., Martínez, M., y Leyva, J. 2012. Evaluación preliminar de riesgos para la salud humana por metales pesados en las Bahías de Buenavista y Los Remedios, Villa Clara, Cuba. Revista Cubana de Química. 24 (2): 126-135.
- García-González, A. 2000. Estudio de la colonización del tracto digestivo de los cerdos Landrace X Duroc por *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- García, D., Lima, L., Ruiz, L., Santana, J y Calderón, P. 2016. Agroecosistemas con probables riesgos a la salud por contaminación con metales pesados. Revista Cubana de Química. 28(1): 378–393.
- García, J. O., Tortajada, J. F. I., Martín, A. O., Andreu, J. L., Conesa, A. C., i Castell, J. G y Vázquez, I. N. 2002. Contaminantes medio-ambientales en la alimentación. Consultado el 16 de marzo de 2021. Obtenido de [http://www.afanion.org/documentos/Contaminantes% 20medioambientales% 20e, \(201a\).](http://www.afanion.org/documentos/Contaminantes%20medioambientales%20e,(201a).)
- Gaxiola, R.A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S. L y G.R. Fink. 1999. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences. 96(4):1480-1485.
- Gawthorne, J. M. 1987. Copper interactions. In Copper in Man and Animals. CRC Press Inc 1: 79–99.
- Ghorbani-Choboghlo, H., Nikaein, D., Khosravi, A. R., Rahmani, R y Farahnejad, Z. 2019. Effect of microencapsulation on *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* viability in the gastrointestinal tract and level of some blood biochemical factors in wistar rats. Iranian Journal of Microbiology. 11(2): 160.

- Giannattasio, S., Guaragnella, N., Côrte-Real, M., Passarella, S y Marra, E. 2005. Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death. *Gene*. 354: 93-8.
- Goering, H. K y Van Soest, P. J. 1972. Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications). *Agricultural Handbook*. USA. 379.
- Gómez, D. A. A y Mejía, O. B. 2005. Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Revista Lasallista de investigación*. 2(1): 38-42.
- Gómez, H. J L. 2015. Inulina como prebiótico para *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium* con potencial probiótico en rumiantes. (Tesis de maestría). Colegio de postgraduados, Montecillo, Texcoco, México.
- González-Salazar, I. G., López-Herrera, M., Monks, S y Pulido-Flores, G. 2015. Presencia de metales pesados en la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo, México. *UNL Digital Commons*. 13: 151-154.
- González-Fernández, M. B., Rodríguez-Valdés R. E y Rodríguez-Gallego, J. L. 2018. Contaminación de un acuífero por metales pesados de origen geogénico: importancia del control geológico e hidrogeológico de los sondeos de captación de aguas. *Geogaceta*. (64): 59-62
- Gougoulas, N., Leontopoulos, S y Makridis, C. 2014. Influence of food allowance in heavy metal's concentration in raw milk production of several feed animals. *Emirates Journal of Food & Agriculture (EJFA)*. 26(9).
- Guadarrama, B. M. E y Galván, F. A. 2015. Impacto del uso de agua residual en la agricultura. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias: CIBA*. 4(7): 2.
- Guzmán, G. I., Sede, V., Buenaventura, P., Cauca, V y Zea, L. 2013. Efecto del plomo sobre la imbibición, germinación y crecimiento de *Phaseolus vulgaris* y *Zea mays*. *Biología Vegetal*. 13(3): 161–167.
- Hadiani, M. R., Khosravi-Darani, K y Rahimifard, N. 2019. Optimization of As (III) and As (V) removal by *Saccharomyces cerevisiae* biomass for biosorption of critical levels in the food and water resources. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 7(2): 102949.
- Hejna, M., Gottardo, D., Baldi, A., Dell'Orto, V., Cheli, F., Zaninelli, M y Rossi, L. 2018. Nutritional ecology of heavy metals. *Animal*. 12(10): 2156-2170.
- Hejna, M., Moscatelli, A., Onelli, E., Baldi, A., Pilu, S y Rossi, L. 2019. Evaluation of concentration of heavy metals in animal rearing system. *Italian Journal of Animal Science*. 18(1): 1372-1384.
- Helmy, E. A., Soliman, S. A., Abdel-Ghany, T. M y Ganash, M. 2019. Evaluation of potentially probiotic attributes of certain dairy yeast isolated from buffalo sweetened Karish cheese. *Heliyon*. 5(5): e01649

- Hohmann, S. 2003. The osmotic stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast stress responses. S. Hohmann and W. Mager. Germany, Springer:121-200.
- Iftikhar, B., Arif, S., Siddiqui, S y Khattak, R. 2014. Assessment of toxic metals in dairy milk and animal feed in Peshawar, Pakistan. Biotechnology Journal International: 883-893.
- INAFED. Sd. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México, estado de Tlaxcala. Consultado el 31 de marzo de 2022. Obtenido de: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM29tlaxcala/municipios/municipios.html>
- INEGI. 2017. Comunicado de prensa num. 127, Aguascalientes, México. Consultado el 13 de octubre de 2020. Obtenido de: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2017/agua2017_Nal.pdf
- INEGI. Marco Geoestadístico, 2020. Consultado el 9 de septiembre de 2021. Obtenido de: https://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/tlax/territorio/div_municipal.aspx?tema=me&e=29
- Infante J, C., De Arco R, D y Angulo M, E. 2014. Removal of lead, mercury and nickel using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Revista MVZ Córdoba. 19(2): 4141-4149.
- IngledeW, W. M. y Jones G. A. 1982. The fate of live brewers yeast slurry in bovine rumen fluid. Journal of the Institute of Brewing. 88: 18-20.
- Iqbal, Z., Abbas, F., Ibrahim, M., Qureshi, T. I., Gul, M y Mahmood, A. 2020. Human health risk assessment of heavy metals in raw milk of buffalo feeding at wastewater-irrigated agricultural farms in Pakistan. Environmental Science and Pollution Research. 27(23): 29567-29579.
- Ismail, A., Riaz, M., Akhtar, S., Goodwill, J. E y Sun, J. 2019. Heavy metals in milk: global prevalence and health risk assessment. Toxin Reviews. 38(1): 1-12.
- Ismail, A., Riaz, M., Akhtar, S., Ismail, T., Ahmad, Z y Hashmi, M. S. 2015. Estimated daily intake and health risk of heavy metals by consumption of milk. Food Additives & Contaminants.8(4): 260-265.
- Jurkovich, V., Brydl, E., Kutasi, J., Harnos, A., Kovacs., P. L., Konyves, Z., Muravolgyi, y H. Febel. 2014. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on the rumen fermentation in sheep fed with diets of different forage to concentrate rations Journal of Applied Animal Research. 42:481-486.
- Khan, Z. I., Ahmad, K., Bayat, A., Mukhtar, M. K y Sher, M. 2013. Evaluation of lead concentration in pasture and milk: A possible risk for livestock and public health. Pakistan Journal of Zoology. 45(1): 79-84

- Kawas, W. R., R. Garcia-Castillo, F., Garza-Cazares, H., Fimbres-Durazo, E., Olivares-Saenz, G., Hernandez-Vidal y Lu, C. D. 2007. Effect of sodium bicarbonate and yeast on productive performance and carcass characteristics of high weight lambs fed finishing diets. *Small Ruminant Research*. 67(2): 157- 163.
- Kazi, T. G., Brahman, K. D., Afridi, H. I., Arain, M. B., Talpur, F. N y Akhtar, A. 2016. The effects of arsenic contaminated drinking water of livestock on its total levels in milk samples of different cattle: risk assessment in children. *Chemosphere*. 165: 427-433.
- Kello, D y Kostial, K. 1977. Influence of age on whole-body retention and distribution of ^{115m} cadmium in the rat. *Environmental Research*. 14: 92–98
- Kratochvil, D., Pimentel, P y Volesky, B. 1998. Removal of trivalent and hexavalent chromium by seaweed biosorbent. *Environmental Science & Technology*. 32(18): 2693-2698.
- Kung Jr, L., Kreck, E. M., Tung, R. S., Hession, A. O., Sheperd, A. C., Cohen, M. A y Leedle, J. A. Z. 1997. Effects of a live yeast culture and enzymes on in vitro ruminal fermentation and milk production of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 80(9): 2045-2051.
- Kutasi, J., Jurkovich, V., Brydl, E., Konyves, L., Tirián, A. E y Bata, Á. 2004. Influence of different *Saccharomyces cerevisiae* strains on the oxygen concentration in the rumen fluid. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 13, 131-134.
- Lara Mantilla, C y Burgos Portacio, Á. 2012. Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 14(1): 31-40.
- Larcher, W. 1995. *Physiological Plant Ecology*. Berlin, Springer-Verlag. 98 pp.
- Lee, J. C., Son, Y. O., Pratheeshkumar, P y Shi, X. 2012. Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free radical biology and medicine*. 53(4): 742-757.
- Lee, J. S., Kacem, N., Kim, W. S., Peng, D. Q., Jo, Y. H., Jung, Y. G., Kim, Y. J y Lee, H. G. 2017. Effects of *Saccharomyces boulardii*-based feed additive on performance, hormone level, diarrhea scoring and fecal microbial population in Holstein calves experiencing heat stress. *Journal of Animal Science*. 95(4): 316-316.
- Lillie, S. H y J. R. Pringle. 1980. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J. Bacteriol*. 143:1384-1394.
- Mager, W. H. y Moradas-Ferreira, P. 1993. Stress response in yeast. *Biochemical Journal*. 290: 1-13.
- Mancilla-Villa, Ó. R., Ortega-Escobar, H. M., Ramírez-Ayala, C., Uscanga-Mortera, E., Ramos-Bello, R. y Reyes-Ortigoza, A. L. 2012. Metales pesados totales y arsénico en el agua para riego de Puebla y Veracruz, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 28(1): 39-48.

- Marques, M. F y H. M. Pinheiro. 2000. pH effects on the removal of Cu²⁺, Cd²⁺ and Pb²⁺ from aqueous solution by waste brewery biomass. *Bioprocess Engineering*. 23: 135-141.
- Marounek, M y Joch, M. 2014. Effects of heavy metals and arsenate on the Ovine rumen fermentation in vitro. *Agricultura Tropica et Subtropica*. 47(3): 106-108.
- Massoud, R., Khosravi-Darani, K., Sharifan, A y Asadi, G. H. 2019. Lead bioremoval from milk by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 22.
- Massoud, R., Khosravi-Darani, K., Sharifan, A., Asadi, G. H y Younesi, H. 2020. The biosorption capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for cadmium in milk. *Dairy*. 1(2): 169-176. Meignanalakshmi, S. 2013. A Preliminary Study on Biosorption of Chromium by Rumen Consortia. *International Journal of Scientific Research*. 2(6): 281-282.
- Meignanalakshmi, S. 2013. A Preliminary Study on Biosorption of Chromium by Rumen Consortia. *International Journal of Scientific Research*. 2(6): 281-282.
- Mejía-Barajas, J. A., Montoya-Pérez, R., Cortés-Rojo, C y Saavedra-Molina, A. 2016. Levaduras Termotolerantes: Aplicaciones Industriales, Estrés Oxidativo y Respuesta Antioxidante. *Información Tecnológica*. 27(4): 03-16.
- Méndez, J. P., Ramírez, C. A. G., Gutiérrez, A. D. R y García, F. P. 2009. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and subtropical Agroecosystems*. 10(1): 29-44.
- Mendoza, J. C. 2010. Biosorción de Cromo, Arsénico y Plomo de soluciones acuosas por cultivos bacterianos en suspensión. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*. 1(2): 67-73.
- Meshref, A. M., Moselhy, W. A y Hassan, N. E. H. Y. 2014. Heavy metals and trace elements levels in milk and milk products. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 8(4): 381-388.
- Minekus, M. 2015. The TNO gastro-intestinal model (TIM), The impact of food bioactives on health. *SpringerOpen*. 5: 37-46.
- Mitsui, K., Yasui, H., Nakamura, N y Kanazawa, H. 2005 Oligomerization of the *Saccharomyces cerevisiae* Na⁺/H⁺ antiporter Nha1p: Implications for its antiporter activity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1720: 125-136
- Mira, N. P., Teixeira, M. C y Sa-Correia, I. 2010. Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide view. *Omics*. 14(5): 525-40.
- Mohebbrad, B., Bonyadi, Z., Dehghan, A. A y Rahmat, M. H. 2019. Arsenic removal from aqueous solutions using *Saccharomyces cerevisiae*: Kinetic and equilibrium study. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. 38(1): 398-402.

- Moradi, R., Nosrati, R., Zare, H., Tahmasebi, T., Sadari, H y Owlia, P. 2018. Screening and characterization of in-vitro probiotic criteria of *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* strains. Iranian journal of microbiology. 10(2): 123.
- Moreno-Rivas, S. C y Ramos-Clamont Montfort, G. 2018. Descontaminación de arsénico, cadmio y plomo en agua por biosorción con *Saccharomyces cerevisiae*. TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas. 21.
- Moreno-Rivas, S. C y Montfort, G. R. C. 2019. Descontaminación de arsénico, cadmio y plomo en agua por biosorción con *Saccharomyces cerevisiae*. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 21(2): 51-68.
- Narendranath, N. V y Power, R. 2005. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. Applied and Environmental Microbiology. 71(5): 2239-2243.
- Nava-Ruíz, C y Méndez-Armenta, M. 2011. Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). Archivos de Neurociencias. 16(3): 140–147.
- Nnabugwu, A. E y Uchenna, A. P. 2019. Swimming pools quality risk assessment for heavy metal deposition and intake via oral and dermal exposure. Environmental analysis, health and toxicology. 34(3).
- Norma oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996. Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales y bienes nacionales.
- Norma Mexicana NMX-AA-051-SCFI-2001. Análisis de agua - Determinación de metales por absorción atómica en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas - método de prueba.
- Norma Mexicana NMX-Y-111-SCFI-2010. Alimentos para animales - muestreo de alimentos balanceados e ingredientes mayores.
- Norma Oficial Mexicana NOM-184-SSA1-2002. Productos y Servicios. Leche, Fórmula Láctea y Producto Lácteo Combinado. Especificaciones Sanitarias.
- Ohgaki, R., Nakamura, N., Mitsui, K y Kanazawa, H. 2005. Characterization of the ion transport activity of the budding yeast Na⁺ /H⁺ antiporter, Nha1p, using isolated secretory vesicles. Biochimica et Biophysica Acta. 1712: 185-196.
- Oliva, M. M. R., Quintana, M. P y Salabarría, R. B. 2008. Componentes de la pared de las levaduras: actividad probiótica.
- Oliveira, T. M., Peres, J. A., Felsner, M. L., & Justi, K. C. 2017. Direct determination of Pb in raw milk by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS) with electrothermal atomization sampling from slurries. Food Chemistry. 229: 721-725.

- OMS. 2006. Guías para la calidad del agua potable. Consultado el 12 de febrero de 2021. Obtenido de: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf
- Ortiz, Á., Reuto, J., Fajardo, E., Sarmiento, S., Aguirre, A., Arbeláez, G y Quevedo-Hidalgo, B. 2008. Evaluación de la capacidad probiótica "in vitro" de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*. *Universitas Scientiarum*. 13(2): 138-148.
- Örün, E., Yalçın, S. S y Aykut, O. 2021. Lead, mercury, and cadmium levels in breast milk and infant hair in the late period of lactation in Ankara, Turkey. *International Journal of Environmental Health Research*. 1-12.
- Peña, A., Sánchez, N. S., Álvarez, H., Calahorra, M y Ramírez, J. 2015. Effects of high medium pH on growth, metabolism and transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 15(2): fou005.
- Pérez, L. Heidy. 2008. Criterios de selección y mecanismos de acción de cepas de levadura para uso como aditivo probiótico en animales. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 42(1-3): 38-45.
- Pérez, G. P. E y Azcona, C. M. I. 2012. Los efectos del cadmio en la salud. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*. 17(3): 199-205.
- Phillips, C. J. C., Mohamed, M. O. 2011. Effects of duration of exposure of dietary lead on rumen metabolism and the accumulation of heavy metals in sheep. *Small Ruminant Research*. 100: 113-121.
- Pinheiro, R. E. E., Rodrigues, A. M. D., Lima, C. E., Santos, J. T. O., Pereyra, C. M., Torres, A. M y Muratori, M. C. S. 2020. *Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic agent and a possible aflatoxin B1 adsorbent in simulated fish intestinal tract conditions. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 72: 862-870.
- Piper, P. W. 1993. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*. 11(4): 339- 356.
- Poschenrieder, Charlotte et al. 2015. El impacto del cromo en el medio ambiente. Consultado el 3 de noviembre de 2018. Disponible en https://www.researchgate.net/profile/Charlotte_Poschenrieder/publication/276955606_El_impacto_del_cromo_en_el_medio_ambiente_II_El_Cr_en_los_organismos_vivos/links/555c923408ae8c0cab2a6061/El-impacto-del-cromo-en-el-medio-ambiente-II-EI-Cr-en-los-organismos-vivos.pdf.
- Prieto-Méndez, J., González-Ramírez, C. A., Román-Gutiérrez, A. D., Prieto-García, F. 2009. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 10(1): 29-44
- Póti, P., Pajor, F., Bodnár, Á y Bárdos, L. 2021. Accumulation of some heavy metals (Pd, Cd and Cr) in milk of grazing sheep in north-east Hungary. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2(1): 389-394.

- Ranjan, D., Talat, M y Hasan, S. H. 2009. Biosorption of arsenic from aqueous solution using agricultural residue 'rice polish'. *Journal of hazardous materials*. 166(2-3): 1050-1059.
- Redha, A. A. 2020. Removal of heavy metals from aqueous media by biosorption. *Arab Journal of Basic and Applied Sciences*. 27(1): 183-193.
- Relling, A. E y Mattioli, G. A. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Argentina: UNLP Editorial Edulp. 23-55.
- Reyes-Toriz, E. D., Cerino-Córdova, F. D. J y Suárez-Herrera, M. A. 2006. Remoción de metales pesados con carbón activado como soporte de biomasa. *Ingenierías*. 9(31): 59-64.
- Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Lagos, M. D y Jiménez, E. E. G. 2016. Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Ingeniería Investigación y Desarrollo*. 16(2): 66-77.
- Rico-Rodríguez, M. Á., Prieto-García, F., Román-Gutiérrez, A. D., Otazo-Sánchez, E. M y Acevedo-Sandoval, O. A. 2013. Caracterización de tres suelos en Hidalgo y Querétaro, México: disponibilidad y daño tóxico por arsénico en garbanzo (*Cicer arietinum* L.). *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. 45(1): 225-246.
- Riyanti, L y Evvyernie, D. 2016. In vitro fermentation characteristics and rumen microbial population of diet supplemented with *Saccharomyces cerevisiae* and rumen microbe probiotics. *Media Peternakan*, 39(1), 40-45.
- Rodríguez, H. D. 2017. Intoxicación ocupacional por metales pesados. *Medisan*. 21(12): 3372-3385.
- Rodríguez, S. C. 2018. *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus oryzae*; Estimuladores y modificadores de la fermentación y crecimiento microbiano ruminal. Artículo de revisión. *Revista producción animal*. 30 (2): 1-9.
- Rodríguez, M. E., Miranda, R. C., Olivas, R y Sosa, C, A. 2008. Efectos de las Condiciones de Operación Sobre la Biosorción de Pb²⁺, Cd²⁺ y Cr³⁺ en Solución por *Saccharomyces cerevisiae* Residual. *Información tecnológica*. 19(6): 47-55.
- Rodríguez, O, M., Pérez, Q. M y Bocourt, S. R. 2008. Componentes de las levaduras: actividad probiótica. Universidad de Matanzas Monografías. P. 9.
- Rodríguez, F. H., Sánchez, A. E., Rodríguez, S. M., Vidales, C. J. A., Acuña, A. K., Martínez, T. G y Rodríguez, O. J. C. 2005. Metales pesados en leche cruda de bovino. *Revista Salud Pública Y Nutrición*. 6(4).
- Rodríguez-Serrano, M., Martínez-De la Casa, N., Romero-Puertas, M.C., Del Río, L. A y Sandalio, L.M. 2008. Toxicidad del Cadmio en Plantas. *Ecosistemas*. 17(3):139-146.

- Romero, F. M., Blanquer, J. G., Díaz, J. G y Mateu, Á. M. 2003. Relación estadística entre metales pesados y propiedades de suelos de cultivo regados con aguas residuales no depuradas. *Interciencia*. 28(5): 281-286.
- Ruis, H. y Schüller, C. 1995. Stress signaling in yeast. *Bioessays*. 17: 959-966.
- Rulkens, W. H., Grotenhuis, J. T. C y Tichý, R. 1995. Methods for Cleaning Contaminated Soils and Sediments. In: Förstner, U., Salomons, W., Mader, P. *Environmental Science*. Springer, Berlin, Heidelberg. H. 165-191.
- Sahmoune, M. N. 2018. Performance of *Streptomyces rimosus* biomass in biosorption of heavy metals from aqueous solutions. *Microchemical Journal*, 141, 87-95.
- Salari, R y Salari, R. 2017. Investigation of the best *Saccharomyces cerevisiae* growth condition. *Electronic Physician*. 9(1): 3592.
- Sanchis, R. A. 2014. Nuevas funciones de Gcn2p en respuesta a estrés ácido y genotóxico, (Doctoral dissertation). Universitat Politècnica de València, España.
- Sánchez-Sánchez, J. A., Álvarez-Legorreta, T., Pacheco-Ávila, J. G., González-Herrera, R. A y Carrillo-Briebiezca, L. 2015. Caracterización hidrogeoquímica de las aguas subterráneas del sur del Estado de Quintana Roo, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*. 32(1): 62-76.
- Satarug, S y Garrett, S., Sens, M y Sens, D. 2011. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Ciência & Saúde Coletiva*. 16 (5): 2587-2602.
- Sevcikova, M., Modra, H., Slaninova, A y Svobodova, Z. 2011. Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Veterinární medicína*. 56(11): 537-546.
- Serrano, R. 1996. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *International review of cytology*. 165:1-52
- Shahbazi, Y., Ahmadi, F y Fakhari, F. 2016. Voltammetric determination of Pb, Cd, Zn, Cu and Se in milk and dairy products collected from Iran: An emphasis on permissible limits and risk assessment of exposure to heavy metals. *Food Chemistry*. 192: 1060-1067.
- Shafaghat, H., Najafpour, G. D., Rezaei, S. P y Sharifzadeh, M. 2010. Optimal growth of *Saccharomyces cerevisiae* (PTCC 24860) on pretreated molasses for ethanol production: Application of response surface methodology. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*. 16(2): 199-206.
- Sharaf, S., Khan, M. U. R., Aslam, A y Rabbani, M. 2020. Comparative Study of Heavy Metals Residues and Histopathological Alterations in Large Ruminants from Selected Areas around Industrial Waste Drain. *Pakistan Veterinary Journal*. 40(1): 55-60.
- Sierra, A. D. 2019. Presencia de metales pesados en la harina de trigo utilizada para la elaboración de alimentos. *Avances de Investigación en Inocuidad de Alimentos*

Consultado el 24 de junio de 2021. Obtenido de: <https://www.semanticscholar.org/paper/Presencia-de-metales-pesados-en-la-harina-de-trigo-Sierra/45749dc8c77fb8db92f76e7c7baa0bc27f65a73fd>

- Simmons, P y Singleton, I. 1996. A method to increase silver biosorption by an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 45(1-2): 278–285.
- Singh, M., Sharma, R., Ranvir, S., Gandhi, K y Mann, B. 2020. Assessment of contamination of milk and milk products with heavy metals. *Indian Journal of Dairy Science*. 72(6): 608-615.
- Singha, S., Pasupuleti, S., Singha, S. S y Kumar, S. 2020. Effectiveness of groundwater heavy metal pollution indices studies by deep-learning. *Journal of Contaminant Hydrology*. 235: 103718.
- Spears, J. W., Lloyd, K. E y Krafska, K. 2017. Chromium concentrations in ruminant feed ingredients. *Journal of Dairy Science*. 100(5): 3584-3590.
- Suárez, J. Y. V. 2017. Bioacumulación de metales pesados en leche de ganado vacuno en el área de influencia del pasivo ambiental de Chahuapampa–Utcuyacu-Catac. *Revista de Investigación Multidisciplinaria CTSCAFE*. 1(3): 20-20.
- Su, C., Liu, H., Qu, X., Zhou, X., Gao, Y., Yang, H y Wang, J. 2021. Heavy metals in raw milk and dietary exposure assessment in the vicinity of leather-processing plants. *Biological Trace Element Research*. 199(9): 3303-3311.
- Tahir, M., Iqbal, M., Abbas, M., Tahir, M. A., Nazir, A., Iqbal, D. N y Younas, U. 2017. Comparative study of heavy metals distribution in soil, forage, blood and milk. *Acta Ecologica Sinica*. 37(3): 207-212.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K y Sutton, D. J. 2012. Heavy Metal Toxicity and the Environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. 133–164.
- Tejada-Tovar, C., Villabona-Ortiz, A y Garcés-Jaraba, L. 2015 Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico. *Tecnológicas*. 18(34):109-123.
- Theodorou M, K., Williams B, A., Dhanoa M, S., Mcallan A, B y France J, A. 1994. Simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 48 (3-4): 185-97.
- Throne, M., Bach, A., Ruiz-Moreno, M., Stern, M. D y Linn, J. G. 2009. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows: Yeast supplementation on rumen fermentation. *Livestock Science*. 124(1-3): 261-265.

- Tirado, L. R., González-Martínez, F. D., Martínez, L. J., Wilches, L. A y Celedón-Suárez, J. N. 2015. Niveles de metales pesados en muestras biológicas y su importancia en salud. *Revista Nacional de Odontología*. 11(21):83-99.
- Unión Europea. 2005. Reglamento (CE) No 2005/87 de la comisión de 5 de diciembre de 2005 por la que se modifica el anexo I de la Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre sustancias indeseables en la alimentación animal, en lo referente al plomo, el flúor y el cadmio. *Diario Oficial de la Unión Europea*.
- Unión Europea. 2006. Reglamento (CE) No 1881/2006 de la comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*.
- Unión Europea. 2016. Reglamento (UE) No 2016/582 de la Comisión de 15 de abril de 2016. *Diario Oficial de la Unión Europea*.
- UV. 2009. Superficies sólidas: adsorción y catálisis heterogénea. Consultado el 24 de Febrero de 2021. Obtenido de: http://ocw.uv.es/ciencias/3-2/tema_7_parte_1_ads_completa.pdf
- Tun-Canto, G. E., Álvarez-Legorreta, T., Zapata-Buenfil, G y Sosa-Cordero, E. 2017. Metales pesados en suelos y sedimentos de la zona cañera del sur de Quintana Roo, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*. 34(3): 157-169.
- Tur-Naranjo, Enieyis., Orberá-Ratón, T., Romagosa-Álvarez, Y y Pérez-Silva, R. 2013. Bioadsorción de plomo (II) por biomasa microbiana seca: Efecto del pH. *Revista Cubana de Química*. 25(1):75-81.
- Van Der Aa Kühle, A., Skovgaard, K y Jespersen, L. 2005. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International journal of food microbiology*. 101(1): 29-39.
- Van Leeuwen, H. P y Pinheiro, J. P. 2001. Speciation dynamics and bioavailability of metals. Exploration of the case of two uptake routes. *Pure and Applied Chemistry*. 73(1): 39-44.
- Vásquez C., María, R. G., Lira, M. B., Cueva, M. S., Ayón, S. M y Mallma, D. Yenny. 2012. Ph de la superficie luminal de la mucosa gastrointestinal de crías de alpacas durante las primeras semanas de edad. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 23(1): 20-26.
- Vásquez, V. V., Rojas, P. C., Luján V. M., Cholán, R. M., Mercedes C. L y Vásquez, A. J. 2019. Evaluación de digestibilidad proteica in vivo e in vitro utilizando *Saccharomyces cerevisiae* (Saccharomycetaceae) como organismo modelo. *Arnaldoa*. 26(3): 1125-1142.

- Vera, L., Uguña, M. F., García, N., Flores, M., Vázquez, V y Aloma, I. 2016. Desarrollo de materiales sorbentes para la eliminación de metales pesados de las aguas residuales mineras. *Afinidad*. 73(574): 135-139.
- Vijver, M. G., Van Gestel, C. A., Lanno, R. P., Van Straalen, N. M y Peijnenburg, W. J. 2004. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: a review. *Environmental science & technology*. 38(18): 4705-4712.
- Villanueva, S y Botello, A. V. 1992. Metales pesados en la zona costera del Golfo de México y Caribe Mexicano: una revisión. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 8(1): 47-61.
- Villot, C., Ma, T., Renaud, D. L., Ghaffari, M. H., Gibson, D. J., Skidmore, A y Steele, M. A. 2019. *Saccharomyces cerevisiae* boulardii CNCM I-1079 affects health, growth, and fecal microbiota in milk-fed veal calves. *Journal of dairy science*. 102(8): 7011-7025.
- Wadskog, I y Adler, L. 2003. Ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* under NaCl stress. En *Yeast Stress Responses*. Ed. Hohmann, S. and Mager W.H. 201-440 pp.
- Wang, H., Dong, Y., Yang, Y., Toor, G. S y Zhang, X. 2013. Changes in heavy metal contents in animal feeds and manures in an intensive animal production region of China. *Journal of Environmental Sciences*. 25(12): 2435-2442.
- Wang, J y Chen, C. 2006. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Biotechnology Advances*. 24(5): 427-451.
- Werner-Washburne, M. B. E., Johnston, G. C y Singer, R. A. 1993. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*. 57:383-401
- Wilkinson, J. M., Hill, J y Phillips, C. J. 2003. The accumulation of potentially-toxic metals by grazing ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*. 62(2): 267-77.
- Winpenny, J., Heinz, I., Koo-Oshima, S., Salgot, M., Collado, J., Hernandez, F y Torricelli, R. 2010. The wealth of waste: the economics of wastewater use in agriculture. *Water Reports*. (35): 129 pp.
- Wu, Y., Wen, Y., Zhou, J., Dai, Q y Wu, Y. 2012. The characteristics of waste *Saccharomyces cerevisiae* biosorption of arsenic (III). *Environmental Science and Pollution Research*. 19(8): 3371-3379.
- Wysocki, R. C., Wawrzycka, D. V., Cornelis, R. T y Tamás, M. J. 2001. The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*. 40(6): 1391-1401.
- Wysocki, R y Tamás, M. J. 2010. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS Microbiology Reviews*. 34(6): 925-951.

- Yabe, J., Nakayama, S. M., Ikenaka, Y., Yohannes, Y. B., Bortey-Sam, N., Kabalo, A. N y Ishizuka, M. 2018. Lead and cadmium excretion in feces and urine of children from polluted townships near a lead-zinc mine in Kabwe, Zambia. *Chemosphere*. 202: 48-55.
- Yasothea, A., Dabadé, D. S., Singh, V. P y Sivakumar, T. 2021. Risk assessment of heavy metals in milk from cows reared around industrial areas in India. *Environmental geochemistry and health*. 43(5): 1799-1815.
- Zahoor, F., Sooklim, C., Songdech, P., Duangpakdee, O y Soontorngun, N. 2021. Selection of Potential Yeast Probiotics and a Cell Factory for Xylitol or Acid Production from Honeybee Samples. *Metabolites*. 11(5): 312.
- Zaanouni, N., Gharssallaoui, M., Eloussaief, M y Gabsi, S. 2018. Heavy metals transfer in the olive tree and assessment of food contamination risk. *Environmental Science and Pollution Research*. 25(19): 18320-18331.
- Zaznobina, T. V y Ivanova, O. V. 2019. The content of heavy metals in cows of different breeds. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 341(1): 012073..
- Zhang, F., Li, Y., Yang, M y Li, W. 2012. Content of heavy metals in animal feeds and manures from farms of different scales in northeast China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 9(8): 2658-2668.
- Zhou, X. 2019. Heavy metals in Chinese raw cow milk: spatial distribution and relationships with silage and environmental factors. (Doctoral dissertation). Université de Liège, Liège, Belgique.
- Zhou, X., Zheng, N., Su, C., Wang, J y Soyeurt, H. 2019. Relationships between Pb, As, Cr, and Cd in individual cows' milk and milk composition and heavy metal contents in water, silage, and soil. *Environmental Pollution*. 255: 113322.
- Ziarati, P., Shir Khan, F., Mostafidi, M y Zahedi, M. T. 2018. An overview of the heavy metal contamination in milk and dairy products. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*. 2(7): 1-14.
- Zwierzchowski, G y Ametaj, B. N. 2018. Minerals and Heavy Metals in the whole raw milk of dairy cows from different management systems and countries of origin: A meta-analytical study. *Journal of agricultural and food chemistry*. 66(26): 6877-6888.
- 2005/87/EC: Commission directive. Official journal of the European Union.

