



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Potencial de bacterias aisladas de fermento de cacao para remoción de cadmio y arsénico

Claudia Milena Rodríguez López

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias, IBUN. Instituto de biotecnología
Bogotá, Colombia

2019

Potencial de bacterias aisladas de fermento de cacao para remoción de cadmio y arsénico

Claudia Milena Rodríguez López

Tesis o trabajo de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias - Microbiología

Director:

Pedro Filipe de Brito Brandão, Ph.D.

Codirectora:

Elianna Castillo Serna, Ph.D.

Línea de Investigación:

Microbiología Ambiental y Aplicada

Grupo de Investigación:

Grupo de Estudios para la Remediación y Mitigación de Impactos Negativos al Ambiente
(GERMINA)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN)

Bogotá, Colombia

2019

“We must have perseverance and above all confidence in ourselves. We must believe that we are gifted for something and that this thing must be attained” – Marie Curie

A mi familia.

Agradecimientos

A mi familia, ya que me dieron la fuerza necesaria para no rendirme ante las adversidades.

Al profesor Pedro Brandão por sus sabios consejos de vida, apoyo incondicional y por su amistad. Porque sin su experiencia y guía no habría sido posible el desarrollo de este trabajo. A la profesora Elianna Castillo por sus aportes que ayudaron a fortalecer la discusión, y por su apoyo y consejos.

Al grupo de investigación GERMINA “Grupo de Estudios para la Remediación y Mitigación de Impactos Negativos al Ambiente”, quienes con sus aportes y críticas ayudaron a mejorar este trabajo. Especialmente agradezco a María Camila Lara, Ana María Guzmán y Edison Rodríguez, quienes participaron como semillero de investigación y Trabajo de Grado, y apoyaron el desarrollo de experimentos bajo la dirección de los profesores Pedro Brandão y la profesora Elianna Castillo.

A los jurados de este trabajo: Daniel Augusto Bravo Benavides y Olga Ines Montoya Campuzano por haber revisado este trabajo y por sus valiosas apreciaciones que ayudaron a enriquecer este documento.

A Héctor Hugo Olarte, María José Chica y Jenny Lorena Aguirre del área de investigación y desarrollo de *Luker Chocolate*, por sus enseñanzas y apoyo durante el desarrollo de este trabajo. A Martha Lucía Cepeda, asesora de *Luker Chocolate*, por su ayuda para el trámite de los permisos correspondientes.

A la empresa *Luker Chocolate*, por permitir acceso y la toma de las muestras, y por el acceso a las cepas de referencia utilizadas en este trabajo.

A la Universidad Nacional de Colombia, lugar en el cual se desarrolló el trabajo, y a la División de Investigación sede Bogotá (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia, por apoyo financiero al proyecto (código: DIB 37643).

Al Ministerio del Ambiente y Desarrollo Sostenible por otorgar un Contrato de Acceso a Recurso Genéticos mediante la resolución 0699 del 26 de abril del 2018, amparado por el otrosí No. 5 al Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados, para la ejecución de las actividades que permitieron el desarrollo de este estudio.

Al Grupo de investigación en tecnología de productos naturales – TECPRONA del departamento de farmacia de la Universidad Nacional de Colombia y al estudiante de doctorado Juan José Carrascal Sánchez, por el acceso a las cepas de referencia utilizadas en los ensayos de catalasa y oxidasa.

Resumen

En este trabajo se evaluó el potencial de bacterias ácido lácticas, aisladas de fermento de cacao, para remover cadmio y arsénico en condiciones *in vitro* de pH ácido y concentraciones de sales biliares que simulan el sistema digestivo humano, como un primer paso para comprobar su potencial en futuras aplicaciones de detoxificación. Para esto, primero se realizó el aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* spp., que crecen en presencia de cadmio y a arsénico (en su forma arsenito) a partir de fermento de cacao, tomado con la colaboración de la empresa *Luker Chocolate*, obteniendo un total de 38 *Lactobacillus* spp. Posteriormente, se seleccionaron las bacterias que crecen ante mayores concentraciones de cadmio y de arsénico mediante ensayos de Concentración Mínima Inhibitoria, así, como las que tienen mayor tolerancia a las condiciones *in vitro* de pH ácido y sales biliares. Con estos tres criterios fueron seleccionados los aislados de *L. plantarum* A19, *L. plantarum* C16 y la cepa de referencia *L. plantarum* JCM 1055. Estas fueron evaluadas por la capacidad de remoción de cadmio y arsénico en un medio acuoso. Se realizó un diseño experimental factorial 2^3 en el cual se evaluó el efecto de 3 variables sobre la capacidad de remoción de cadmio de las tres bacterias y un diseño experimental factorial 2^2 para el caso del arsénico. Se encontraron porcentajes de remoción de cadmio de hasta 100% (empleando 1 mg/L de cadmio, a pH 5 y a una concentración de biomasa de 1,5 g/L) con los *L. plantarum* evaluados (JCM 1055, A19 y C16), y de arsénico de 20% con *L. plantarum* C16 (empleando 0,1 mg/L de arsénico, pH 5 y concentración de biomasa de 1,5 g/L). Finalmente, se evaluó la capacidad de estas bacterias para disminuir la bioaccesibilidad de cadmio y arsénico en condiciones *in vitro* que simulan el sistema digestivo humano, utilizando el modelo RIVM (*Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu*). Se encontró una disminución del porcentaje de bioaccesibilidad de cadmio del 56% y de arsénico hasta en un 62% con el aislado nativo *L. plantarum* A19. Esta capacidad de disminución de la bioaccesibilidad, sugiere su posible capacidad de disminuir la biodisponibilidad de cadmio y de arsénico en modelos *in vivo*

(animales). Futuros estudios permitirán explorar el potencial de aplicación de los microorganismos evaluados en los procesos biotecnológicos de remoción o de detoxificación de estos elementos tóxicos en sistemas *in vivo*.

Palabras clave: Lactobacilos, cacao fermentado, aislamiento, metal, metaloide, bioaccesibilidad, modelo RIVM, sistema digestivo.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the potential of lactic acid bacteria, isolated from fermented cacao, to remove cadmium and arsenic under *in vitro* conditions of acidity and salinity that simulate the human digestive system, in order to verify their potential in future detoxification applications. The first step was the isolation and identification of lactic acid bacteria of the *Lactobacillus* spp. genera resistant to cadmium and arsenic (in its arsenite state) from fermented cacao, obtaining a total of 38 strains. Then, the bacteria most resistant to cadmium and arsenic were selected by tests of Minimum Inhibitory Concentration, and from this pool were selected the most tolerant to *in vitro* conditions of acidity and salinity. With these criteria the reference strain *L. plantarum* JCM 1055 and the native isolates *L. plantarum* A19 and *L. plantarum* C16 were selected for further analysis. These were evaluated for their cadmium and arsenic removal capacity in aqueous media. An experimental design 2^3 was carried out in order to evaluate the effect of 3 variables on the cadmium removal capacity of the three strains and an experimental design 2^2 was carried out for arsenic. Removal percentages up to 100% were obtained for cadmium (using 1 mg/L of cadmium, pH 5 and biomass concentration of 1.5 g/L) with the three evaluated bacteria. For arsenic, the best removal percentage obtained was 20% with *L. plantarum* C16 (using 0.1 mg/L of arsenite, pH 5 and biomass concentration of 1.5 g/L). Finally, the capacity of these bacteria to decrease the bioaccessibility of cadmium and arsenic was evaluated in *in vitro* conditions that simulate the human digestive system, using the RIVM (*Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu*) model. Using the native isolate *L. plantarum* A19, the cadmium bioaccessibility was reduced to 56%, while for arsenite it was reduced to 62%. This capacity to decrease bioaccessibility suggests its possible ability to decrease the bioavailability of cadmium and arsenite in *in vivo* models (animals). Future studies will allow exploring the potential application of these microorganisms in biotechnological removal or detoxification processes.

Keywords: Lactobacilli, fermented cacao, isolation, metal metalloid, bioaccessibility, RIVM model, digestive system.

Contenido

	Pág.
Lista de figuras.....	XV
Lista de tablas	XVIII
Lista de Símbolos y Abreviaturas	XIX
Introducción	1
1. Capítulo 1. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas que crecen en medios con cadmio o arsénico a partir de fermento de cacao	1
1.1 Resumen	1
1.2 Introducción	2
1.3 Materiales y Métodos.....	5
1.3.1 Tramites pre-colecta.....	5
1.3.2 Muestreo	5
1.3.3 Aislamiento y selección	7
1.3.4 Criopreservación	10
1.3.5 Identificación molecular.....	11
1.4 Resultados.....	12
1.4.1 Aislamiento y selección	12
1.4.2 Identificación molecular.....	13
1.5 Discusión	17
1.6 Conclusiones	20
2. Capítulo 2. Selección de bacterias con mayor potencial para ensayos de remoción en condiciones <i>in vitro</i> del sistema digestivo humano	23
2.1 Resumen	23
2.2 Introducción	24
2.3 Materiales y Métodos.....	26
2.3.1 Microorganismos evaluados.....	26
2.3.2 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de cadmio y de arsénico	26
2.3.3 Ensayos de tolerancia a pH ácido	27
2.3.4 Ensayos de tolerancia a sales biliares.....	28
2.4 Resultados.....	28
2.4.1 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de cadmio y de arsénico	28
2.4.2 Ensayos de tolerancia a pH ácido	31
2.4.3 Ensayos de tolerancia a sales biliares.....	32
2.5 Discusión	33
2.6 Conclusiones	35
3. Capítulo 3. Ensayos de remoción de cadmio y arsénico con tres cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> utilizando un modelo <i>in vitro</i> que simula el sistema digestivo humano.....	36

3.1	Resumen.....	36
3.2	Introducción.....	37
3.3	Materiales y Métodos	43
3.3.1	Determinación de las curvas de crecimiento.....	43
3.3.2	Determinación de la relación Biomasa Seca con OD ₆₀₀	43
3.3.3	Evaluación de la capacidad de remoción de cadmio y de arsénico.....	44
3.3.4	Evaluación de la capacidad de remoción de cadmio y de arsénico en un modelo <i>in vitro</i> del sistema digestivo humano	46
3.4	Resultados	48
3.4.1	Determinación de las curvas de crecimiento.....	48
3.4.2	Determinación de la relación Biomasa Seca con OD ₆₀₀	48
3.4.3	Evaluación de la capacidad de remoción de cadmio y de arsénico.....	49
3.4.4	Evaluación de la capacidad de remoción de cadmio y de arsénico en un modelo <i>in vitro</i> del sistema digestivo humano	57
3.5	Discusión.....	60
3.6	Conclusiones.....	64
4.	Capítulo 4. Discusión final, Conclusiones y Perspectivas.....	65
4.1	Discusión final	65
4.2	Conclusiones.....	67
4.3	Perspectivas.....	68
A.	Anexo: Protocolo de preparación de medios bajo condiciones de aerotolerancia	71
B.	Anexo: Protocolo de extracción de ADN genómico por método enzimático	73
C.	Anexo: Protocolo de amplificación de la región V4 y V5 del gen 16S rRNA por PCR (reacción en cadena de la polimerasa)	75
D.	Anexo: Protocolo de amplificación del gen 16S rRNA por PCR (reacción en cadena de la polimerasa)	77
E.	Anexo: Protocolo de extracción de ADN genómico por método mecánico	79
F.	Anexo: Gráficas de crecimiento de <i>Lactobacillus</i> spp. a diferentes concentraciones de cadmio y arsénico.....	80
	Bibliografía	83

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1 Esquema de rutas metabólicas de fermentación de las BALs. (A) Homofermentativa y (B) Heterofermentativa (tomado y adaptado de Kumar et al., 2015).....	3
Figura 1-2 Mapa con la ubicación del sitio de muestreo (Granja Luker, Palestina, Caldas, Colombia) (tomado de: https://es.wikipedia.org/wiki/Caldas#/media/File:Colombia_-_Caldas.svg y www.google.com.co/maps).....	5
Figura 1-3 Mazorcas de cacao de las variedades ICS 1, LUKER 40, TSH 565, FSV 41, ICS 39, FTA 2, ICS 60, FEAR 5, CCN 51 y FSA 13, utilizadas en el proceso de fermentación del cual se realizó el muestreo para aislamiento de los microorganismos de interés en este trabajo.....	6
Figura 1-4 Cajones de fermentación de cacao durante el proceso de volteo que consiste en: (A) la mezcla de granos de cacao y (B) traslado de granos a otro cajón de fermentación.....	6
Figura 1-5 Frascos Schott con muestras de fermento de cacao en NaCl 0,85% p/v tomadas a las (A) 48 h, (B) 72 h, y (C) 120 h del proceso de fermentación.....	7
Figura 1-6 Observación del cambio de coloración de morado a amarillo en el sitio de crecimiento de colonias en el medio de cultivo MRS $\frac{1}{2}$ -As o MRS $\frac{1}{2}$ -Cd con un indicador de pH (púrpura de bromocresol 0,017% p/v).....	8
Figura 1-7 Observación bajo microscopio óptico (x100) de bacterias teñidas por tinción de Gram, con morfología de bacilos con color violeta (aislado A04).....	9
Figura 1-8 Observación de resultados positivos (+) y negativos (-) utilizando las cepas control en las pruebas bioquímicas de (A) actividad de catalasa y (B) actividad de oxidasa.....	14
Figura 1-9 Análisis de SSCP mostrando perfiles electroforéticos de la región parcial V4-V5 del gen 16S rRNA de 32 bacterias con las cuales se realizó extracción de ADN genómico por método enzimático.....	13

Figura 1-10	Análisis filogenético basado en las secuencias del gen 16S rRNA de BALs representantes de los perfiles electroforéticos, con sus respectivos códigos de acceso de GenBanK (Tabla 1-3). Se incluyen cepas de referencia para cada especie indicadas con ** y como outgroup fue incluida la secuencia de una cepa de <i>E. coli</i> , con código J01859.....	15
Figura 2-1	Crecimiento de cepas de trabajo en los medios de cultivo MRS $\frac{1}{2}$ suplementados con diferentes concentraciones de (A) Cd(II) (0 a 100 mg/L) y (B) As(III) (0 a 300 mg/L). Las bacterias fueron agrupadas de acuerdo a la similitud de comportamiento de las curvas de OD595 vs concentración de metal(oide).....	28
Figura 2-2	Relación de UFC/mL de <i>Lactobacillus</i> spp. antes y después del contacto con buffer PBS ácido (pH 2,5).....	29
Figura 2-3	Crecimiento (UFC/mL) de <i>Lactobacillus</i> spp. aislados y cepa de referencia, en medio de cultivo con diferentes concentraciones de sales biliares.....	30
Figura 3-1	Representación esquemática de los procesos de biodisponibilidad de moléculas en el sistema digestivo humano (bioaccesibilidad, absorción y metabolización) (tomado y adaptado de Sips et al., 2001).....	39
Figura 3-2	(A) Representación esquemática del procedimiento utilizado en el modelo <i>in vitro</i> del sistema digestivo humano RIVM. (B) Sistema de rotación mecánico utilizado para ensayos de digestión.....	45
Figura 3-3	Curvas de crecimiento en caldo de cultivo MRS $\frac{1}{2}$ de <i>Lactobacillus plantarum</i> C16 y A19, aislados de fermento de cacao, y cepa de referencia JCM 1055.....	46
Figura 3-4	Curvas de relación biomasa seca (BS) vs densidad óptica (OD600) de <i>Lactobacillus plantarum</i> (A) C16, (B) A19 y (C) JCM 1055. Cada bacteria se evaluó por triplicado.....	47
Figura 3-5	Concentraciones de Cd(II) (mg/L) en ensayos de remoción, aplicando diferente concentración de biomasa seca (0.5g/L y 1.5g/L) de <i>L. plantarum</i> C16, A19 y JCM 1055, bajo condiciones iniciales de (A) pH 2 y (B, C) pH 5. Cada tratamiento se evaluó por triplicado.....	48
Figura 3-6	Porcentajes de remoción de Cd(II) aplicando diferente concentración de biomasa seca (0.5g/L y 1.5g/L) de <i>L. plantarum</i> C16, A19 y JCM 1055, bajo condiciones de (A) 1 mg Cd/L a pH 2, (B) 1 mg Cd/L a pH 5 y (C) 10 mg Cd/L a pH 5. Cada tratamiento se evaluó por triplicado.....	49

Figura 3-7	Coeficientes de unión específica (Q) de Cd(II) aplicando diferente concentración de biomasa seca de <i>L. plantarum</i> C16, A19 y JCM 1055, bajo condiciones de (A) 1 mg Cd/L a pH 5 y (B) 10 mg Cd/L a pH 5. Cada tratamiento se evaluó por triplicado.....	50
Figura 3-8	Gráficas de Pareto de significancia de variables pH, concentración de biomasa seca (B) y concentración de cadmio (Cd) en ensayos de remoción de Cd(II) en medio acuoso con <i>L. plantarum</i> (A) C16, (B) A19 y (C) JCM 1055. Los efectos positivos se representan con barras de con líneas horizontales y los efectos negativos con barras con líneas diagonales.....	52
Figura 3-9	Concentraciones de As(III) (mg/L) en ensayos de remoción, aplicando diferente concentración de bioamasa seca (0,5g/L y 1,5g/L) de <i>L. plantarum</i> C16, A19 y 1055, bajo condiciones de (A) pH 5 y (B) pH 8. Cada tratamiento se evaluó por triplicado.....	53
Figura 3-10	Porcentajes de remoción de As(III) aplicando diferente concentración de bioamasa seca de <i>L. plantarum</i> C16, A19 y 1055, bajo condiciones de (A) 0,1 mg As/L a pH 5 y (B) 0,1 mg As/L a pH 8. Cada tratamiento se evaluó por triplicado.....	54
Figura 3-11	Coeficientes de unión específica (Q) de As(III) aplicando diferente concentración de biomasa seca de <i>L. plantarum</i> C16, A19 y JCM 1055, bajo condiciones de 0,1 mg/L de As(III) a pH 5. Cada tratamiento se evaluó por triplicado.....	55
Figura 3-12	Conteo de UFC/mL para <i>L. plantarum</i> C16, A19 y JCM 1055, durante las 4 fases del modelo <i>in vitro</i> del sistema digestivo humano RIVM (Versantvoort et al., 2002). Análisis por triplicado.....	56
Figura 3-13	Porcentajes de bioaccesibilidad de Cd(II) en modelo <i>in vitro</i> RIVM con las cepas <i>L. plantarum</i> C16, A19 y JCM 1055. Cada tratamiento se evaluó evaluó por triplicado.....	57
Figura 3-14	Porcentajes de bioaccesibilidad de As(III) en modelo <i>in vitro</i> RIVM con las cepas <i>L. plantarum</i> C16, A19 y JCM 1055. Cada tratamiento se evaluó evaluó por triplicado.....	58

Lista de tablas

Tabla 1-1	Número de colonias seleccionadas por cambio de color en sitio de crecimiento de colonias para cada muestra recolectada (48 h, 72 h y 120 h de fermentación).....	11
Tabla 1-2	Número de colonias seleccionadas durante las etapas de aislamiento y selección. El nombre y el código de cepas de referencia empleadas en los ensayos.....	12
Tabla 1-3	Asignación de clasificación filogenética de bacterias aisladas de fermento de cacao, con capacidad de crecer en medios con Cd(II) o As(III) de acuerdo a perfiles electroforéticos de SSCP, secuenciación del gen 16S rRNA y comparación en bases de datos.....	14
Tabla 2-1	Asignación de bacterias en los grupos de crecimiento de acuerdo a su comportamiento en las gráficas de OD595 vs Concentración de (A) Cd(II) y (B) As(III), como se muestra en la Figura 2-1, y respectivos valores de CMI.....	27
Tabla 3-1	Condiciones evaluadas en los diseños experimentales para ensayos de remoción de (A) Cd(II) y (B) As(III) en medio acuoso....	43
Tabla 3-2	Composición de las disoluciones del modelo <i>in vitro</i> del sistema digestivo humano RIVM (tomado y adaptado de Kumar et al., 2017).....	45

Lista de Símbolos y Abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
F	Fracción biodisponible de un elemento X	g/100g	Ecuación 3-1
FB	Fracción del elemento X bioaccesible	g/100g	Figura 3-1
FA	Fracción del elemento X transportada por la membrana en el intestino	g/100g	Figura 3-1
FH	Fracción metabolizada de un elemento X	g/100g	Figura 3-1
C _i	Concentración inicial de cadmio o arsénico (arsenito)	mg/L	Ecuación 3-2, Ecuación 3-3
C _f	Concentración de cadmio o arsénico (arsenito) después de ensayos de remoción con bacterias	mg/L	Ecuación 3-2, Ecuación 3-3
Q	Coefficiente unión específica. Metal adsorbido por gramo de biomasa	mg /g	Ecuación 3-3
V	Volumen de unidad experimental	L	Ecuación 3-3
B _m	Cantidad de biomasa por unidad experimental	G	Ecuación 3-3

Subíndices

Subíndice	Término
595	Longitud de onda de 595 nm
600	Longitud de onda de 600 nm

Abreviaturas

Abreviatura	Término
MRS	Medio de cultivo Man-Rogosa-Sharpe
MRS $\frac{1}{2}$	Medio de cultivo MRS diluido a la mitad
MRS $\frac{1}{2}$ -As	Medio de cultivo MRS $\frac{1}{2}$ suplementado con arsénico (arsenito de sodio) 0,1 mg/L
MRS $\frac{1}{2}$ -Cd	Medio de cultivo MRS $\frac{1}{2}$ suplementado con nitrato de cadmio 1 mg/L
BALs	Bacterias ácido lácticas
OD	Densidad óptica
BS	Biomasa seca
B	Concentración de biomasa
UFC/mL	Unidades formadoras de colonia por mililitro
SSCP	Polimorfismo de Conformación de Cadena Simple
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

Introducción

En Colombia, el cacao es uno de los productos agrícolas con mayor potencial para exportación debido a sus características de sabor y aroma que son únicos en el mundo. En los últimos años, la producción de cacao ha aumentado cubriendo el mercado interno y extendiendo el mercado a los países como México, Italia, España, Bélgica y Francia. La proyección del país es aumentar la exportación de este producto (García-Cáceres et al., 2014). Durante la cadena de producción del cacao este pasa por un proceso de fermentación, en el cual participan una serie de microorganismos, entre estos las bacterias ácido lácticas (BALs) (Wacher, 2011). Dentro de este grupo se han encontrado las especies de *Lactobacillus* spp., los cuales son conocidos como microorganismos generalmente seguros por la FDA (*Food and Drug Administration*) y por la EFSA (*European Food Safety Authority*) (Saito et al., 2014; Sun et al., 2015). El uso de microorganismos presentes en el proceso de fermentación de cacao para otros fines comerciales da un valor agregado a este proceso.

Las especies de *Lactobacillus* spp., que se han reportado como microorganismos probióticos tienen la capacidad de sobrevivir bajo condiciones de estrés gástrico durante la ingestión de los alimentos (valores de pH ácidos y presencia de sales biliares) y han sido estudiados por su papel en la prevención de enfermedades, como la diarrea, la Enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y alergias (Butel, 2014). Recientemente, se han estudiado por su capacidad de degradar toxinas y acumular metales tóxicos, por lo que tienen un alto potencial para la detoxificación. Esta consiste en el consumo de probióticos que retienen los elementos contaminantes, los cuales son posteriormente expulsados del organismo y de esta forma evitar su acumulación en el mismo (Zoghi et al., 2014). La presencia de contaminantes iónicos en los alimentos se ha convertido en una problemática que viene en aumento en los últimos años, lo que ha llevado al desarrollo de estudios que buscan mecanismos para su remediación (Bhakta et al., 2012). Entre estos contaminantes iónicos se encuentran el cadmio (Cd(II)) y el arsénico (en su forma más biodisponible como arsenito: As(III)) (Järup, 2003).

Recientemente, se han reportado altos porcentajes de remoción de Cd(II) y As(III) por acción de las BALs, especialmente del género *Lactobacillus* spp. (Halttunen et al., 2007a; Singh & Sarma, 2010; Gerbino et al., 2014). También, se ha evaluado el efecto sobre la bioaccesibilidad de cadmio en un modelo RIVM *in vitro* del sistema digestivo humano con la cepa *L. plantarum* HD48, encontrando una disminución de 41% del metal (Kumar et al., 2017).

Hasta el momento no hay reportes del estudio de BALs provenientes de fermento de cacao para la remoción de los elementos tóxicos (Cd(II) y As (III)). Adicionalmente, no se han reportado estudios del efecto de *Lactobacillus* spp. sobre la bioaccesibilidad de As(III) en modelos *in vitro* del sistema digestivo humano. Por esto, en este trabajo se estudió una novedosa fuente de aislamiento de estos microorganismos que podrían tener una alta capacidad para la detoxificación de estos elementos tóxicos del organismo humano.

De acuerdo a lo anterior, el objetivo general de este trabajo fue evaluar el potencial de bacterias aisladas de fermento de cacao para remover Cd(II) y As(III) en condiciones *in vitro* de pH ácido y de concentración de sales biliares que simulan el sistema digestivo humano. Para esto, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1) Aislar e identificar bacterias que crecen en presencia de Cd(II) y de As(III) a partir de fermento de cacao.
- 2) Seleccionar las bacterias más que crecen ante mayores concentraciones de Cd(II) y de As(III) mediante ensayos de concentración mínima inhibitoria.
- 3) Evaluar la tolerancia a condiciones de pH ácido y de concentración de sales biliares.
- 4) Evaluar la remoción de Cd(II) y As(III) por bacterias seleccionadas en condiciones *in vitro* que simulan el sistema digestivo humano.

A continuación, se presentan tres capítulos donde se describen los procesos realizados durante esta investigación para responder a los objetivos planteados: en el capítulo 1 se describen las actividades realizadas para cumplir con el objetivo 1; en el capítulo 2 se describen las actividades realizadas para cumplir con los objetivos 2 y 3; y en el capítulo 4 se describen las actividades realizadas para cumplir con el objetivo 4. Al final, se presenta el capítulo 4 donde se describe una discusión general y las principales conclusiones y perspectivas del trabajo.

1. Capítulo 1. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas que crecen en medios con cadmio o arsénico a partir de fermento de cacao

1.1 Resumen

En este capítulo se describe la etapa de aislamiento y de identificación de BALs con capacidad de crecer en presencia de cadmio y de arsénico a partir de fermento de cacao, para lo cual se procedió a tramitar un Contrato de Acceso a Recurso Genéticos y sus Productos Derivados con el Ministerio del Ambiente y Desarrollo Sostenible. Este trámite se realizó con la colaboración de la empresa *Luker Chocolate*, que permitió la toma de las muestras de grano de cacao del proceso de fermentación durante las primeras 48, 72 y 120 h. Partiendo de estas muestras, se realizó el aislamiento selectivo de las BALs particularmente del género *Lactobacillus* spp. Se inició con un enriquecimiento bajo condiciones de aerotolerancia y siembra en un medio de cultivo selectivo con un indicador de pH. Posteriormente, se seleccionaron las colonias que generaron un viraje de color del medio de cultivo, se realizó la tinción de Gram para la selección de microorganismos por morfología, y de los ensayos de la catalasa y de la oxidasa por pruebas enzimáticas. Por último, se realizó la clasificación filogenética por técnicas moleculares mediante un ensayo de *Single-Strand Conformation Polymorphism* y secuenciación del gen 16S rRNA. En las condiciones utilizadas fueron aisladas y caracterizadas 38 bacterias del género *Lactobacillus* spp. del fermento de cacao con morfología de bacilos Gram-positivos, catalasa y oxidasa negativas y que soportaron condiciones de criopreservación, las cuales corresponden al género *Lactobacillus* spp.

1.2 Introducción

El grano de cacao es la semilla de árbol *Theobroma cacao*, que se encuentra dentro del fruto (mazorca), cubierto por una sustancia mucilaginoso (pulpa). Para que la semilla se transforme en chocolate debe ser sometida a los procesos de fermentación, de secado, de tostión, de descascarillado, de molienda, entre otros (Lima et al., 2011).

En el proceso de fermentación participan una serie de microorganismos, que intervienen en la formación de los sabores y los aromas característicos del cacao (Lima et al., 2011). La ecología del proceso de fermentación es compleja y envuelve el sucesivo crecimiento de varias especies de levaduras, bacterias ácido lácticas, bacterias acéticas, algunas especies de *Bacillus* sp., otras bacterias y de algunos hongos filamentosos (Ho et al., 2015).

Recientemente se estudio en Colombia, las poblaciones microbianas asociadas a la masa de cacao durante un proceso espontaneo y las herramientas utilizadas, encontrando que el proceso es catalizado por un conjunto de cepas, entre los cuales se encontraron, además de bacterias ácido lácticas y bacterias acéticas, bacterias del genero *Enterobacter*. Adicionalmente, que este proceso espontaneo es heterogéneo entre diferentes muestras evaluadas. Los autores Pacheco-Montealegre, et al. (2019) proponene un cultivo iniciador para mejorar la calidad de los granos de cacao procesados en Colombia.

Las BALs son uno de los principales grupos de microorganismos asociados al proceso de fermentación de cacao. Se reportan poblaciones entre 10^7 y 10^8 UFC/g durante las primeras 36 h y 48 h del proceso, en las que gran parte de la masa del cacao se encuentra en condiciones anaerobias (De Vuyst et al., 2010; Ho et al., 2015). Entre las BALs más comunes aisladas del proceso de fermentación de cacao se encuentran las especies *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* (Ardhana & Fleet, 2003; Camu et al., 2007; Ho et al., 2015; Saito et al., 2014). Estas BALs también pueden ser estudiadas por su función como microorganismos probióticos (Saito et al., 2014).

De Vuyst et al. (2010) sugieren que las BALs tienen las siguientes funciones durante el proceso de la fermentación de cacao: (i) fermentar los azúcares (glucosa y fructosa) en la pulpa para formar ácido láctico y reducir cantidades de etanol y de ácido acético; (ii) utilizar ácido cítrico presente en la pulpa para producir principalmente ácido láctico, ácido acético,

acetaldehído, entre otros compuestos; y (iii) reducir la fructosa presente en la pulpa a manitol (solo algunas especies).

Las BALs, al ser partícipes de la degradación de ácido cítrico y de aumentar la concentración de ácido láctico y de acético, se les atribuye en gran parte la disminución del pH en el proceso y de favorecer la acción de las enzimas endógenas como las proteasas, las invertasas, las glucosidasas, entre otras (De Vuyst et al., 2010). Adicionalmente, a través de varios mecanismos, las BALs pueden participar en la producción de los metabolitos volátiles y no volátiles que están directamente implicados en las características organolépticas del cacao, aunque estos aspectos aún están bajo investigación (De Vuyst et al., 2010; Ho et al, 2015).

Las BALs pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno, por eso son consideradas como anaerobias aerotolerantes (Quigley, 2010). Se clasifican de acuerdo a dos tipos de fermentación: i) grupo homofermentativo: produce solamente ácido láctico; o ii) grupo heterofermentativo: además de ácido láctico, produce etanol y CO₂ (Gänzle, 2015) (Figura 1-1).

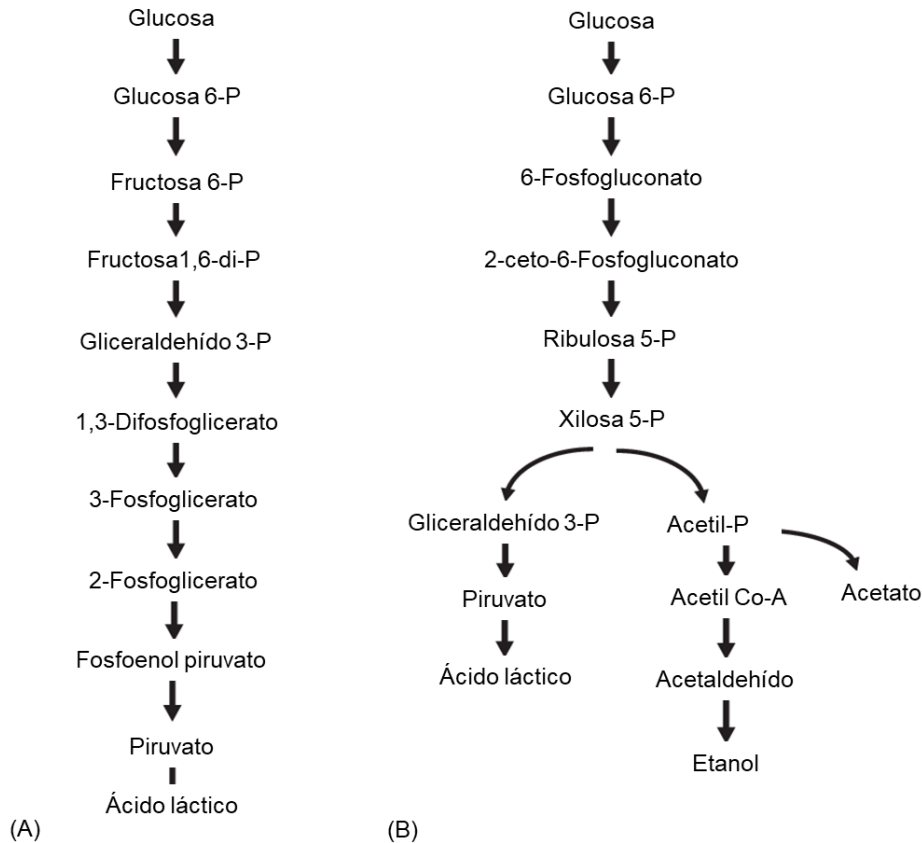


Figura 1-1 Esquema de rutas metabólicas de fermentación de las BALs. (A)

Homofermentativa y (B) Heterofermentativa (tomado y adaptado de Kumar et al., 2015).

Los diversos géneros de las BALs, que se han definido de acuerdo a la morfología celular, al ADN y al tipo de la fermentación, son: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactosphaera*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium* (Giraffa et al., 2010; Holzapfel et al., 2001).

Lactobacillus spp., es un grupo de microorganismos bacilares Gram-positivos, no formadores de esporas, inmóviles, catalasa y citocromo oxidasa negativa, no reductores de nitratos, y su temperatura óptima de crecimiento puede variar entre 30 y 40 °C. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, en productos de origen vegetal y en el tracto gastrointestinal humano y animal (Slover & Danzinger, 2008).

La investigación realizada en este trabajo se enfocó en el estudio de bacterias del género *Lactobacillus* spp., debido a la amplia gama de investigaciones que reportan el gran potencial de estos microorganismos para la remoción de metales y de metaloides tóxicos,

como el cadmio y el arsénico (Ibrahim et al., 2006; Halttunen et al., 2007a; Halttunen et al., 2007b; Halttunen et al., 2008; Singh & Sarma, 2010; Monachese, 2012; Kinoshita et al., 2013; Zhai et al., 2013; Gerbino et al., 2014). Estos estudios se discutirán de forma más amplia en el Capítulo 3 de este trabajo.

El objetivo de esta primera etapa del trabajo fue aislar e identificar BALs del género *Lactobacillus* spp., con capacidad de crecer en presencia de Cd(II) y de As(III) a partir de fermento de cacao.

1.3 Materiales y Métodos

1.3.1 Tramites pre-colecta

Debido a que este proyecto incluía las actividades de bioprospección y de la caracterización molecular de microorganismos nativos, fue necesario solicitar un Contrato de Acceso a Recurso Genéticos y sus Productos Derivados con el Ministerio del Ambiente y Desarrollo Sostenible, el cual fue otorgado mediante la resolución 0699 del 26 de abril del 2018. Con este permiso, fue posible solicitar la autorización y el apoyo logístico del área de Investigación en Proyectos Especiales de Luker Chocolate, con la cual se suscribió un convenio marco de cooperación científica y técnica, para acceder a las muestras de fermento de cacao necesarias o usadas en este trabajo para el aislamiento de los microorganismos de interés.

1.3.2 Muestreo

Se procedió a realizar el muestreo en la finca Granja Luker, ubicada en el municipio de Palestina, departamento de Caldas, Colombia (Figura 1-2). Las mazorcas de cacao de las variedades ICS 1, LUKER 40, TSH 565, FSV 41, ICS 39, FTA 2, ICS 60, FEAR 5, CCN 51 y FSA 13 (Figura 1-3), fueron utilizadas para realizar un proceso regular de fermentación de grano de cacao, en cajones de madera con una masa total de 200 kg. Se tomaron las muestras de fermento de cacao en tres tiempos diferentes del proceso: la primera después de 48 h del inicio, la segunda después de 72 h y la tercera después de 120 h, cada una después de realizar el proceso de volteo (mezcla manual del grano y el cambio de cajón), Figura 1-4. Se tomaron las muestras en los frascos Schott de 500 mL estériles y se sumergió el grano fermentado con NaCl 0,85% p/v estéril hasta completar el volumen total, sin dejar espacio de aire en la parte superior del frasco. Estas muestras se

almacenaron a 4°C y se transportaron desde Manizales hasta Bogotá en neveras de icopor a 4 °C, en un transcurso de 48 h, para su inmediato procesamiento.

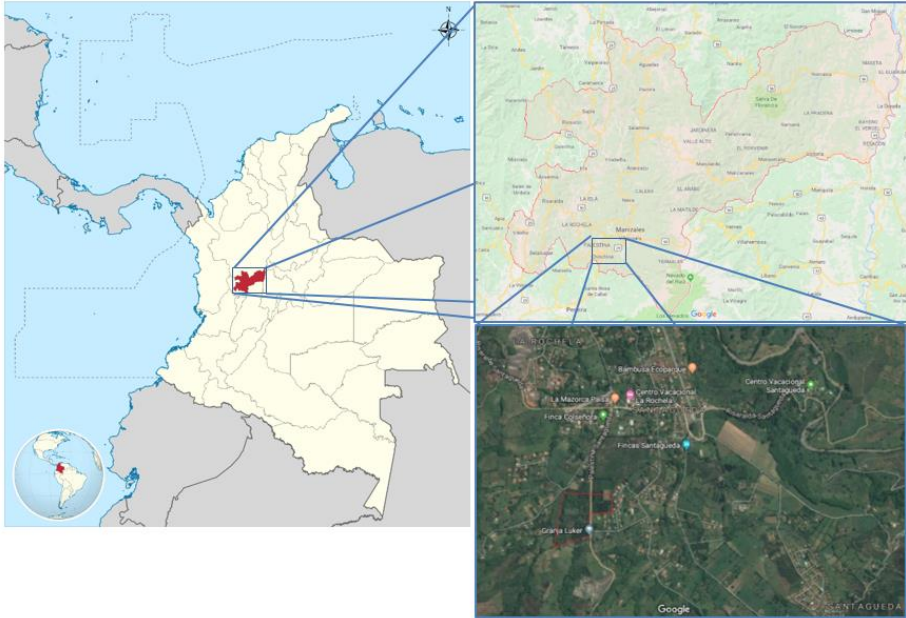


Figura 1-2 Mapa con la ubicación del sitio de muestreo (Granja Luker, Palestina, Caldas, Colombia) (tomado de: https://es.wikipedia.org/wiki/Caldas#/media/File:Colombia_-_Caldas.svg y www.google.com.co/maps).



Figura 1-3 Mazorcas de cacao de las variedades ICS 1, LUKER 40, TSH 565, FSV 41, ICS 39, FTA 2, ICS 60, FEAR 5, CCN 51 y FSA 13, utilizadas en el proceso de fermentación del cual se realizó el muestreo para aislamiento de los microorganismos de interés en este trabajo.



Figura 1-4 Cajones de fermentación de cacao durante el proceso de volteo que consiste en: (A) la mezcla de granos de cacao y (B) traslado de granos a otro cajón de fermentación.

1.3.3 Aislamiento y selección

Una vez las tres muestras llegaron al Laboratorio de Microbiología Ambiental y Aplicada, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia - sede Bogotá. Se tomó 1 mL de la suspensión de cada una (Figura 1-5), y por separado se usó para inocular, con una jeringa estéril (purgada con nitrógeno), a 9 mL de medio de cultivo MRS $\frac{1}{2}$ (Man-Rogosa- Sharpe – OXOID; diluido a la mitad) preparado bajo condiciones de anaerobiosis (Anexo A). Los medios de cultivo de enriquecimiento, o enriquecidos con el cadmio, y arsénico fueron incubados a 37 °C por 48 h y sin agitación.

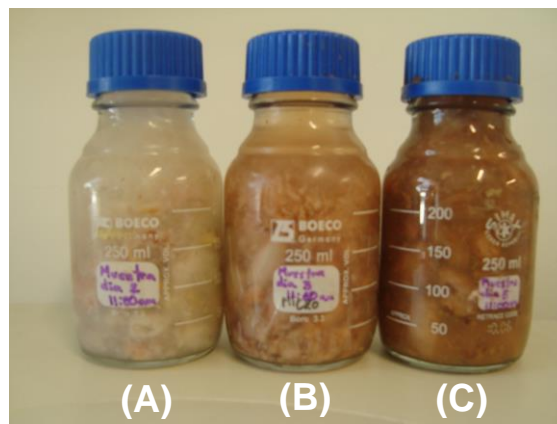


Figura 1-5 Frascos Schott con muestras de fermento de cacao en NaCl 0,85% p/v tomadas a las (A) 48 h, (B) 72 h, y (C) 120 h del proceso de fermentación.

De los tres cultivos incubados bajo condiciones de anaerobiosis, correspondientes a las muestras de 48 h, 72 h y 120 h, se preparan diluciones seriadas con solución salina estéril, desde 10^{-1} a 10^{-8} . De cada una de las diluciones se tomaron 100 μ L y se inocularon en cajas de petri con agar MRS $\frac{1}{2}$ suplementado con arsenito de sodio As(III) 0,1 mg/L (MRS $\frac{1}{2}$ -As) o con nitrato de cadmio Cd(II) 1 mg/L (MRS $\frac{1}{2}$ -Cd), por agotamiento en superficie. Adicionalmente, el medio fue suplementado con 0,017% p/v de púrpura de bromocresol como indicador de pH (Bhakta et al., 2012). Los cultivos se incubaron a 37 °C por 48 h.

Se seleccionaron las colonias que generaron una coloración amarilla en cada uno de los medios de cultivo (Figura 1-6) y se realizó un primer pase a los medios de cultivo agar MRS $\frac{1}{2}$ -As y agar MRS $\frac{1}{2}$ -Cd y se incubaron a 37 °C por 48 h; se realizaron otros dos pases consecutivos en el mismo medio de cultivo, incubando a 37 °C por 48 h, con el fin de garantizar que las bacterias aisladas crecieran bajo las mismas condiciones después de varios pases. A partir del tercer pase se realizó la tinción de Gram a cada una de las colonias obtenidas de forma axénica y, a partir de esta, se seleccionaron las bacterias con morfología de bacilo Gram-positivo (Gram (+)) (Figura 1-7).

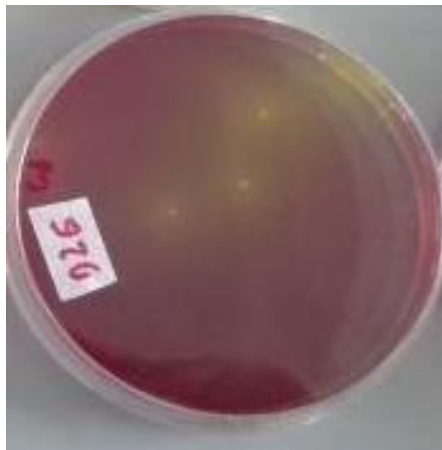


Figura 1-6 Observación del cambio de coloración de morado a amarillo en el sitio de crecimiento de colonias en el medio de cultivo MRS $\frac{1}{2}$ -As o MRS $\frac{1}{2}$ -Cd con un indicador de pH (púrpura de bromocresol 0,017% p/v).

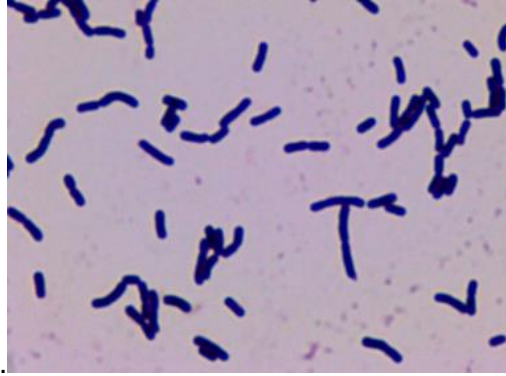


Figura 1-7 Observación bajo microscopio óptico (x100) de bacterias teñidas por tinción de Gram, con morfología de bacilos con color violeta (aislado A04).

Con las colonias seleccionadas se realizó la evaluación de la actividad de la catalasa y de la oxidasa.

Para evaluar la actividad de la catalasa se tomaron 50 μ L de peróxido de hidrógeno 30% v/v y se colocó sobre un portaobjetos de vidrio, posteriormente, a partir de un cultivo fresco con 48 h de crecimiento en agar MRS $\frac{1}{2}$, se tomó con un asa estéril la biomasa de una colonia y se suspendió en el peróxido de hidrógeno. La ausencia de burbujeo durante la prueba fue considerada como resultado negativo (Figura 1-8.A). Como control positivo se evaluó la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y como control negativo la cepa *Lactobacillus plantarum* JCM1055. (Bhakta et al., 2012).

Para evaluar la actividad de la enzima citocromo oxidasa, se utilizaron las cintas Bactident® Oxidase (OXOID), siguiendo las indicaciones recomendadas por el fabricante. Como control positivo se evaluó la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y como control negativo la cepa *Escherichia coli* ATCC 8739 (de acuerdo a instrucciones del proveedor).

Se seleccionaron las bacterias que reportaron resultado negativo en las dos pruebas.

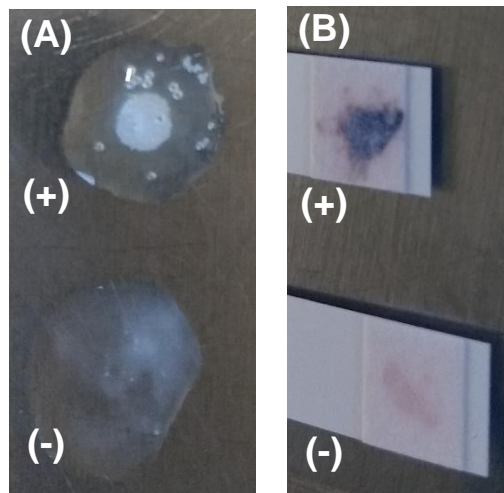


Figura 1-8 Observación de resultados positivos (+) y negativos (-) utilizando las cepas control en las pruebas bioquímicas de (A) actividad de catalasa y (B) actividad de oxidasa.

Los ensayos del aislamiento y de la selección fueron realizados con la colaboración de dos estudiantes de pregrado de la carrera de Química (Ana María Guzmán Beltrán y Edison Abdiel Rodríguez Torres) durante su participación en el semillero de investigación del grupo GERMINA. Todo el trabajo fue realizado bajo orientación y acompañamiento de la autora y orientación de los directores de tesis.

1.3.4 Criopreservación

Utilizando las colonias seleccionadas, se tomaron tubos de ensayo con caldo MRS $\frac{1}{2}$ -As y otros tubos con MRS $\frac{1}{2}$ -Cd, se inocularon con cada microorganismo, los cuales se incubaron a 37°C por 48 h agitación de 150 rpm. Se prepararon crioviales estériles con 1 mL de medio de cultivo caldo MRS con 40% v/v de glicerol. En cada criovial se agregó 1 mL del cultivo de cada aislamiento y se mezcló con vortex. Los crioviales se almacenaron a -20 °C por 24 h y posteriormente, se almacenaron a -80 °C. Se realizó un seguimiento de pureza a los cultivos de los aislados después de 1 semana de almacenamiento y se comprobó la pureza por la morfología y la tinción de Gram bajo microscopia óptica. Después de 3, 6 y 12 meses, se volvió a realizar el procedimiento de recuperación, desde la criopreservación, de cada uno de los aislados para confirmar su viabilidad.

1.3.5 Identificación molecular

Primero se reactivaron las cepas conservadas a -80 °C en el medio de cultivo agar MRS $\frac{1}{2}$, y se incubaron a 37°C por 48 h. A partir de cada aislado reactivado, se preparó un cultivo para la extracción y purificación de ADN genómico por métodos enzimáticos, de acuerdo con el protocolo previamente establecido en el laboratorio (Anexo B) (Montaño-Salazar et al., 2018). En estos ensayos se utilizaron como cepas de referencia las bacterias *Lactobacillus plantarum* JCM 1055, *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136 y *Lactobacillus kefir* JCM 5818, de la Colección Japonesa de Microorganismos (JCM).

Una vez rectificada la pureza del ADN genómico extraído mediante cuantificación por espectrofotometría (NanoDrop 2000c, ThermoScientific), se procedió a realizar la amplificación de las regiones V4 y V5 del gen 16S rRNA, utilizando los iniciadores Com1 y 909R (Anexo C) (Dohrmann & Tebbe, 2008) para realizar el análisis de *Single-Stranded Conformational Polimorfism* (SSCP), siguiendo los procedimientos previamente establecidos (Montaño-Salazar et al., 2018). En este análisis de pre-secuenciación, se discriminaron los aislamientos con perfiles únicos para una posterior identificación. Para las bacterias que mostraron distintos perfiles de SSCP se realizó la amplificación del gen 16S rRNA completo, utilizando los iniciadores 27F y 1492R, bajo condiciones previamente establecidas (Anexo D) (Weisburg et al., 1991).

En el caso de algunos aislados fue necesario utilizar un método mecánico (Anexo E), para realizar la extracción de ADN genómico, y así, realizar la amplificación del gen 16S rRNA completo (Anexo D).

De cada aislado, la región amplificada fue secuenciada comercialmente (Macrogen, Corea). El análisis bioinformático se realizó utilizando el programa GENEIOUS (<https://www.geneious.com/>), tomando los electroferogramas y limpiando los extremos de baja calidad. Posteriormente, se alinearon las secuencias complementarias para obtener la secuencia consenso. Estas fueron comparadas con las secuencias reportadas en la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando la herramienta BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool). Finalmente, empleando las secuencias consenso de las bacterias aisladas y de las secuencias más cercanas arrojadas por BLAST®, se construyó un árbol filogenético utilizando el método de Neighbor-Joining, aplicando el modelo de distancia Tamura-Nei.

La identificación molecular de los aislados fue realizada con la colaboración de una estudiante de pregrado de la carrera de Química (María Camila Lara Morales) durante el desarrollo de su trabajo de grado en el grupo GERMINA. El trabajo fue realizado bajo la orientación y acompañamiento de la autora y la orientación de los directores de la tesis.

1.4 Resultados

1.4.1 Aislamiento y selección

El número de colonias seleccionadas a partir del medio agar suplementados MRS $\frac{1}{2}$ -As o MRS $\frac{1}{2}$ -Cd, y con púrpura de bromocresol, se indica en la Tabla 1-1.

Tabla 1-1 Número de colonias seleccionadas por cambio de color en sitio de crecimiento de colonias para cada muestra recolectada (48 h, 72 h y 120 h de fermentación).

Tiempo de muestreo durante fermentación de cacao		48 h	72 h	120 h
Número de colonias que crecieron en medio de cultivo de aislamiento con As o Cd	As(III) 0,1 mg//L	56	19	17
	Cd(II) 1,0 mg/L	36	33	14

En esta etapa inicial se seleccionaron 174 colonias que presentaron viraje del medio de cultivo de color púrpura a color amarillo (formación de halo amarillo) (Figura 1-6). Cada una de estas colonias fueron cultivadas de nuevo en el medio de cultivo agar MRS $\frac{1}{2}$ -As o MRS $\frac{1}{2}$ -Cd para confirmar su capacidad de crecer en medios con presencia del metal(oide) utilizado. Posteriormente, se realizó la tinción de Gram de la colonia de cada uno de los aislados y se evaluó la morfología del microorganismo (Figura 1-7).

De acuerdo a las observaciones tomadas bajo el microscopio óptico, fueron descartadas varios aislados que no presentaron morfología de bacilos Gram (+). Otro criterio de selección consistió en los ensayos bioquímicos cualitativos de la actividad de las enzimas catalasa y de la oxidasa, en los cuales los aislados que mostraron no tener actividad en ambas pruebas fueron seleccionados (Figura 1-8).

Las cepas seleccionadas fueron criopreservadas, y posteriormente, fueron identificadas por técnicas moleculares. En la Tabla 1-2 se resume el número de aislados seleccionados en cada etapa del proceso de selección.

Tabla 1-2 Número de colonias seleccionadas durante las etapas de aislamiento y selección. El nombre y el código de cepas de referencia empleadas en los ensayos.

	Colonias en medio con As(III) 0,1 mg/L	Colonias en medio con Cd(II) 1,0 mg/L	Número Total
Número de colonias seleccionadas por viraje de color en el medio (formación de halo amarillo)	84	90	174
Número de colonias de bacilos Gram (+)	30	34	64
Número de aislados con actividad Catalasa y Oxidasa negativa	16	27	43
Número de aislados viables después del almacenamiento por criopreservación	14	25	39
Bacterias de referencia	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1055 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> JCM 1136 <i>Lactobacillus kefir</i> JCM 5818		

En total, 39 aislados fueron seleccionados y se mantuvieron viables después de la criopreservación, los cuales fueron usados para la caracterización molecular.

1.4.2 Identificación molecular

A los 39 aislados seleccionados se les realizó en primera instancia la extracción y la purificación de ADN genómico por método enzimático (Anexo B). Adicionalmente, se realizó el mismo procedimiento para las 3 cepas de referencia, empleadas como control positivo durante el proceso de identificación molecular. Fue posible realizar la extracción de ADN genómico de 32 bacterias por este método. Para los 10 aislados que mostraron bajo rendimiento de la extracción por métodos enzimáticos, se les realizó la extracción de

ADN genómico por un método mecánico (Anexo E). Con las muestras de ADN genómico extraídos, se procedió a amplificar las regiones V4 y V5 del gen 16S rRNA (Anexo C), los cuales fueron analizados por SSCP (Figura 1-9).

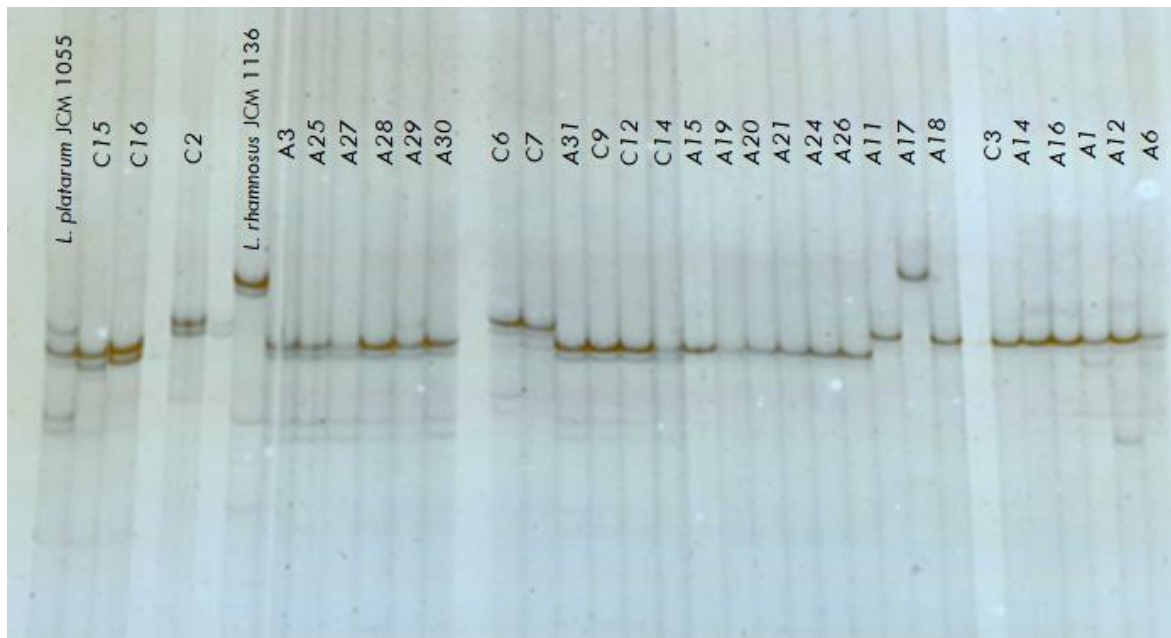


Figura 1-9 Análisis de SSCP mostrando perfiles electroforéticos de la región parcial V4-V5 del gen 16S rRNA de 32 bacterias con las cuales se realizó extracción de ADN genómico por método enzimático.

Los perfiles electroforéticos obtenidos de los aislados y de las cepas de referencia por la técnica de SSCP permitieron realizar la discriminación de 9 perfiles únicos. Se seleccionó un aislado por cada perfil para realizar la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA completo. Adicionalmente, se realizó la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA para las 10 cepas cuyo ADN genómico fue extraído por métodos mecánicos.

El análisis bioinformático del gen 16S rRNA completo permitió asignar la identificación de género y especie a cada aislado. En la Tabla 1-3 se muestra la asignación de clasificación filogenética de cada uno de los perfiles electroforéticos, así como de las cepas con las que no se realizó el ensayo por la técnica SSCP (marcados como NA).

En la Figura 1-9 se representan las relaciones evolutivas de las BALs de acuerdo a las secuencias del gen 16S rRNA de los aislados respecto a las secuencias reportadas en las bases de datos de bacterias del mismo género y especie.

Tabla 1-3 Asignación de clasificación filogenética de bacterias aisladas de fermento de cacao, con capacidad de crecer en medios con Cd(II) o As(III) de acuerdo a perfiles electroforéticos de SSCP, secuenciación del gen 16S rRNA y comparación en bases de datos.

Código del aislado	Perfil de SSCP	Nombre del microorganismo con secuencia de mayor % similitud	% de similitud	Código de acceso NCBI	Otros aislados con perfil SSCP relacionado
A4	NA*	<i>L. brevis</i>	99%	MN704576	-
A5	NA*	<i>L. plantarum</i>	100%	MN704577	-
A6	H	<i>L. fermentum</i>	100%	MN704578	A1
A10	NA*	<i>L. brevis</i>	100%	MN704579	-
A11	D	<i>L. brevis</i>	100%	MN704580	A18, C3
A12	G	<i>L. fermentum</i>	99%	MN704581	-
A13	NA*	<i>L. plantarum</i>	100%	MN704582	-
A16	I	<i>L. fermentum</i>	100%	MN704583	-
A17	E	<i>L. paracasei</i>	100%	MN704584	-
A19	C	<i>L. plantarum</i>	100%	MN704585	A15, A20, A21, A24, A26
A29	A	<i>L. plantarum</i>	100%	MN704586	A3, A23, A25, A27, A28, A30, A31, C9, C12, C14
C1	NA*	<i>L. plantarum</i>	100%	MN704587	-
C6	F	<i>No identificada</i>	98%		C2, C7
C8	NA*	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100%	MN704588	-

Tabla 1-3 (Continuación)

Código del aislado	Perfil de SSCP	Nombre del microorganismo con secuencia de mayor % similaridad	% de similaridad	Código de acceso NCBI	Otros aislados con perfil SSCP relacionado
C11	NA*	<i>L. plantarum</i>	98%	MN704589	-
C16	B	<i>L. plantarum</i>	100%	MN704590	C15
C18	NA*	<i>L. amylovorus</i>	99%	MN704591	-
C20	NA*	<i>L. brevis</i>	100%	MN704592	-

*Las cepas designadas con NA, corresponden a las que no tienen un perfil electroforético asignado al no ser analizadas por la técnica SSCP.

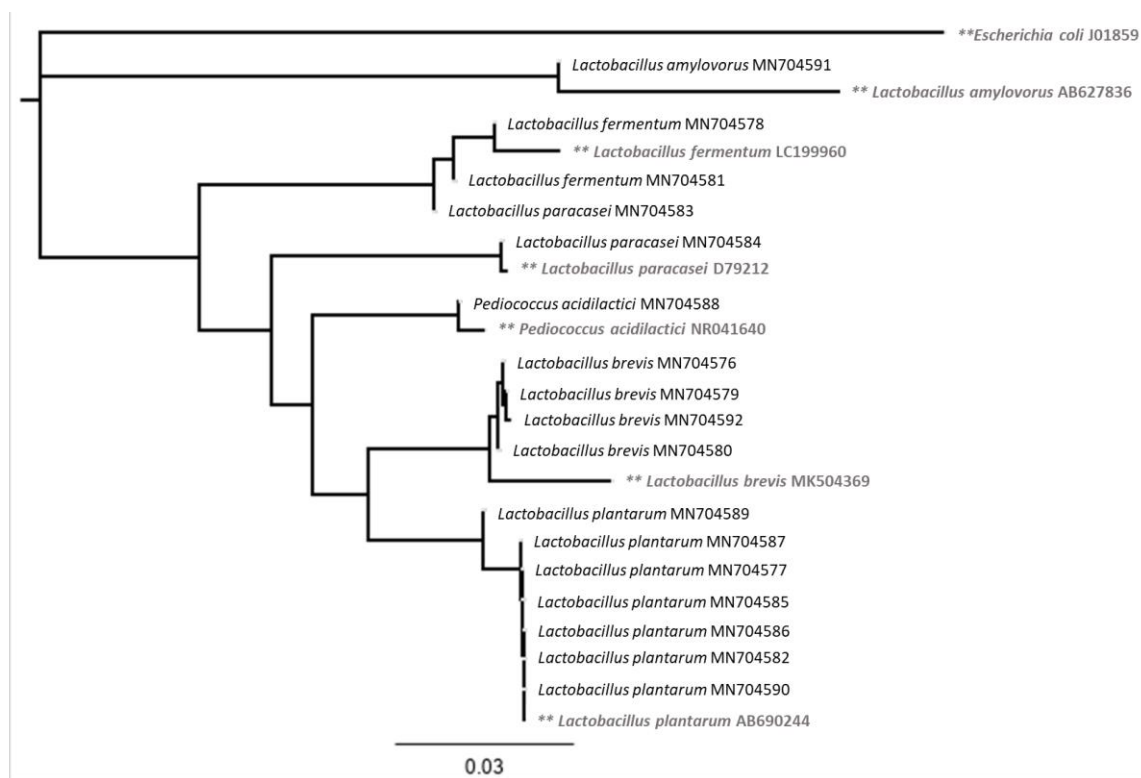


Figura 1-10 Análisis filogenético basado en las secuencias del gen 16S rRNA de BALs representantes de los perfiles electroforéticos, con sus respectivos códigos de acceso de GenBank (Tabla 1-3). Se incluyen cepas de referencia para cada especie indicadas con ** y como outgroup fue incluida la secuencia de una cepa de *E. coli*, con código J01859.

Los resultados indican que 38 de los aislados seleccionados corresponden a bacterias del género *Lactobacillus* spp. y uno de los aislados corresponde a *Pediococcus acidilactici*.

1.5 Discusión

En esta primera etapa de la investigación se aislaron e identificaron BALs a partir del fermento de cacao, correspondientes en mayor cantidad de aislados del género *Lactobacillus* spp., comprobando que este género se encuentra presente en el fermento de cacao, en los tiempos de muestreo seleccionados (De Vuyst et al., 2010; Ho et al., 2015).

Durante un proceso de fermentación de cacao, en el que se utilizó una mezcla de 10 clones de cacao, desarrollado dentro de las actividades recurrentes de la granja experimental Granja Luker, se tomaron muestras después de 48, 72 y 120 h. Siguiendo la metodología de selección propuesta basada en el estudio de Bhakta et al. (2012), fueron aisladas e identificadas 24 bacterias tolerantes a 1 mg/L de Cd(II) y 14 bacterias tolerantes a 0,1 mg/L de As(III), por lo que presentan potencial para futuras aplicaciones en procesos biotecnológicos (Slover & Danzinger, 2008), incluyendo, el uso en los procesos de mitigación de elementos tóxicos como el Cd(II) y el As(III) (Ibrahim et al., 2006; Halttunen et al., 2007a; Halttunen et al., 2007b; Halttunen et al., 2008; Singh & Sarma, 2010; Monachese, 2012; Kinoshita et al., 2013; Zhai et al., 2013; Gerbino et al., 2014).

En una etapa posterior se realizó la selección de cepas con capacidad de crecer en presencia de Cd(II) y de As(III) productoras de metabolitos ácidos, mediante cultivo en medios agar MRS $\frac{1}{2}$ -As y agar MRS $\frac{1}{2}$ -Cd suplementados con púrpura de bromocresol (0,017% p/v). Se realizó la selección aleatoria de 174 colonias, las cuales generaron un cambio de color desde un tono púrpura a un tono amarillo en los medios de cultivo usados, (Figura 1-6). Debido a la presencia del indicador púrpura de bromocresol, las cepas con capacidad de producir metabolitos ácidos, entre las cuales se encuentran los lactobacilos (De Vuyst et al., 2010), generaron un cambio de pH a un valor inferior a 5,6, por lo que pudieron ser detectadas, tal como lo indican previamente los reportes de Bhakta et al. (2010) y Bhakta et al. (2012).

Estos aislados fueron inoculados en los medios de cultivo agar MRS $\frac{1}{2}$ -As (aislados tolerantes a As(III)) o agar MRS $\frac{1}{2}$ -Cd (aislados tolerantes a Cd(II)) y se realizó la tinción de Gram.

Se tuvieron en cuenta los aislados que presentaron morfología de bacilos Gram (+) (De Vos et al., 2009), los cuales pueden pertenecer al género de BALs *Lactobacillus* spp. (De

Vos et al., 2009; König & Fröhlich, 2017). Por otro lado, se detectaron 21 bacilos Gram (+) mezclados con bacterias de distinta morfología, que fueron recuperados mediante cultivos por dilución en placa, y para los cuales se realizó tinción de Gram.

En esta etapa fueron seleccionados 63 aislados con capacidad de producir metabolitos ácidos y con morfología de bacilos Gram (+), y por error fue seleccionado un aislado de cocos Gram (+). Se descartaron los que mostraron actividad de catalasa y de oxidasa positiva. Las bacterias de la familia Lactobacillaceae, conformada por los géneros *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* y *Pediococcus*, se consideran citocromo oxidasa negativas. En la mayoría de los casos se consideran catalasa negativas, ya que algunas especies son capaces de descomponer el peróxido mediante uso de catalasas o pseudocatalasas (De Vos et al., 2009). A pesar de esto, solo se seleccionaron las bacterias catalasa negativa, con el fin, de aumentar la probabilidad de encontrar *Lactobacillus* spp., entre las cepas seleccionadas.

Después de este procedimiento, se seleccionaron 43 aislados, los cuales fueron criopreservados. Sin embargo, solo 39 aislados permanecieron viables y fueron evaluados para determinar su concentración mínima inhibitoria de Cd(II) y de As(III). Como se reportó previamente por Chou & Weimer (1999), algunas cepas de *Lactobacillus* no son tolerantes a las condiciones de criopreservación (~20% glicerol, -80°C). La pérdida de viabilidad de 4 cepas debido a su baja tolerancia a la metodología de preservación empleada, da indicios de que para futuros estudios se deben considerar otras metodologías, para conservar los microorganismos a largo plazo. Por ejemplo, se puede usar la liofilización, ya que la actividad del agua permanece en un valor cercano a 0,2 permitiendo almacenar las bacterias por un mayor tiempo, minimizando las pérdidas de viabilidad y funcionalidad (Fonseca et al., 2015).

De las BALs recuperadas, 23 fueron aisladas a partir de la muestra de 48 h de la fermentación del cacao, y 15 a partir de la muestra de 72 h, mientras que ningunos de los aislados seleccionados provienen de la muestra de 120 h. Esto es coherente con reportes anteriores, ya que las primeras horas de la fermentación del cacao se llevan a cabo en un sistema cerrado, en el que se favorecen las condiciones de anaerobiosis y la producción de azúcares sencillos que son la fuente de carbono principal de los lactobacilos. Estos producen ácido láctico y etanol, entre otros metabolitos (De Vuyst et al., 2010). Después de 96 o 120 h se dan las condiciones para el crecimiento de las bacterias acéticas y otras

bacterias formadoras de esporas. Las bacterias acéticas transforman el etanol para producir ácido acético (De Vuyst et al., 2010).

Finalmente, con el fin de realizar la identificación de los 39 aislados seleccionados se realizó la extracción de su ADN genómico, la amplificación y la secuenciación del gen 16S rRNA. Inicialmente se utilizó un método enzimático, sin embargo, no fue posible realizar el proceso de extracción de ADN genómico de 10 de los 39 aislados con este método, por lo que fue necesario utilizar un método mecánico, el cual implica un tratamiento más drástico para alcanzar una correcta lisis celular. *Lactobacillus* spp. se caracterizan por ser bacterias Gram (+) con estructuras de pared celular que les otorgan resistencia a daño químico o a la ruptura osmótica. Por lo anterior, en algunos reportes se han utilizado métodos modificados para la extracción del ADN (Alimolaei & Golchin, 2016; De et al., 2010). Con 28 aislados con los que se realizó extracción de ADN genómico con métodos enzimáticos, se realizó un análisis de perfiles electroforéticos por la técnica SSCP, que permite distinguir variaciones genéticas características entre especies (Dohrmann & Tebbe, 2008). De acuerdo a esta diferenciación, se seleccionaron los perfiles electroforéticos únicos que fueron posteriormente identificados mediante la amplificación y la secuenciación del gen 16S rRNA completo del aislado respectivo.

En la Figura 1-9 se observa que los perfiles electroforéticos de las cepas posteriormente identificadas como *L. plantarum* (perfiles A, B y C) tienen un perfil similar a la cepa de referencia *L. plantarum* JCM 1055. Por otro lado, ninguno de los aislamientos presentó o un perfil electroforético similar a la cepa de referencia *L. rhamnosus* JCM 1136. Los aislados con los cuales se obtuvieron una extracción de ADN genómico eficiente por método enzimático, fueron posteriormente, clasificados como *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum* y *L. paracasei*. Se presentaron 10 aislados que no se obtuvieron una extracción eficiente por métodos enzimáticos; estas bacterias fueron identificadas como *Pediococcus acidilactici*, *L. plantarum*, *L. brevis* y *L. amylovorus*.

Los resultados de secuenciación indicaron que los 38 aislados de fermento de cacao corresponden al género *Lactobacillus* spp. y que solo 1 corresponde a *Pediococcus acidilactici* (Tabla 1-3). La totalidad de las cepas corresponden a BALs. Entre *Lactobacillus* spp. recuperados, las especies más predominantes fueron *L. plantarum* (53,6%) y *L. brevis* (17,1%), en menor representación se encontraron *L. fermentum*, *L. amylovorus* y *L. paracasei*. Esto coincide con lo reportado por Camu et al. (2007), quienes mencionan que

estas especies hacen parte del proceso de fermentación de cacao. En el árbol filogenético (Figura 1-10) se observa cercanía de los *Lactobacillus* spp. aislados a partir de fermento de cacao y las bacterias de la misma especie cuya secuencia se reporta en GenBank. Esto sugiere que la clasificación filogenética se realizó correctamente.

El género *Lactobacillus* es considerado como el de mayor potencial comercial debido a la capacidad de sus especies para realizar biotransformaciones de carbohidratos y de proteínas (Sun et al., 2015). Estos microorganismos se encuentran asociados principalmente a nichos presentes en los alimentos, las plantas, los animales y los humanos (Sun et al., 2015). Hasta el año 2015, se han aislado y reconocido 200 especies y subespecies de este género (Sun et al., 2015). Por otro lado, estas bacterias tan reconocidas como microorganismos generalmente seguros por la FDA (*Food and Drug Administration*) y por la EFSA (*European Food Safety Authority*) (Sun et al., 2015). Las BALs, especialmente del género *Lactobacillus* spp., se encuentran presentes en los productos alimenticios fermentados como quesos, yogurt, kefir, carnes, vegetales, cereales, entre otros (Leroy & De Vuyst, 2004). Estos microorganismos cumplen funciones de preservación mediante la producción de bacteriocinas, otorgan propiedades organolépticas mediante la producción de exopolisacáridos, moléculas de aroma, y enzimáticas como amilasa, entre otros; además, sirven para la producción de alimentos nutraceuticos, oligosacáridos, vitaminas del grupo B, péptidos bioactivos, entre otros (Leroy & De Vuyst, 2004). Otro de los nichos en el que se encuentran presentes es el fermento de cacao, en donde predominan las especies *L. fermentum* y *L. plantarum* (Saito et al., 2014). La fermentación es un proceso en que los microorganismos, incluyendo las BALs, son fundamentales para que se den los cambios en composición química que originan las características organolépticas de la semilla de cacao (Saito et al., 2014).

1.6 Conclusiones

De las muestras de cacao fermentado se aislaron un total de 38 bacterias del género *Lactobacillus* spp., a través de un procedimiento de enriquecimiento en condiciones de aerotolerancia. Se pudo observar la producción de metabolitos ácidos y su capacidad de crecer en medios de cultivo selectivos MRS $\frac{1}{2}$ con Cd(II) y As(III). En su mayoría mostraron una morfología de bacilos Gram (+) y actividad catalasa y oxidasa negativa. Se confirmó la identidad de los aislados por secuenciación del gen 16S rRNA encontrándose que las especies de *L. plantarum* y *L. brevis* predominaban. Estos *Lactobacillus* spp. podrían tener

potencial de detoxificación de Cd(II) y As(III), por lo que se debe evaluar su capacidad de crecer ante altas concentraciones de estos elementos, y en condiciones de pH ácido y concentraciones de sales biliares de un modelo *in vitro* del sistema digestivo humano.

2. Capítulo 2. Selección de bacterias con mayor potencial para ensayos de remoción en condiciones *in vitro* del sistema digestivo humano

2.1 Resumen

En este capítulo se describe el trabajo realizado para seleccionar tres bacterias con capacidad de crecer a mayores concentraciones de cadmio y de arsenito, y tolerantes a condiciones *in vitro* que simulan el sistema digestivo humano, para futuros ensayos de remoción. En una etapa previa fue posible aislar y preservar 38 bacterias del género *Lactobacillus* spp., a partir del fermento de cacao, de las cuales 14 se aislaron en un medio de cultivo suplementado con arsenito, y 24 con el medio de cultivo suplementado con cadmio. Con estas bacterias, primero se realizaron ensayos de concentración mínima inhibitoria del cadmio y del arsenito y, posteriormente, se determinó su capacidad de tolerar condiciones de pH ácido y de altas concentraciones de sales biliares. Se encontró que todas las bacterias presentaron mayor capacidad de crecer a las altas concentraciones de arsenito, respecto a las de cadmio. También, se observó que de 9 de 13 microorganismos evaluados, presentaron tolerancia a las condiciones ácidas. Finalmente, todos presentaron tolerancia a las altas concentraciones de sales biliares. Con base a los tres criterios (concentración mínima inhibitoria, tolerancia a las condiciones de acidez y a las sales biliares), fueron seleccionadas la cepa referencia *L. plantarum* JCM 1055, junto con los aislados nativos del fermento de cacao: *L. plantarum* A19 y *L. plantarum* C16, para posteriores ensayos de remoción en un medio acuoso y en un modelo *in vitro* que simula el sistema digestivo humano.

2.2 Introducción

El cadmio (Cd) se considera un metal no esencial, que es absorbido por los organismos vivos utilizando las rutas metabólicas del zinc, el cual tiene propiedades químicas cercanas. Se encuentra en su forma catiónica con un estado de oxidación de 2^+ (Cd(II)) (Satarug et al., 2003). El cadmio puede ser liberado al ambiente en actividades antropogénicas como la combustión de carbón, la minería, la producción de fertilizantes, la producción de pigmentos, la fabricación de conductores eléctricos (baterías), la producción de hierro y en la refinación de metales (Arias et al, 2018).

Desde el suelo, el Cd se puede acumular en algunas plantas como el tabaco (*Nicotiana* spp.), los girasoles (*Helianthus* spp.) (hasta 2,5 mg/Kg), el sauce (*Salix* spp.) (hasta 0,01 mg/Kg), y al estar presente en el agua se acumula en los animales como los moluscos (10 mg/Kg), entre ellos el cangrejo (*Ranina ranina*) y en las ostras (*Ostrea lutaria*). Las concentraciones encontradas en los órganos de los dugongos y las tortugas están en un rango de 7 a 76 mg/Kg (Satarug et al., 2003). Los dugongos y las tortugas hacen parte de la dieta tradicional de algunas comunidades australianas, lo que representa un riesgo de intoxicación (Satarug et al., 2003). En el mundo, los países con reportes de mayor contaminación de Cd son China, Japón, Estados Unidos, Canadá, México, Bélgica. Alemania, Rusia y Australia (Das & Dash, 2017). En Colombia, en poblaciones cercanas al río Bogotá, se analizaron muestras de sangre humana y se encontraron concentraciones de Cd(II) entre 0,3 y 6,2 $\mu\text{g/L}$, que están por encima de los valores de referencia (Arias et al., 2018). La dosis tóxica en la dieta humana es de 3-300 mg/día y la dosis letal es 1500-9000 mg/día (Spiro & Stigliani, 2007). La exposición a este metal se ha relacionado con la aparición de enfermedades del sistema óseo y pulmonares, la supresión del sistema inmune y en las enfermedades de riñones e hígado; adicionalmente, es considerado un elemento carcinógeno (Satarug et al., 2003).

Por otro lado, el arsénico (As) es un metaloide no esencial que se encuentra en el medio ambiente principalmente en su estado de oxidación 3^+ como arsenito (As(III)/AsO₂¹⁻), o 5^+ como arseniato (As(V)/AsO₄³⁻). En su forma As(III) es más biodisponible ya que tiene un comportamiento similar al fósforo, mientras que en su forma As(V) es más tóxico que el As(III) (Mandal & Suzuki, 2002). Las actividades antropogénicas como la minería, la fundición de metales, la producción de pesticidas, la preservación de madera y uso de combustibles fósiles aceleran la liberación del arsénico al medio ambiente (Arias et al.,

2018).

En India y Bangladesh, países con alta densidad poblacional, la problemática de afectación por As es muy grave debido al consumo de agua contaminada. También, se ha reportado esta problemática en zonas rurales de Estados Unidos y Finlandia (Alonso et al., 2014). En Colombia, se han encontrado altas concentraciones del metaloide en los suelos, en los sedimentos, en las hortalizas y en las aguas de riego (Alonso et al., 2014). Adicionalmente, se reportaron concentraciones de As en un rango de 10,5 a 2078 mg/Kg en los cabellos de las poblaciones cercanas al río Muña, resultados cercanos a los obtenidos para poblaciones de Bolivia (37-2110 mg/kg) y significativamente, menores a los reportados para Argentina (400-20,000 mg/kg) (Arias et al., 2018). En la dieta humana, la dosis tóxica es de 5-50 mg/día y la dosis letal es de 50-340 mg/día (Spiro & Stigliani, 2007). Los efectos del arsénico por ingestión o por inhalación en alta concentración puede causar efectos carcinogénicos (cáncer de piel, de pulmón o de vejiga), no carcinogénicos (deficiencias cognitivas, diabetes, lesiones en la piel y desórdenes gastrointestinales) (Arias et al., 2018).

Existen tres vías principales de exposición a los metales y a los metaloides tóxicos: la ingestión, por inhalación y por contacto con la piel. La ingestión es la ruta de exposición más importante y peligrosa (Yuswir et al., 2013), porque después de ser ingeridos, estos elementos se acumulan o no en el organismo humano de acuerdo con su biodisponibilidad, que depende del ambiente intestinal de la persona y el alimento en el cual se encuentra presente (Wienk, 1999; Van Het Hof, 2000). La biodisponibilidad está ligada a la bioaccesibilidad, que corresponde a la cantidad del elemento disuelto en los jugos digestivos, disponible para ser absorbido por el intestino. Para conocer este mecanismo, se han desarrollado modelos *in vitro*, que son más rápidos, económicos y no requieren el uso de animales ni de humanos que permiten determinar la bioaccesibilidad de un elemento presente en un alimento, a modo de aproximación (Van de Wiele et al., 2007).

Por otro lado, el ambiente ácido del estómago y la presencia de bilis en el duodeno son los principales factores de pérdida de la viabilidad de bacterias probióticas (Mainville et al., 2005). Por lo anterior, la capacidad de tolerar las condiciones de acidez y de concentración de sales biliares es un criterio de selección importante de los microorganismos con potencial de remover Cd(II) o As(III) en los distintos ambientes del sistema digestivo humano.

En el mundo, en la biosfera la presencia de elementos tóxicos como el cadmio o el arsénico es considerada una de las mayores preocupaciones, ya que los seres humanos están expuestos y los acumulan en sus órganos vitales. Esta acumulación puede desencadenar la aparición de algunas enfermedades, incluyendo el cáncer. Por lo anterior, es importante tomar acciones para mitigar estos elementos en el cuerpo humano. Una alternativa es la detoxificación mediante el consumo de microorganismos probióticos (ej: *Lactobacillus* spp.) que ha sido estudiada por algunos investigadores, con el fin de disminuir su biodisponibilidad en el organismo. El objetivo de esta segunda etapa del trabajo fue seleccionar las bacterias aisladas del fermento de cacao que presentaban capacidad de crecer a mayores concentraciones de Cd(II) y de As(III), y en condiciones de acidez y a la presencia de sales biliares, para evaluarlas en posteriores ensayos de remoción en medio acuoso y en un modelo *in vitro* del sistema digestivo humano.

2.3 Materiales y Métodos

2.3.1 Microorganismos evaluados

Los microorganismos evaluados en los ensayos de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente al cadmio y al arsenito, y de la tolerancia a condiciones de acidez y de sales biliares, fueron las 38 bacterias de *Lactobacillus* spp., aisladas a partir del fermento de cacao, junto con 3 cepas de referencia (Tabla 1-2).

A partir de los crioviales almacenados a -80 °C se reactivó cada microorganismo en el medio de cultivo agar MRS $\frac{1}{2}$ por el método de estría en superficie, y se incubó a 37°C por 48 h. A partir de una colonia se inoculó el medio de cultivo caldo MRS $\frac{1}{2}$ y se incubó por a 37°C por 48 h y 150 rpm. Se ajustó la densidad óptica (OD) de cada cultivo a 0,5 unidades de absorbancia adicionando el medio caldo MRS $\frac{1}{2}$ y utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop Thermo-scientific/NanoDrop™ 2000c), a 600 nm de longitud de onda (OD₆₀₀).

2.3.2 Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria de Cadmio y de Arsénico

El ensayo de la CMI se realizó en placas de 96 pozos, en cada pozo se agregaron 190 µL de caldo de cultivo MRS $\frac{1}{2}$ suplementado con Cd(II) (nitrato de cadmio) o As(III) (arsenito de sodio), se evaluaron 8 concentraciones distintas, preparadas a partir de las disoluciones stock de 1000 mg/L (con concentraciones entre 0 mg/L y 100 mg/L de Cd(II) o de 0 mg/L

a 300 mg/L para As(III)), distribuidas en 8 columnas de cada placa. Se aplicaron 10 μ L de inóculo de las bacterias ($OD_{600} = 0,5$), utilizando 3 filas de cada placa por cepa, con el fin, de evaluar tres réplicas. Se utilizó como control negativo, el caldo de cultivo MRS $\frac{1}{2}$ suplementado o no con cadmio o con arsenito y sin el inóculo. Se incubaron las placas a 37°C por 48 h y con agitación de 150 rpm. Posteriormente, se determinó el crecimiento por medida de la densidad óptica a 595 nm de longitud de onda (OD_{595}) utilizando un lector espectrofotométrico de placas de Elisa (Bio- Rad/ ELISA iMark™). La CMI fue definida como la concentración más baja de Cd(II) o As(III) que inhibió el crecimiento microbiano después del tiempo de incubación. Las bacterias evaluadas que mostraron mayor CMI fueron consideradas las de mayor tolerancia (Bhakta et al., 2012).

2.3.3 Ensayos de tolerancia a pH ácido

Con los aislados que mostraron capacidad de crecer a mayores concentraciones de Cd(II) o de As(III) en el ensayo de CMI, junto con las cepas de referencia, se realizaron ensayos de tolerancia a las condiciones de pH ácido.

Se reactivaron los microorganismos de estudio en los medios de cultivo agar MRS $\frac{1}{2}$ y se preparó un inóculo en el medio de cultivo caldo MRS $\frac{1}{2}$, se incubó a 37°C por 48 h y con agitación de 150 rpm. La OD_{600} del cultivo se ajustó a 0,5 con el medio de cultivo caldo MRS $\frac{1}{2}$, y la suspensión se centrifugó (8000 rpm; 5 min) para obtener un pellet con aproximadamente 1×10^7 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL). La biomasa se resuspendió en 1 mL de Buffer Fosfato Salino (PBS) estéril (previamente ajustado a pH 2,5 con HCl 5 M), se incubó a 37 °C por 2 h, y agitación 150 rpm en *shaker* (Bhakta et al., 2012).

Se prepararon diluciones seriadas de cada una de las suspensiones (antes y después del contacto con el buffer ácido), se sembraron las diluciones 10^6 , 10^7 y 10^8 en los medios de cultivo agar MRS $\frac{1}{2}$, y se incubaron a 37 °C por 48 h, sin agitación (Bhakta et al., 2012). Finalmente, se calculó las UFC/mL de los cultivos antes y después del contacto con el buffer ácido y con estos valores se determinó la relación de viabilidad de acuerdo a la Ecuación 2.1.

$$\text{Relación de viabilidad} = \frac{\text{UFC/mL después de contacto con buffer ácido (pH 2,5)}}{\text{UFC/mL iniciales}} \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

Las bacterias que mostraron mayor valor de la relación de viabilidad después de contacto con buffer ácido se consideraron las más tolerantes a condiciones de acidez.

2.3.4 Ensayos de tolerancia a sales biliares

Con las bacterias más tolerantes a las condiciones ácidas se realizaron ensayos de tolerancia a las sales biliares. A partir de los crioviales se prepararon los inóculos en el caldo MRS½ y se incubaron a 37 °C por 48 h, con agitación de 150 rpm. Se ajustó la OD₆₀₀ a 0,5 con medio caldo MRS½ y a partir de esta suspensión se prepararon diluciones seriadas. Se inocularon las diluciones 10⁶, 10⁷ y 10⁸ en los medios de cultivo agar MRS½ suplementado o no con las sales biliares en las concentraciones de 0, 1, 2 o 4 g/L. Las cajas de petri de cultivo agar MRS½ inoculadas con las suspensiones, se incubaron a 37 °C por 48 h, sin agitación. Finalmente, se realizó el conteo de colonias en cada cultivo y se calcularon las UFC/mL. Las cepas que al final del ensayo mostraron mayor cantidad de UFC/mL en los medios de cultivo con mayor concentración de sales biliares se consideraron las más tolerantes (Bhakta et al., 2012).

2.4 Resultados

En una etapa previa fueron seleccionados 38 aislados bacterianos del género *Lactobacillus* spp., que, junto con 3 cepas de referencia (Tabla 1-2), fueron evaluados para la CMI frente al cadmio y al arsénico, y la tolerancia a las condiciones de acidez y de sales biliares, con el fin de seleccionar los más promisorios para los ensayos de remoción de Cd(II) y As(III) en el medio acuoso y en un modelo *in vitro* que simula el sistema digestivo humano.

2.4.1 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de cadmio y de arsénico

Las 41 bacterias del género *Lactobacillus* spp. se expusieron con 8 concentraciones diferentes de Cd(II) y As(III) y, de acuerdo a la forma de la curva de concentración de Cd(II) (0 a 100 mg/L) o As(III) (0 a 300 mg/L) en función del OD₅₉₅ (Anexo F), los valores de OD₅₉₅ fueron promediados y las bacterias agrupadas, obteniendo las curvas que se observan en la Figura 2-1. La asignación de cada uno de los microorganismos a los diferentes grupos se puede observar en la Tabla 2-1, junto con sus respectivos valores de CMI.

Tabla 2-1 Asignación de bacterias en los grupos de crecimiento de acuerdo a su comportamiento en las gráficas de OD₅₉₅ vs Concentración de (A) Cd(II) y (B) As(III), como se muestra en la Figura 2-1, y respectivos valores de CMI.

(A)	Grupo	Código de la cepa	CMI de Cd(II) (mg/L)
	1	JCM 1136	50 - 100
	2	C6	50 - 100
	3	JCM 1055, JCM 5818, C7, C16, A15, A23, A29	10 – 50
	4	C2, C3, C9, C11, C14, C15, C18, A5, A13, A19, A20	10 – 50
	5	A4, A10, A21, A24, A26, A30	10 – 50
	6	A11, A25, A27, A28	10 – 50
	7	C1, C12, A3, A6, A12, A17, A18, A31	5 – 10
	8	C20, A1, A16	1 – 5

(B)	Grupo	Código de la cepa	CMI de As(III) (mg/L)
	1	JCM 1055, JCM 5818	>300
	2	A17	>300
	3	C7, C9, A15, A19, A20, A26, A29	>300
	4	C1, C18, A3, A5, A23, A25	200 – 300
	5	C2, C6, C16, A1, A6, A11, A18, A27, A28, A30, A31	200 – 300
	6	JCM 1136, A13, A24	100- 200
	7	C11, C15, A12, A16, A21	100- 200
	8	C12, C14, C20, A10	100- 200
	9	C3, A4	50 - 100

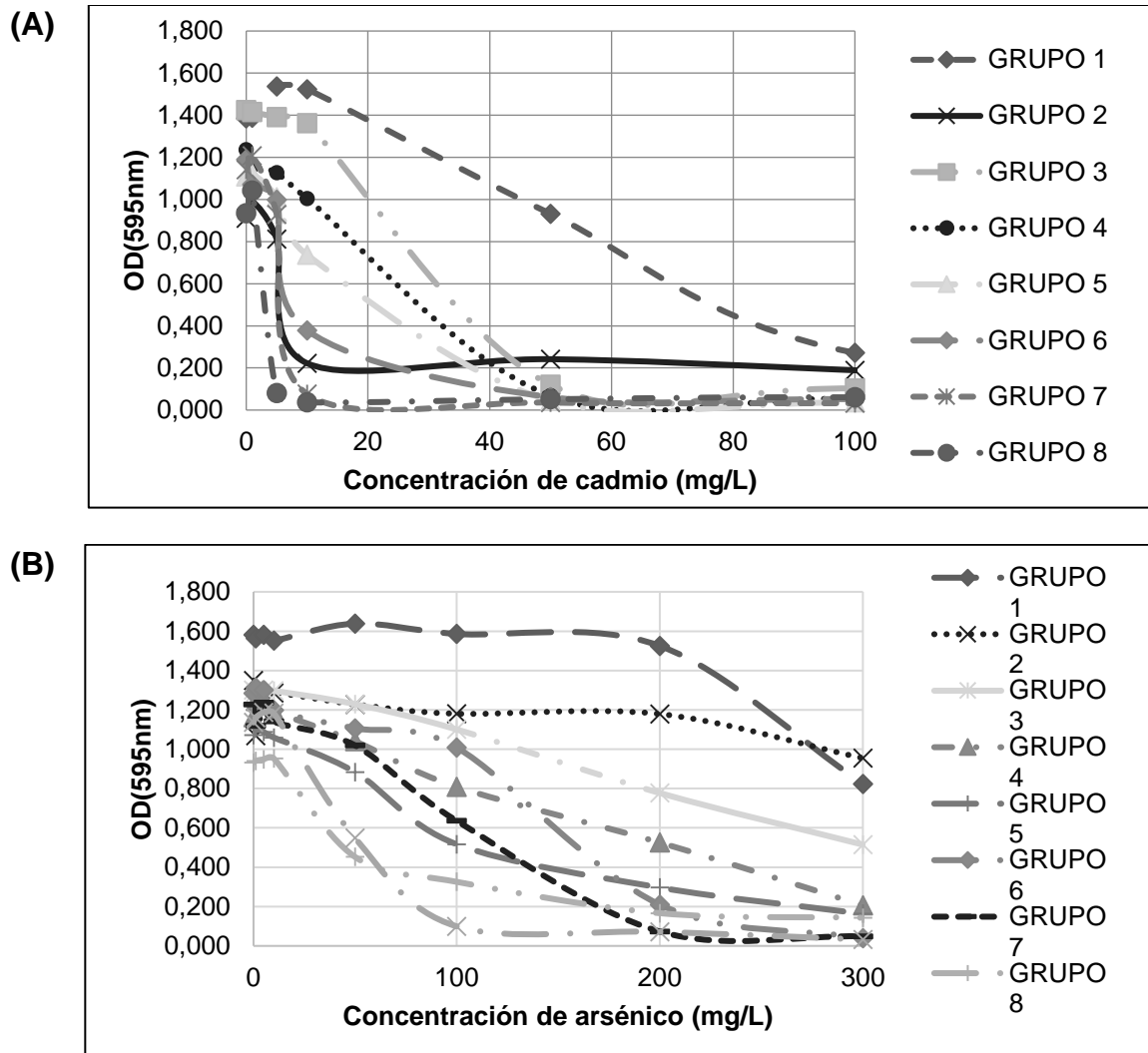


Figura 2-1 Crecimiento de cepas de trabajo en los medios de cultivo MRS_{1/2} suplementados con diferentes concentraciones de (A) Cd(II) (0 a 100 mg/L) y (B) As(III) (0 a 300 mg/L). Las bacterias fueron agrupadas de acuerdo a la similitud de comportamiento de las curvas de OD₅₉₅ vs concentración de metal(oide).

Los mayores valores de CMI encontrados fueron de 100 mg/L de Cd(II), mientras que para el As(III) se encontraron valores superiores a 300 mg/L. Las bacterias de *Lactobacillus* spp. aisladas a partir del fermento de cacao mostraron una mayor capacidad de crecer en presencia de As(III) respecto al Cd(II).

Las bacterias del grupo 1 presentaron mayor tolerancia a las concentraciones más altas de Cd(II) y As(III), y la CMI más elevada para los dos elementos tóxicos evaluados, mientras que los demás grupos se desarrollaron de manera menos favorable. Así, para la

selección de las bacterias con capacidad de crecer a mayores concentraciones de Cd(II) y de As(III) se dio prioridad a las que fueron asignadas a los 3 primeros grupos para cada elemento (ver Tabla 2-1).

Fueron seleccionadas *L. plantarum* (JCM 1055, A15, A19, A23, A26, A29, C9, C16), *L. kefir* (JCM 5818), *L. rhamnosus* (JCM 1136), *L. paracasei* (A17) y los aislados no identificados (C6, C7), que hacen parte de los 3 primeros grupos descritos en las Tablas 2-1.A y 2-1.B., para ensayos posteriores.

2.4.2 Ensayos de tolerancia a pH ácido

Los 10 aislados seleccionados y las 3 cepas de referencia, fueron evaluados en ensayos de tolerancia a acidez. En la Figura 2-2 se muestra la relación de la viabilidad, calculada a partir del conteo de UFC/mL del cultivo antes y después de permanecer en contacto con el buffer ácido (PBS pH 2,5) por 2 h (Ecuación 2.1).

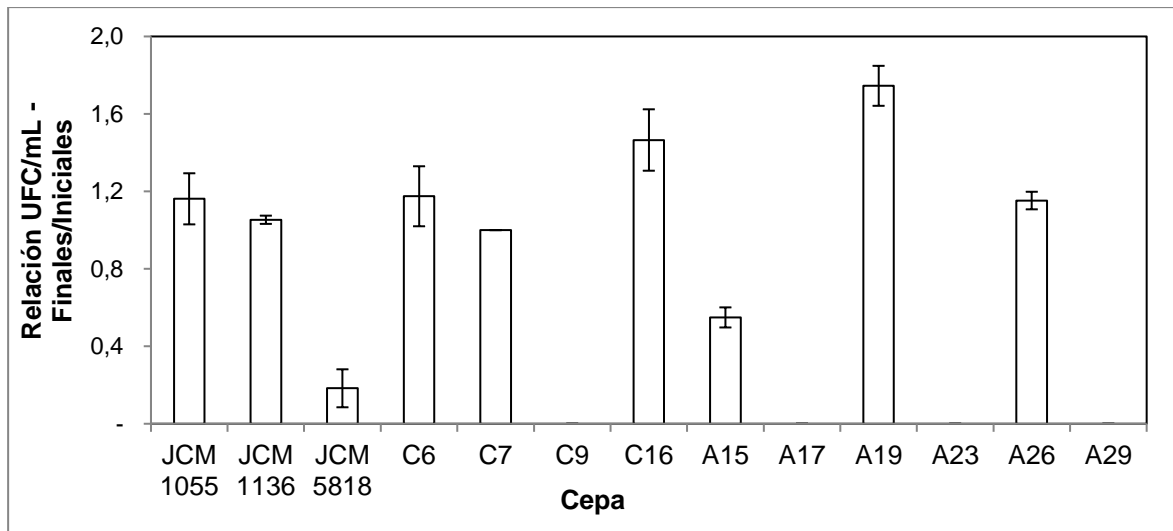


Figura 2-2 Relación de UFC/mL de *Lactobacillus* spp. antes y después del contacto con buffer PBS ácido (pH 2,5).

De las 13 bacterias evaluadas, las 3 cepas de referencia y 6 bacterias aisladas a partir de fermento de cacao (*L. plantarum* JCM 1055, A15, A19, A26, C16; *L. kefir* JCM 5818, *L. rhamnosus* JCM 1136 y las bacterias no identificadas C6, C7) permanecieron viables después de estar en contacto con un buffer ácido.

A partir de las cepas que presentaron tolerancia a las condiciones de acidez, de acuerdo

al valor de la relación de la viabilidad, se seleccionaron las bacterias *L. plantarum* JCM 1055, A19, A26, y C16, y el aislado no identificado C6 para los siguientes ensayos de tolerancia a sales biliares.

2.4.3 Ensayos de tolerancia a sales biliares

Las bacterias seleccionadas por su tolerancia a las condiciones de acidez fueron evaluadas en los ensayos de tolerancia a sales biliares. Los microorganismos fueron inoculados en el medio de cultivo MRS½ sin o con la presencia de sales biliares, a las concentraciones (1, 2, 4 g/L), para estar en contacto con los mismos durante su crecimiento. La Figura 2-3 muestra las UFC/mL de cada bacteria después de su crecimiento en estas condiciones.

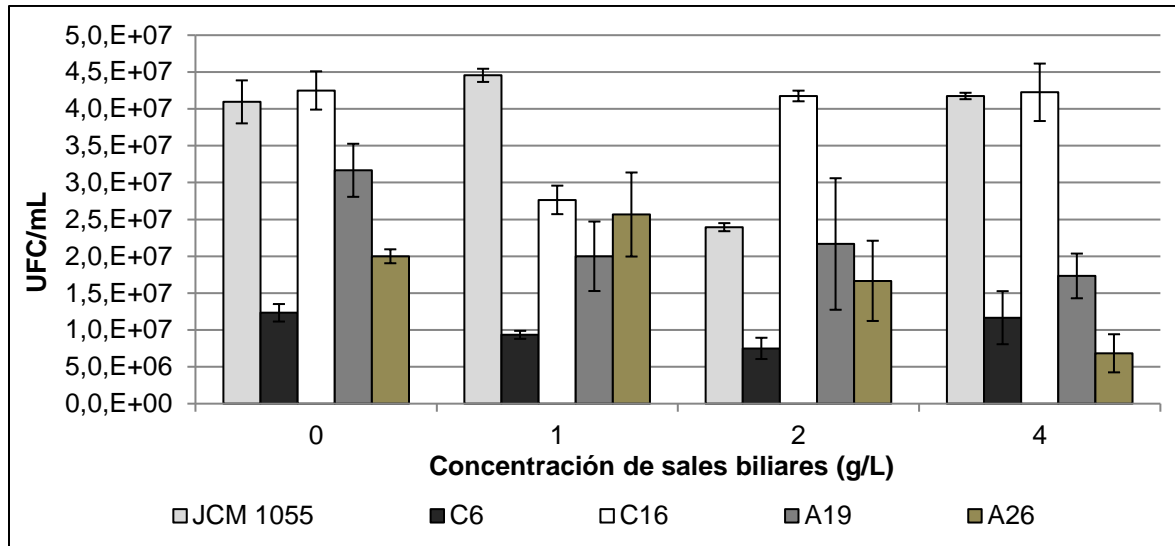


Figura 2-3 Crecimiento (UFC/mL) de *Lactobacillus* spp. aislados y cepa de referencia, en medio de cultivo con diferentes concentraciones de sales biliares.

Todas las cepas presentaron crecimiento en el mismo orden de magnitud de 10^7 UFC/mL. No se observaron cambios significativos en el recuento de las bacterias en los medios de cultivo con diferentes concentraciones de sales biliares (0, 1, 2 y 4 g/L). Las 5 bacterias evaluadas presentaron tolerancia a las condiciones de altas concentraciones de sales biliares (4 g/L) (Figura 2-3). Tomando como parámetros de selección las 3 variables (CMI a Cd(II) y As(III), y la tolerancia a las condiciones de pH ácido y a sales biliares) fueron seleccionados los aislados de fermento del cacao *L. plantarum* A19 y *L. plantarum* C16 y

la cepa de referencia *L. plantarum* JCM 1055, para posteriores ensayos de remoción de cadmio y de arsénico.

2.5 Discusión

Se seleccionaron bacterias del género *Lactobacillus* spp., aisladas a partir del fermento de cacao, capaces de tolerar altas concentraciones de Cd(II) y As(III), y bajo condiciones de pH ácido y sales biliares cercanas a las encontradas en un modelo *in vitro* del sistema digestivo humano, para ser evaluadas en los procesos de remoción.

Saito et al. (2014) reportó previamente el aislamiento y la caracterización de *Lactobacillus* spp. a partir de fermento de cacao, evaluando su capacidad para resistir condiciones *in vitro* que simulan la digestión gastrointestinal del ser humano. En este estudio las bacterias evaluadas son tolerantes a las condiciones de pH ácido y concentraciones de sales biliares del modelo *in vitro* evaluado.

Las bacterias aisladas en los medios de cultivo suplementados con las concentraciones de 1 mg/L de Cd(II) o 0,1 mg/L de As(III) (Capítulo 1) fueron inoculadas en contacto con Cd(II) en concentraciones entre 0 y 100 mg/L y con As(III) en concentraciones entre 0 y 300 mg/L. El valor más alto de CMI encontrado para Cd(II) fue de 100 mg/L, mientras que para As(III) se encontraron valores de CMI superiores a 300 mg/L.

En los estudios reportados por Bhakta et al. (2010 y 2012), se encontraron resultados muy similares a los del presente estudio utilizando aislados de BALs. Estos autores reportan valores de CMI para Cd(II) de 50 a 250 mg/L y para As(III) de 1000 a 2000 mg/L, un comportamiento similar, al obtenido en este estudio en los ensayos en el medio de cultivo MRS $\frac{1}{2}$ suplementados con Cd(II) o As(III), que están en un rango de 1 a 100 mgCd(II)/L y de 50 a >300 mgAs(II)/L, respectivamente. La diferencia de la baja capacidad de crecer en medios con altas concentraciones de Cd(II) respecto a As(III), puede explicarse por los mecanismos de tolerancia de las bacterias a estos elementos, los cuales son diferentes para Cd(II) y As(III), como se explica a continuación.

Zhai et al. (2017) realizaron un estudio de proteómica con el fin de determinar las rutas metabólicas que se activan con la presencia de cadmio en el medio y reportaron que *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 (CMI > 50 mg/L), activa mecanismos de conservación de energía (los cuales consisten en la alteración de las rutas metabólicas), y produce

moléculas para aumentar la hidrofobicidad de la pared celular, y proteínas de membrana capaces de capturar el Cd(II) o de inducir el estrés osmótico. Las proteínas que juegan un papel importante en la tolerancia al cadmio son: P2b 18, CadA, mntA y lp_3327 (Zhai et al., 2017). Otros mecanismos reportados consisten en la complejación por las proteínas ricas con grupos sulfuro, la segregación en vesículas o la formación de precipitados intracelulares (Gerbino et al., 2014).

La alteración de las rutas metabólicas de producción de energía se ha evidenciado en otros estudios (Gerbino et al., 2014), ya que los *Lactobacillus* spp. que se encuentran en contacto con cadmio incrementan su tiempo de latencia en las curvas de crecimiento. Otro mecanismo, que consiste en la producción de proteínas de superficie, ha sido reportado por Gerbino et al., (2011). Estos autores reportan que algunos metales divalentes, entre ellos el cadmio, son atrapados por las proteínas en la superficie de la capa S.

Con respecto al As(III), puede ser transformado químicamente por los microorganismos mediante reacciones de metilación, e incluso puede cambiar su estado de oxidación, interaccionando con las proteínas (con grupos tiol), como la piruvato deshidrogenasa (PDH), cambiando su estructura e inhibiendo su función. La inhibición de la PDH promueve la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales están implicadas en la inhibición de enzimas

El As(III) puede ingresar a las bacterias mediante proteínas transportadoras de membrana, como las acuagliceroporinas, donde la alta producción de esta proteína y la baja concentración de glutatión en la superficie celular puede inducir el ingreso de As(III) a la célula (Shen et al., 2013). Estas acuagliceroporinas están presentes en el género *Lactobacillus* spp. (Bienert et al., 2013).

El ingreso de Cd(II) a las bacterias del género *Lactobacillus* spp. requiere de condiciones menos específicas respecto al As(II), ya que al ser un catión divalente (Cd^{+2}) ingresa a la célula utilizando mecanismos de transporte de elementos esenciales (como el Zn) (Zhai et al., 2017), mientras que el ingreso del As(III) a la célula depende de la presencia de proteínas de transporte específicas. El As(III) podría requerir mayor concentración en el medio para ingresar a la célula y causar daños a nivel metabólico (Halttunen et al, 2007a; Shen et al., 2013).

En los ensayos de tolerancia a pH ácido, 9 de 13 *Lactobacillus* spp. permanecieron viables

después del ensayo. En un estudio previo (Bhakta et al., 2012), se obtuvieron resultados similares, ya que de 96 cepas de BALs evaluadas, 46 mostraron tolerancia a las condiciones de acidez. Los mecanismos de tolerancia a la acidez reportados son:

1) la homeostasis (producción de metabolitos para mantener condiciones estables a nivel celular); 2) de protección y reparación macromolecular; 3) la activación del sistema *Gad*; y 4) un sistema glutamina- dependiente. (De Angelis et al., 2011; Liu et al., 2015):

En los ensayos de tolerancia a sales biliares fueron evaluados 5 aislados (*L. plantarum* JCM 1055, A19, A26, C16 y el aislado no identificado C6), los cuales presentaron tolerancia a 4 g/L de sales biliares. Bhakta et al. (2012) encontraron que de 94 cepas de BALs evaluadas solamente 12 presentaron tolerancia a 4 g/L de sales biliares. Esto indica que no todas las BALs presentan tolerancia a las altas concentraciones de sales biliares.

L. plantarum JCM 1055, A19, A26 y C16 y el aislado no identificado C6 presentaron mayor capacidad de crecer a altas concentraciones de Cd(II) y As(III), en condiciones de pH ácido y en medios con 4 g/L de sales biliares. Sin embargo, para efectos de este trabajo se seleccionaron 3 de estos microorganismos (*L. plantarum* JCM 1055, A19 y C16).

2.6 Conclusiones

Se demostró que las BALs del género *Lactobacillus* spp., aisladas de fermento de cacao tienen la capacidad de tolerar concentraciones de hasta de 100 mg/L de Cd(II) y superiores a 300 mg/L de As(III); algunas de ellas capaces de tolerar las condiciones de acidez (a pH 2,5 durante 2 h) y alta concentración de sales biliares (4 g/L). Fue posible seleccionar, de acuerdo a estos criterios, tres cepas de *Lactobacillus plantarum* (JCM 1055, A19 y C16) para ensayos de remoción de Cd(II) y As(III) en medio acuoso y en un modelo RIVM *in vitro* que simula el sistema digestivo humano

3. Capítulo 3. Ensayos de remoción de cadmio y arsénico con tres cepas de *Lactobacillus plantarum* utilizando un modelo *in vitro* que simula el sistema digestivo humano

3.1 Resumen

En la literatura se han reportado diversos estudios relacionados con la capacidad de remoción de cadmio y de arsénico en medio acuoso por BALs del género *Lactobacillus* spp., se reportan porcentajes de hasta 100% de remoción de cadmio y 60% de arsénico. Además, se ha reportado que estas bacterias tienen la capacidad de disminuir la bioaccesibilidad de cadmio en un 40% en un modelo *in vitro* del sistema digestivo humano. En una etapa previa de este trabajo fueron seleccionados *L. plantarum* JCM 1055, y los aislados nativos del fermento de cacao *L. plantarum* A19 y *L. plantarum* C16, quienes mostraron la mejor capacidad para tolerar la presencia de Cd(II) y As(III), así como, las condiciones de acidez (pH 2,5) y a sales biliares (1, 2 y 4 g/L). El objetivo fue evaluar la capacidad de estos microorganismos para la remoción de cadmio y arsenito en un modelo *in vitro* que simula el sistema digestivo humano. Para ello, inicialmente se realizaron ensayos en medio acuoso, utilizando un diseño experimental factorial 2^3 en el cual se evaluó el efecto de tres variables (en dos niveles) sobre la capacidad de remoción de cadmio, y un diseño experimental factorial 2^2 para el caso del arsenito. Se encontraron porcentajes de remoción de cadmio de hasta 100% con los tres *L. plantarum* en condiciones de 1 mg/L de cadmio, pH 5 y con concentración de biomasa de 1,5 g/L. En el caso del arsenito, el porcentaje de remoción fue de hasta 20% con *L. plantarum* C16 en condiciones de 0,1 mg/L de arsenito, pH 5 y con concentración de biomasa de 1,5 g/L. Los coeficientes de unión específica de cadmio mostraron valores muy superiores en relación

al arsenito (40.000 mg Cd /g comparado con 0,02 mg As /g). El efecto de las tres bacterias de *L. plantarum* sobre la bioaccesibilidad de Cd (II) y As(III) fue evaluado en un modelo *in vitro* del sistema digestivo humano RIVM, donde se encontró una disminución de la bioaccesibilidad de cadmio y arsenito hasta en un 56% y 62%, respectivamente. Estos resultados muestran un buen potencial de los aislados de la especie *L. plantarum* para ser aplicados en los procesos biotecnológicos, como por ejemplo la detoxificación de elementos tóxicos en los seres humanos.

3.2 Introducción

Algunos géneros de BALs se reconocen como generalmente seguros para el consumo, como por ejemplo *Lactobacillus* spp., quienes usualmente, si se comprueba su supervivencia y su efecto positivo sobre la salud, son considerados probióticos (Sun et al., 2015). Además, algunos de estos microorganismos podrían tener la capacidad de absorber elementos tóxicos, por lo que presentan gran potencial para la detoxificación (Monachese, 2012).

Halttunen et al. (2003) reportaron el primer acercamiento al uso de BALs para remoción de metales pesados y, posteriormente, el mismo grupo de investigación, en la publicación de Ibrahim et al. (2006), reportaron el estudio de la remoción de cadmio con la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* LC-705, donde construyeron isotermas de adsorción de los elementos, siguiendo el modelo Langmuir, mediante el cálculo del coeficiente de unión específica (Q). Se reportó el efecto significativo del pH y del uso de biomasa viva o muerta (hervida) sobre la remoción de cadmio en medio acuoso. Posteriormente, estos investigadores evaluaron un conjunto de LABs resistentes al cadmio y su posible uso como bioacumuladoras, encontrando que la cepa *L. fermentum* ME3 mostró la mejor actividad para la remoción de cadmio, logrando un 81% de remoción (Halttunen et al., 2007b). También, reportaron el estudio de lactobacilos modificados superficialmente, mediante la unión de los grupos funcionales metilo y amina, que alteran el punto isoeléctrico de la superficie de las bacterias, con el objetivo de aumentar la carga superficial para incrementar la afinidad con las especies de arsénico, que se encuentran principalmente como aniones (Halttunen et al., 2007a). Se encontró que *L. casei*, modificada superficialemente con el grupo amino, tiene la capacidad de remover As (V), sin embargo, el complejo As-bacteria es muy poco estable, y es obtenido a un pH neutro. Los autores reportaron 38% de la remoción usando 0,1 mg/L arsénico (Halttunen et al., 2007a).

Singh & Sarma (2010), reportan un porcentaje de remoción de As de 60% con una cepa de *L. plantarum*. Por estudios de FTIR proponen que los grupos carboxilo e hidroxilo en bacterias están involucrados en los procesos de remoción de este metaloide.

Posteriormente, Monachese (2012), en su tesis de doctorado, evaluó la capacidad para bioacumular cadmio y arsénico por probióticos, y enfatizó en la formulación de los alimentos con función detoxificadora, encontrando porcentajes de remoción mayores para cadmio que para plomo y mucho más bajos para arsénico. En los ensayos de remoción en medio acuoso encontró porcentajes de remoción de cadmio y arsénico hasta de un 68% y 11%, respectivamente. También, verificó el efecto del contacto con las líneas celulares Caco-2, encontrando que los *Lactobacillus* spp., evaluados tienen la capacidad de reducir la mortalidad de estas células ante la presencia de cadmio y arsénico en altas concentraciones (Monachese, 2012).

Bhakta et al. (2010; 2012) reportaron eficiencias de remoción de Cd(II) y As(III) utilizando BALs aisladas de lodos y sedimentos obtenidos en las zonas costeras de la India y de Vietnam, y comprobaron su potencial antimicrobiano y de supervivencia en condiciones de pH ácido y de altas concentraciones de sales biliares. En el primer estudio se encontraron eficiencias de remoción para As(III) entre 25% y 41%, partiendo de 0,1 mg/L, con *Pediococcus* spp.. Por otro lado, se reportaron eficiencias de remoción de 69 a 87%, partiendo de 1 mg/L de cadmio con *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp. y *Enterococcus* spp.

Gerbino en el año 2014, enfatizó su estudio en evaluar los mecanismos de dos cepas de estas bacterias para remover metales pesados, y reportó 100% de remoción de cadmio con *L. kefir* JCM 5818 (evaluada en el presente trabajo) a una concentración EC50 (0,011 mM), que corresponde a la concentración de cadmio en la que los microorganismos crecen y producen la misma cantidad de biomasa respecto al medio de cultivo sin cadmio. Se sugiere que proteínas S, ubicadas en la superficie celular, ejercen un importante papel en los procesos de remoción de estos elementos tóxicos (Gerbino et al., 2014).

En otro estudio (Zhai et al., 2013), usaron *L. plantarum* CCFM8610, perteneciente a la Colección de Cultivos Microbianos de Alimentos de la Universidad de Jiangnan, China, y mostró porcentajes de hasta 77% de remoción de Cd(II) en medio acuoso. Esta bacteria posteriormente, fue evaluada en un modelo murino donde a los ratones se le suministró la bacteria junto con alimento suplementado con una concentración conocida de cadmio.

Después de un tiempo de exposición, los ratones fueron sacrificados y se determinó la concentración de cadmio en sus órganos, encontrándose mayor en las heces comparado con los controles, mientras que en el hígado y riñones la concentración fue más baja. Se realizaron estudios histopatológicos encontrando que las concentraciones evaluadas no generaron un daño significativo en los órganos de los ratones. De este estudio se concluye que la cepa bacteriana evaluada produjo un efecto protector ante la toxicidad del cadmio en los ratones. Estos estudios llevaron al registro de una patente (US9451781 B2) (Cheng et al., 2012).

Kumar et al. (2017) evaluaron la bioaccesibilidad del cadmio en un modelo *in vitro*, encontrando que las 10 cepas de *Lactobacillus* spp. estudiadas redujeron el porcentaje de bioaccesibilidad del metal, donde *L. plantarum* HD48 mostró mayor actividad (3,562 mg Cd /g de biomasa) reduciendo hasta 41% la bioaccesibilidad de cadmio. También, se estudió la desorción del metal de las bacterias, encontrando que no fue significativa, y que el complejo metal-bacteria es estable. Los estudios de microscopía electrónica de transmisión con esa cepa indicaron que tiene la capacidad de acumular el cadmio en la superficie mediante la formación de agregados.

Finalmente, Zhai et al. (2019) demostraron que la aplicación de *L. plantarum* CCFM8610 en un proceso de fermentación de arroz en una alternativa promisorio para remover Cd. Lo anterior demuestra el gran potencial de las BALs del género *Lactobacillus* spp. para unir metales tóxicos y ser aplicadas a procesos biotecnológicos relacionados con la mitigación de este tipo de contaminantes en diferentes matrices ambientales.

De acuerdo con diferentes reportes (Ibrahim et al., 2006; Halttunen et al., 2007a; Halttunen et al., 2007b; Singh & Sarma, 2010; Monachese, 2012; Bhakta et al., 2012; Kinoshita et al., 2013; Zhai et al., 2013; Gerbino et al., 2014; Polak-Berecka et al., 2017; Kumar et al., 2017), las principales variables implicadas en procesos de remoción son el pH, la concentración del metal, la viabilidad de la bacteria, la cantidad de biomasa, el tiempo de contacto y las características superficiales de las bacterias. De acuerdo con las últimas publicaciones, las BALs tienen propiedades que les brindan un potencial como probióticos, y a la vez como removedores de metales y metaloides. En su superficie contienen proteínas S con grupos carboxilo y sulfhidrilo que interactúan con cationes metálicos, y en su pared celular, en el peptidoglicano, contienen grupos amino cargados positivamente que les permiten interactuar con los metaloides aniónicos, y adicionalmente, producen exopolisacáridos que también favorecen la interacción con metales. La presencia de estos

grupos en la superficie, hace que el pH en el que se encuentran sea determinante para la interacción bacteria metal/metaloide y, por lo tanto, la remoción es dependiente del pH del medio en el que se encuentren. Adicionalmente, los estudios de microscopía electrónica realizados por varios de estos investigadores demuestra que son acumulados al interior de la célula.

El uso de bacterias para la remoción de contaminantes como Cd(II) y As(III) se debe a su alta tolerancia, que está asociada a la presencia de genes de resistencia que se expresan bajo condiciones de estrés. Los mecanismos de remoción reportados incluyen procesos de adsorción, asimilación, intercambio iónico, formación de complejos, quelación, inmovilización, especiación (cambio de estado de oxidación) y microprecipitación (biocristalización) (Das & Dash, 2017). Estos procesos dependen de la disponibilidad del grupo funcional, la concentración del metal, la carga superficial y de los metales catiónicos (Veglio & Beolchini, 1997).

La bioacumulación de metales se da en células viables, ya que involucra el metabolismo del microorganismo. Tienen regulación a la entrada, almacenamiento y expulsión de los iones metálicos al interior celular (Veglio & Beolchini, 1997).

Existen distintas formas de estudiar la disponibilidad de metales y metaloides tóxicos, utilizando modelos *in vivo* o *in vitro*. Los modelos *in vivo* en los humanos o en los animales son costosos, de mayor tiempo e involucran requerimientos éticos y legales. En contraste, los modelos *in vitro* son más rápidos, económicos y no requieren el uso de animales ni humanos. Adicionalmente, dan una aproximación cercana de la disponibilidad de estos contaminantes (Yuswir et al., 2013). Por otro lado, estudios en animales y en humanos sugieren que la biodisponibilidad del compuesto varía significativamente de acuerdo al alimento, procesamiento y preparación (Van de Wiele et al., 2007).

La biodisponibilidad de una molécula o compuesto que ingrese al organismo puede estar subdividida en tres diferentes procesos (Ecuación 3-1) (Lipinski et al., 1997; Palm et al., 1996):

$$F = F_B + F_A + F_H \quad (\text{Ecuación 3-1})$$

donde, F representa la fracción biodisponible del contaminante, F_B representa la fracción liberada a partir de la matriz (bioaccesible), F_A representa la fracción de F_B que es

transportada por la membrana (absorbida) y F_H representa la fracción metabolizada, las cuales se representan en la Figura 3-1 durante las fases del sistema digestivo humano.

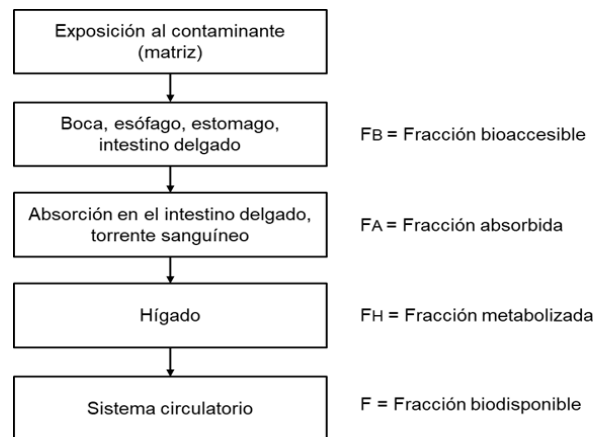


Figura 3-1 Representación esquemática de los procesos de biodisponibilidad de moléculas en el sistema digestivo humano (bioaccesibilidad, absorción y metabolización) (tomado y adaptado de Sips et al., 2001).

La cuantificación de la biodisponibilidad, e incluso de la bioaccesibilidad, es difícil debido a que están involucrados procesos complejos. A pesar de que los estudios con animales proveen la mejor información, las pruebas *in vitro* proveen una buena aproximación sin la necesidad de causar daño a los animales (Sips et al., 2001).

La digestión es un proceso gastrointestinal en el que los alimentos son degradados y los nutrientes son absorbidos por el organismo. Es un proceso complejo que es diferente para cada organismo. Sin embargo, se han desarrollado aproximaciones que permiten que sea simulado en modelos simplificados (Versantvoort et al., 2002). Algunos de estos son (Van de Wiele et al., 2007):

-- PBET (*in vitro* Physiologically Based Extraction Test) (Reino Unido), consiste en la simulación de jugos gástricos e intestinales por fases en un sistema rotatorio. Se utilizan disoluciones de composición más simple respecto a otros modelos.

-- E DIN 19738 (Alemania), es un modelo gastrointestinal estático que usa jugos digestivos sintéticos de saliva, jugos gástricos y jugos intestinales, los cuales se adicionan de forma continua en un medio agitado.

-- RIVM (Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu: Instituto Nacional de Salud Pública) (Países Bajos), consiste en el empleo de diferentes fases para simular la digestión

humana, mediante el uso de disoluciones de composición compleja, más cercana a la fisiología humana. Se hace adición de disoluciones de forma continua en un sistema rotatorio.

-- SHIME (Bélgica) (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem), también es estático y contempla el uso de diferentes jugos digestivos y de microbiota gastrointestinal. Se compone de gradientes de pH, de diferentes comunidades microbianas y disoluciones de jugos digestivos.

-- TIM (Países Bajos) (TNO gastroIntestinal Model), es un modelo dinámico que contempla el tránsito del contaminante a través del tracto gastrointestinal, utilizando bombas peristálticas y membranas de diálisis. Además, contempla la adición de forma continua de gradientes de pH, de enzimas y demás componentes.

En estos modelos se consideran principalmente 3 fases (Yuswir et al., 2013):

Boca: se da una ruptura mecánica de los alimentos en presencia de saliva con un pH de 6,5. Los alimentos son masticados y fragmentados en pequeños trozos y solubilizados en la saliva. Puede durar desde unos pocos segundos hasta unos pocos minutos. Las muestras son transportadas por el esófago hasta el estómago.

Estómago: se disuelven los alimentos en presencia de ácido clorhídrico con pH de 1 a 5, y son liberados los metales y los metaloides tóxicos que antes estaban unidos a los carbonatos, sulfuros y minerales. Las proteasas (pepsina), que son más efectivas en pH ácido, rompen las proteínas y ayuda a la disolución de las muestras. Los alimentos se retienen en el estómago desde pocos minutos (8 min) hasta horas (3 h).

Intestino: se liberan los jugos intestinales en tres segmentos (duodeno, yeyuno e íleon). Los alimentos se someten a algunos tratamientos que contienen enzimas como la tripsina, la pancreatina y la amilasa, así, como carbonatos y sales biliares. En este proceso se descomponen los polisacáridos, las proteínas, los lípidos y las grasas lo que facilita la absorción de los nutrientes y de los contaminantes.

En esta etapa final del trabajo se pretendió evaluar los aislados de fermento de cacao *L. plantarum* C16 y A19, y la cepa de referencia *L. plantarum* JCM 1055, previamente seleccionados por su capacidad de crecer en medios con presencia de Cd(II) y de As(III), y en condiciones de acidez y presencia de sales biliares, en ensayos de remoción de Cd(II) y As(III) en medio acuoso y en un modelo *in vitro* RIVM que simula el sistema digestivo

humano.

3.3 Materiales y Métodos

3.3.1 Determinación de las curvas de crecimiento

Con el fin, de conocer de forma expedita la concentración de la biomasa en peso seco (g/L) durante los ensayos de remoción, y de normalizar las condiciones de crecimiento de las cepas de trabajo, se determinó el tiempo de crecimiento de mayor actividad metabólica y la relación de OD600 con la concentración de biomasa en peso seco.

Para determinar las curvas de crecimiento, primero, se reactivaron las cepas de trabajo a partir de los crioviales almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio de cultivo agar MRS $\frac{1}{2}$ (a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h). A partir de una colonia aislada se inocularon 3 mL de medio de cultivo caldo MRS $\frac{1}{2}$ y, después de incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h y con agitación de 150 rpm), se inocularon 500 mL de medio de cultivo caldo MRS $\frac{1}{2}$ en una relación 2 % v/v, incubando a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación de 150 rpm. En condiciones asépticas, se tomaron alícuotas de 2 mL cada 4 h y se le realizó la determinación de OD600 en las alícuotas (utilizando un espectrofotómetro NanoDrop Thermo-scientific/NanoDrop™ 2000c). Los valores obtenidos se graficaron hasta que se observó un comportamiento de fase estacionaria, momento en el que se detuvo el ensayo.

3.3.2 Determinación de la relación Biomasa Seca con OD₆₀₀

A partir de los crioviales preservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se preparan 500 mL de cultivo de las bacterias con el tiempo de incubación establecido de acuerdo a la curva de crecimiento. A partir de este cultivo se lavó la biomasa con disolución salina de 0,85% p/v NaCl y se prepararon 10 mL de las diluciones 1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{6}$, utilizando disolución salina, por triplicado, en tubos falcon de 15 mL (previamente secos y pesados) y se determinó el valor de OD600. Se centrifugó cada dilución (8.000 rpm por 5 min) y se separó la biomasa precipitada del sobrenadante. Los tubos con el precipitado se colocaron en una estufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 h, se dejaron enfriar por 30 min a temperatura ambiente y se pesaron.

Finalmente, se calculó el valor de biomasa seca (g) por litro (L) de dilución, se determinó la gráfica del valor de OD600 en función de la biomasa seca (BS) (g/L) y se calculó la ecuación de la gráfica de la forma $Y = m X + b$ (ecuación de tendencia lineal).

3.3.3 Evaluación de la capacidad de remoción de cadmio y de arsénico

Utilizando los tres *L. plantarum* (JCM 1055, A19 y C16) seleccionados y caracterizados (tiempo de crecimiento y relación de OD600 con BS establecidos), se realizaron inicialmente ensayos de remoción en medio acuoso, evaluando la significancia de algunas variables como pH, concentración de biomasa (g/L) o concentración de metal(oide).

Con el fin de determinar la capacidad de remoción de Cd(II) de las cepas de trabajo se utilizó un diseño experimental factorial 2³, evaluando tres variables con dos niveles cada una, de acuerdo a la Tabla 3-1.A, y siguiendo una metodología modificada basada en la descrita por Kinoshita et al. (2013) y Gerbino et al. (2014). Se preparó un inóculo a partir de los crioviales preservados a -80 °C, de 500 mL en medio de cultivo caldo MRS½, de acuerdo a metodología descrita en el numeral 3.3.1. Se lavó biomasa precipitada, utilizando agua MiliQ estéril (30 mL por lavado, centrifugando a 8.000 rpm por 10 min cada vez). Posteriormente, se determinó la OD600 de la suspensión de la biomasa concentrada en 30 mL de agua MiliQ estéril. Con base al valor de OD600 se determinó el valor de BS (g/L). Utilizando el valor de BS de la suspensión de biomasa concentrada se realizaron las diluciones respectivas para obtener 10 mL de suspensiones de 0,5 g/L y 1,5 g/L de biomasa por unidad experimental (Tabla 3-1.B), en disoluciones de concentraciones de 1 mg/L o 10 mg/L Cd(II) a pH 2 o 5. Cada unidad experimental se incubó a 37 °C por 1 h y agitación de 150 rpm. Posteriormente, se centrifugó a 8.000 rpm por 5 min y se tomó una cantidad de 5 mL del sobrenadante.

Para determinar la capacidad de remoción de As(III) de las cepas de trabajo se utilizó un diseño experimental factorial 2², evaluando dos variables con dos niveles cada una, de acuerdo a la Tabla 3-1.B, y siguiendo la metodología descrita previamente para los ensayos de remoción de Cd(II). Se prepararon suspensiones de biomasa de 0,5 g/L y 1,5 g/L, en disoluciones de 1 mg/L As (III) a pH 5 o 8. En total, se evaluaron 4 condiciones por triplicado, las cuales se incubaron y centrifugaron para obtener el sobrenadante.

Tabla 3-1 Condiciones evaluadas en los diseños experimentales para ensayos de remoción de (A) Cd(II) y (B) As(III) en medio acuoso.

(A)	Factor	Nivel bajo	Nivel alto
	pH	2	5
	Concentración de biomasa (g/L)	0,5	1,5
	Concentración de Cd(II)(mg/L)	10,0	1,0

(B)	Factor	Nivel bajo	Nivel alto
	pH	5	8
	Concentración de biomasa (g/L)	0,5	1,5

Para cada uno de los sobrenadantes se realizó la cuantificación de Cd (II) utilizando la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica de Llama (Espectrofotómetro Perkin Elmer AAnalyst 300) y de As(III), utilizando la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica Acoplado a Generación de Hidruros (Espectrofotometría Analytik jena ContraAA ® 700).

Se calcularon los porcentajes de remoción de acuerdo a la Ecuación 3-2.

$$\% \text{ Remoción} = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3-2})$$

y se calculó el coeficiente de unión específica (Q) de acuerdo a la Ecuación 3-3.

$$Q = (C_i - C_f) \frac{V}{Bm} \quad (\text{Ecuación 3-3})$$

donde, C_i es la concentración inicial de Cd(II) o As(III), C_f es la concentración del metal(oide) después del tratamiento de remoción, V es el volumen de la unidad experimental y Bm corresponde a la masa de bacteria en la unidad experimental (Ibrahim et al., 2006; Kumar et al., 2017).

Utilizando los porcentajes de remoción como factor de respuesta, se realizó un análisis estadístico con *Rstudio* (<https://www.rstudio.com/>), y se obtuvieron gráficas de Pareto, en las cuales se representa la significancia de variables e interacción.

Los ensayos de remoción de Cd(II) en medio acuoso fueron realizados con la colaboración de una estudiante de pregrado de la carrera de Química (Ana María Guzmán Beltrán) durante el desarrollo de su trabajo de grado en el grupo GERMINA. Todo el trabajo fue realizado bajo orientación y acompañamiento de la autora y orientación de los directores de tesis.

3.3.4 Evaluación de la capacidad de remoción de cadmio y de arsénico en un modelo *in vitro* del sistema digestivo humano

Se evaluó la capacidad de las cepas *L. plantarum* (JCM 1055, A19 y C16) de disminuir la bioaccesibilidad de Cd(II) y As(III) en un modelo *in vitro* que simula el sistema digestivo humano, llamado RIVM, reportado por el Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente de Países Bajos (Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Nederland) (Versantvoort et al., 2005; Kumar et al., 2017). Se preparó un inóculo de 500 mL en medio de cultivo caldo MRS½ a partir de los crioviales preservados a -80 °C, de acuerdo a la metodología descrita en el numeral 3.3.1. Posteriormente, se separó la biomasa, se lavó y se determinó el valor de BS (g/L) de acuerdo a la metodología descrita en el numeral 3.3.2. Utilizando el valor de concentración de biomasa (g/L) en la suspensión concentrada, se prepararon suspensiones de biomasa de 1,5 g/L de cada bacteria, en disoluciones de concentraciones de 1 mg/L de Cd(II) o de 0,1 mg/L de As(III), pH inicial de 5. Siguiendo la secuencia esquematizada en la Figura 3-2.A, por cada unidad experimental se adicionaron 4,5 mL de la suspensión bacteriana/metal y 6 mL de solución sintética de saliva (Tabla 3-2), manteniendo en rotación a 37 °C por 5 min (Figura 3-2.B). Después, se agregó la disolución de 12 mL de jugos gástricos (Tabla 3-2) y se mantuvo el sistema en rotación a 37 °C por 2 h. Finalmente, se adicionó 12 mL de disolución de jugos duodenales, 6 mL de jugos biliares (Tabla 3-2) y 2 mL de carbonato de sodio en una concentración de 1 M y se mantuvo el sistema en rotación a 37 °C por 2 h (Figura 3-2). La suspensión final se centrifugó y se tomaron alícuotas del sobrenadante. Todas las disoluciones de jugos digestivos fueron ajustadas a una temperatura de 37 °C previo al ensayo.

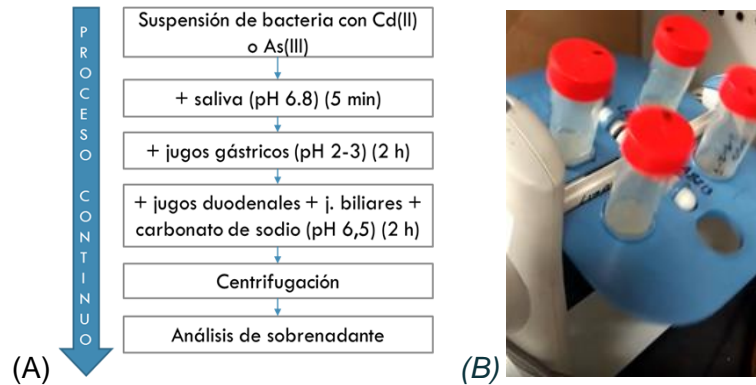


Figura 3-2 (A) Representación esquemática del procedimiento utilizado en el modelo *in vitro* del sistema digestivo humano RIVM. (B) Sistema de rotación mecánico utilizado para ensayos de digestión.

También, se evaluó la viabilidad de las cepas a lo largo del modelo. Se tomaron alícuotas de la suspensión de cada una de las unidades experimentales durante el ensayo en cada fase del proceso, preparando diluciones seriadas y sembrándolas en el medio de cultivo agar MRS $\frac{1}{2}$. Después de un tiempo de incubación a 37 ° C por 48 h, se realizó el conteo de colonias y con base a este, se calculó las UFC/mL.

Tabla 3-2 Composición de las disoluciones del modelo *in vitro* del sistema digestivo humano RIVM (tomado y adaptado de Kumar et al., 2017).

Parámetro	Saliva	Jugos gástricos	Jugos duodenales	Jugos biliares
Composición (por litro)	0.9 g KCl 0.2 g KSCN 0.9 g NaH ₂ PO ₄ 0.57 g NaSO ₄ 0.3 g NaCl 1.7 g NaHCO ₃ 0.2 g Urea 290 mg Alfa amilasa 15 mg Acido urico 25 mg Mucina	2.75 g NaCl 0.27 g NaH ₂ PO ₄ 0.82 g KCl 0.4 g CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.31 g NH ₄ Cl 6.5 mL HCl (37 %) 0.65 g Glucosa 0.02 g Acido glucurónico 0.085 g Urea 0.33 g Glucosamina hidrocloreuro 1 g BSA 2.5 g Pepsina 3 g Mucina	7.01 g NaCl 3.39 g NaHCO ₃ 0.08 g KH ₂ PO ₄ 0.56 g KCl 0.05 g MgCl ₂ 0.18 mL HCl (37 %) 0.1 g Urea 0.2 g CaCl ₂ ·2H ₂ O 1 g BSA 9 g Pancreatina 1.5 g Lipasa	5.26 g NaCl 5.79 g NaHCO ₃ 0.38 g KCl 0.15 mL HCl (37 %) 0.25 g Urea 0.22 g CaCl ₂ ·2H ₂ O 1.8 g BSA 30 g BBS
pH	6.5 ± 0.1	2 ± 0.1	7.5 ± 0.1	7.5 ± 0.1
Tiempo de transito	5 min	2 h	2 h	

Para cada uno de los sobrenadantes se realizó la cuantificación de Cd(II) utilizando la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica de Llama (Espectrofotometría Analytik jena ContraA ® 700) y de As(III) utilizando la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica Acoplado a Generación de Hidruros (Espectrofotometría Analytik jena ContraA ® 700). En base a los valores de concentración de Cd(II) o As(III), se cálculo el porcentaje

de bioaccesibilidad de acuerdo a la Ecuación 4.

$$\% \text{ Bioaccesibilidad} = \frac{\mu\text{g Cd(II) o As(III) en sobrenadante}}{\mu\text{g Cd(II) o As(III) en suspensión inicial}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3-4})$$

3.4 Resultados

3.4.1 Determinación de las curvas de crecimiento

En primera instancia se realizó la caracterización de las 3 cepas mediante la construcción de las curvas de crecimiento (Figura 3-3).

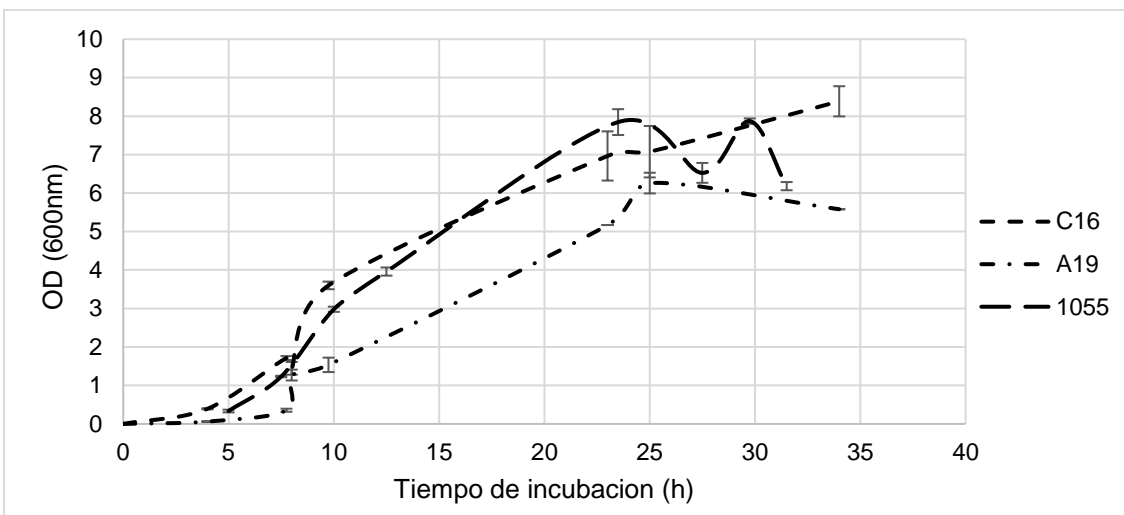


Figura 3-3 Curvas de crecimiento en caldo de cultivo MRS½ de *Lactobacillus plantarum* C16 y A19, aislados de fermento de cacao, y cepa de referencia JCM 1055.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento (Figura 3-3), se estableció un tiempo de incubación para las 3 bacterias (durante la fase exponencial), porque en este periodo de tiempo las tres se encuentran en un estado metabólico similar, de manera que se normalizan las condiciones en las cuales se someten a los ensayos de remoción.

3.4.2 Determinación de la relación Biomasa Seca con OD600

Se determinó la relación de OD₆₀₀ con biomasa seca (BS (g/L)), calculando una ecuación para cada cepa (Figura 3-4).

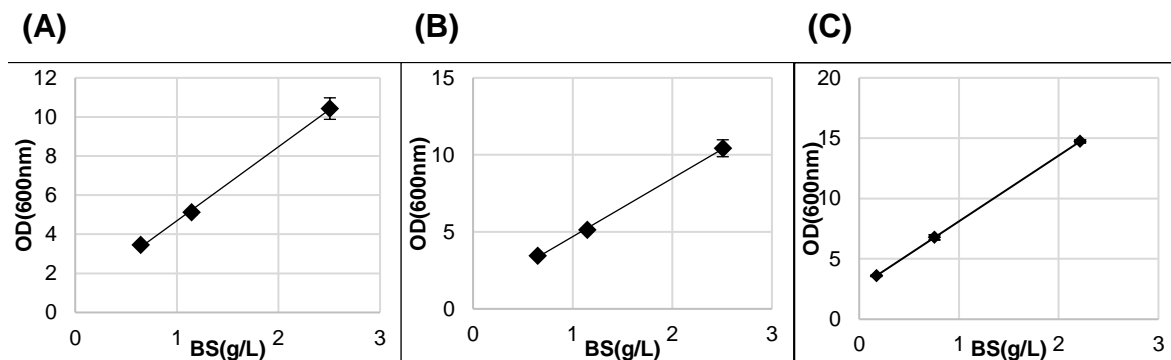


Figura 3-4 Curvas de relación biomasa seca (BS) vs densidad óptica (OD_{600}) de *Lactobacillus plantarum* (A) C16, (B) A19 y (C) JCM 1055. Cada bacteria se evaluó por triplicado.

A partir de las gráficas de BS en función de OD_{600} (Figura 3-4) se determinaron las ecuaciones de las gráficas (de tendencia lineal), para cada *L. plantarum*: JCM 1055, $OD_{600}=5,45 \cdot BS(g/L)-2,66$; C16, $OD_{600}=3,78 \cdot BS(g/L)+0,90$; A19, $OD_{600}=6,54 \cdot BS(g/L)-2,07$. A partir de estas ecuaciones se calculó el valor de BS (g/L) de los cultivos utilizados en los ensayos de remoción.

3.4.3 Evaluación de la capacidad de remoción de cadmio y de arsénico

Una vez establecidas las condiciones de preparación de inóculos, se realizaron los ensayos de remoción de Cd(II) utilizando un diseño experimental factorial 2^3 . Se determinaron las concentraciones de Cd(II) en los sobrenadantes después del contacto con los microorganismos (Figura 3-5) bajo las condiciones evaluadas (Tabla 3-1), y a partir de estas se calcularon los porcentajes de remoción (Figura 3-6).

En la Figura 3-6.B se presentan los porcentajes de remoción de Cd(II) a pH 5 y una concentración inicial de 1 mg/L de Cd(II). Se encontraron porcentajes desde 93% a 100%, con resultados muy similares entre las tres *L. plantarum* (C16, A19 y JCM 1055). A una concentración inicial de Cd(II) de 10 mg/L, a pH 5 (Figura 3-6.C), se obtienen porcentajes de remoción de 51% a 67% y de 82% a 89%, con concentraciones de la bacteria de 0,5 y 1,5, respectivamente. Se observan porcentajes de remoción más bajos (en un rango de 0 a 25%) en la Figura 3-6.A, obtenidos a pH 2 con una concentración inicial de cadmio de 1 mg/L.

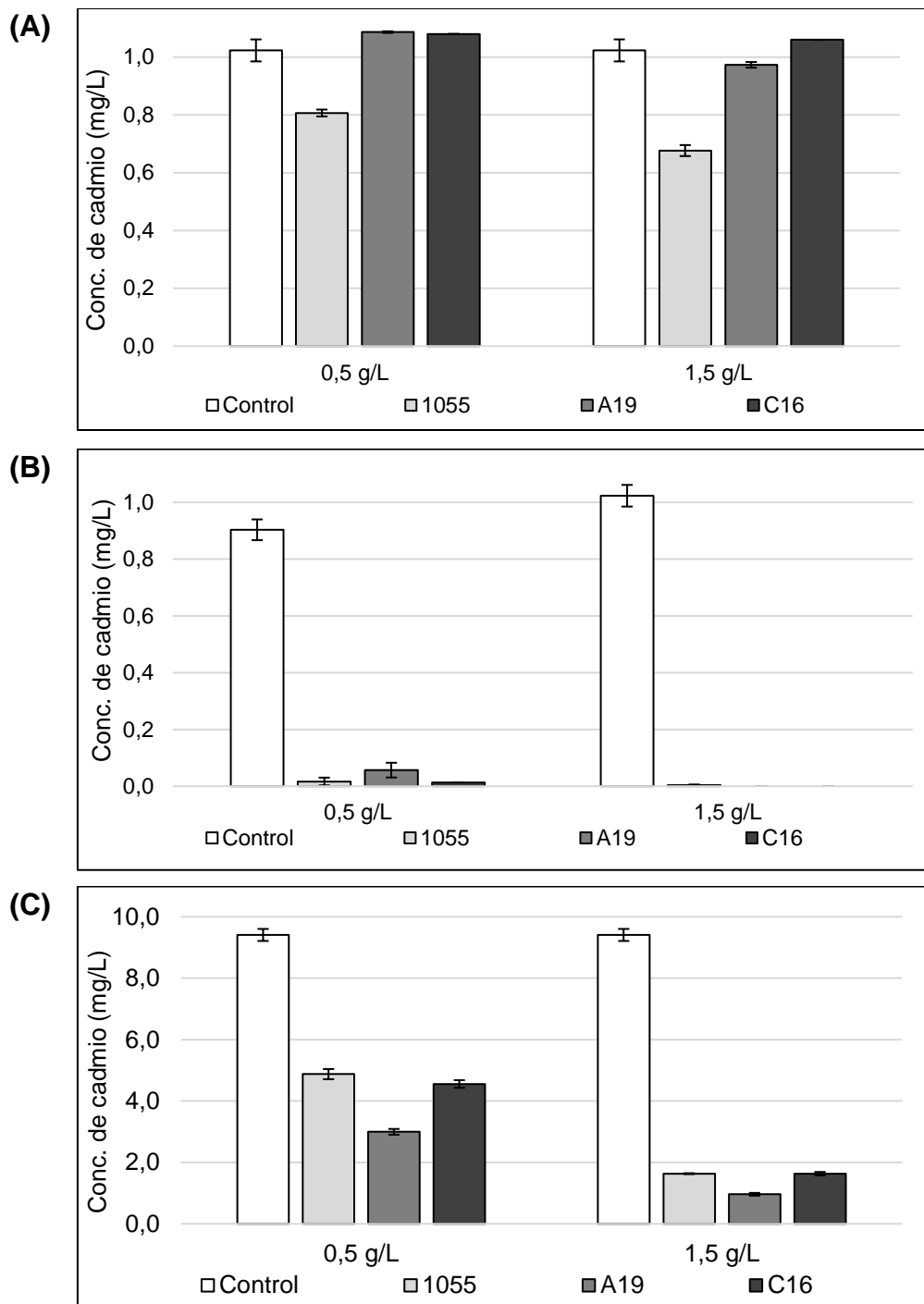


Figura 3-5 Concentraciones de Cd(II) (mg/L) en ensayos de remoción, aplicando diferente concentración de biomasa seca (0.5g/L y 1.5g/L) de *L. plantarum* C16, A19 y JCM 1055, bajo condiciones iniciales de (A) pH 2 y (B, C) pH 5. Cada tratamiento se evaluó por triplicado.

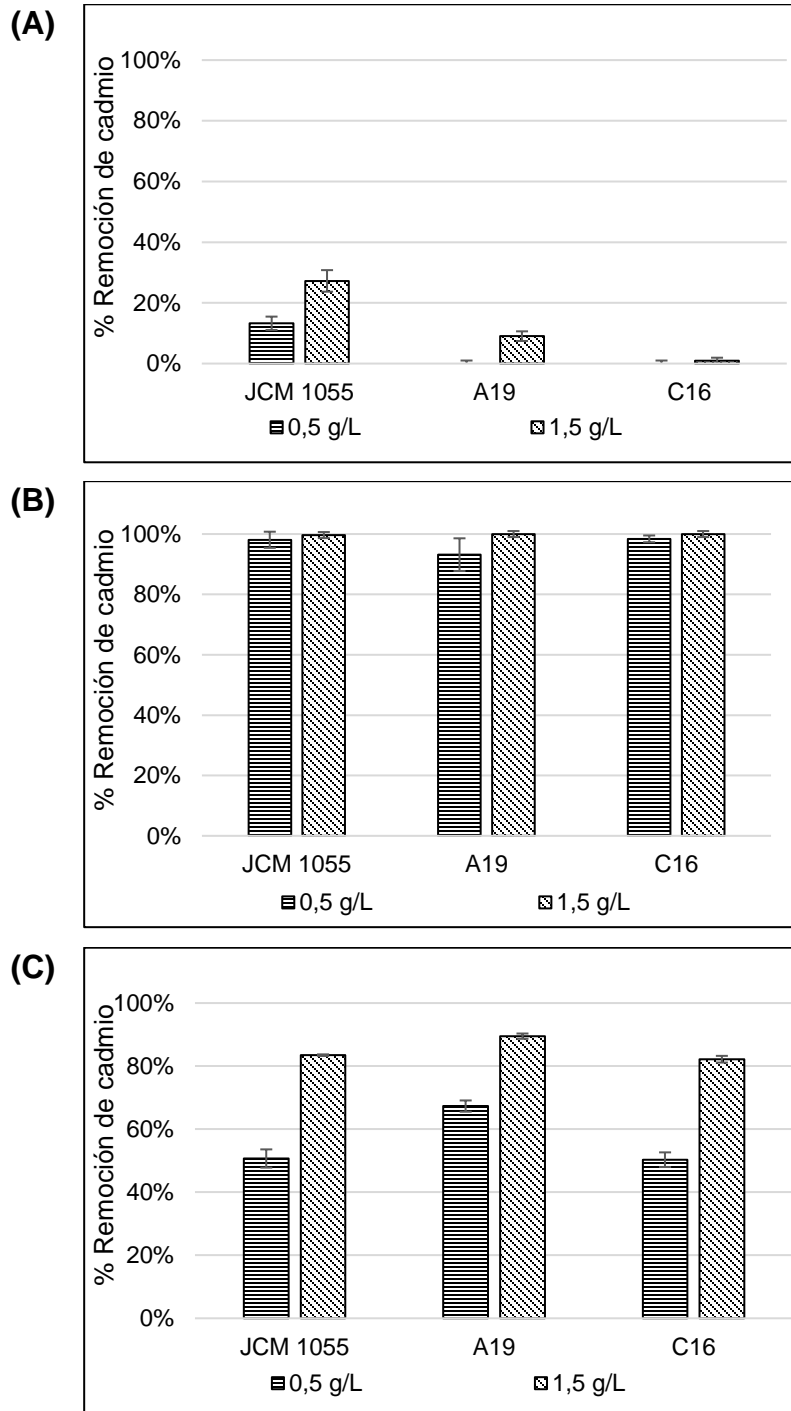


Figura 3-6 Porcentajes de remoción de Cd(II) aplicando diferente concentración de biomasa seca (0.5g/L y 1.5g/L) de *L. plantarum* C16, A19 y JCM 1055, bajo condiciones de (A) 1 mg Cd/L a pH 2, (B) 1 mg Cd/L a pH 5 y (C) 10 mg Cd/L a pH 5. Cada tratamiento se evaluó por triplicado.

Por otro lado, se determinaron los coeficientes de unión específica (Q) de cadmio (mg de Cd(II) removido por g de biomasa seca) bajo diferentes condiciones de concentración del metal y de la biomasa seca (Figura 3-7).

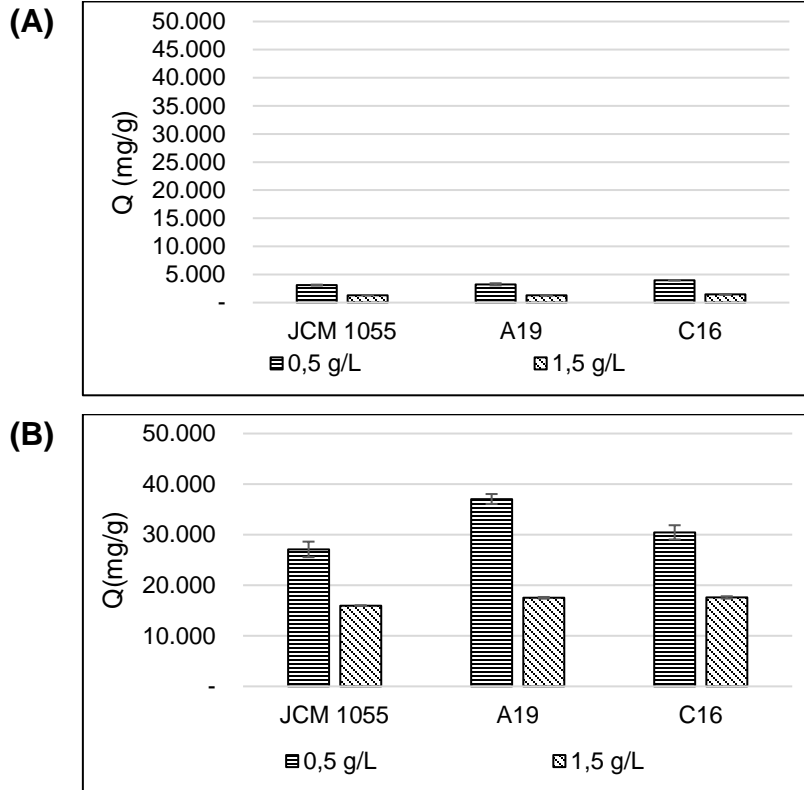


Figura 3-7 Coeficientes de unión específica (Q) de Cd(II) aplicando diferente concentración de biomasa seca de *L. plantarum* C16, A19 y JCM 1055, bajo condiciones de (A) 1 mg Cd/L a pH 5 y (B) 10 mg Cd/L a pH 5. Cada tratamiento se evaluó por triplicado.

En la Figura 3-7.B, que corresponde a los Q (mg/g) obtenidos evaluando 10 mg/L de Cd(II) como concentración inicial a pH 5, se observaron los valores más altos de Q (mg/g), de 27000 a 38000 mg Cd(II)/g y de 15000 a 18000 Cd(II)/g, con concentraciones de la bacteria de 0,5 y 1,5, respectivamente. Los valores obtenidos con 1 mg/L a pH 5 son un orden de magnitud inferiores (Figura 3-7.A), con valores de 3000 a 4000 mg Cd(II)/g y 1000 a 1500 mg Cd (II) /g con concentraciones de la bacteria de 0,5 y 1,5 g/L, respectivamente. Se encontró que el valor de Q (mg/g) es más alto a mayor concentración de Cd(II). También se puede observar que a mayor concentración de biomasa (BS) se obtiene un menor valor de Q (mg/g).

En la Figura 3-8 se presentan las gráficas de Pareto que muestran la magnitud del efecto de las variables pH, concentración de biomasa (B) y concentración de cadmio (Cd), utilizando como variable de respuesta el porcentaje de remoción de cadmio

Se observa que la variable pH es la que ejerce un mayor efecto sobre la respuesta, y además, este efecto es positivo, es decir, que a mayor valor de pH más alto el porcentaje de remoción. Por otro lado, la variable de concentración de Cd (II) ejerce un efecto negativo, es decir, que a mayor concentración del metal más bajo es el porcentaje de remoción y la variable concentración de biomasa (B) tiene un efecto positivo. La interacción de las variables concentración de Cd (II) y pH (Cd:pH), presentan un efecto negativo.

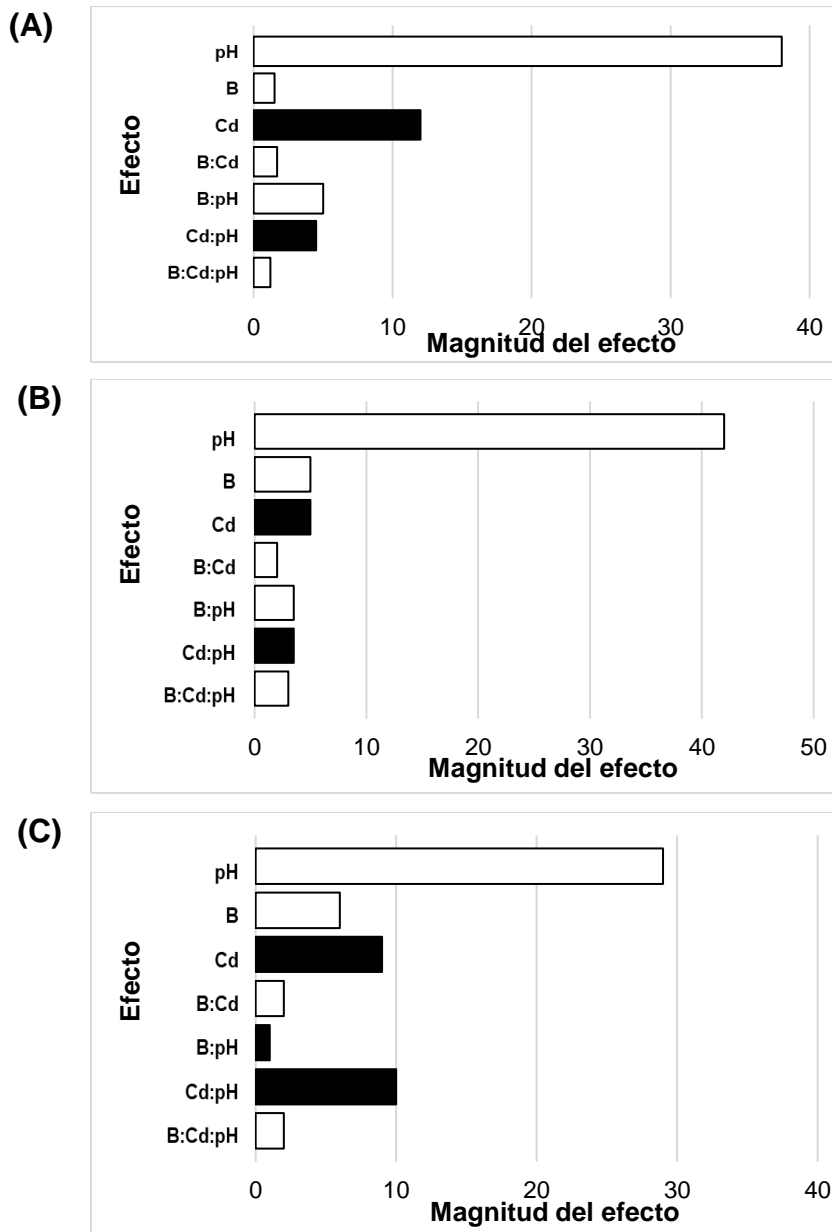


Figura 3-8 Gráficas de Pareto de significancia de variables pH, concentración de biomasa seca (B) y concentración de cadmio (Cd) en ensayos de remoción de Cd(II) en medio acuoso con *L. plantarum* (A) C16, (B) A19 y (C) JCM 1055. Los efectos positivos se representan con barras de con líneas horizontales y los efectos negativos con barras con líneas diagonales.

También se realizaron ensayos de remoción de As(III), utilizando un diseño experimental factorial 2^2 (Tabla 3-1). Se determinaron las concentraciones de As(III) de las muestras de los sobrenadantes después del contacto con los microorganismos (Figura 3-9) y a partir de estas se calcularon los porcentajes de remoción, los cuales se muestran en la Figura 3-10.

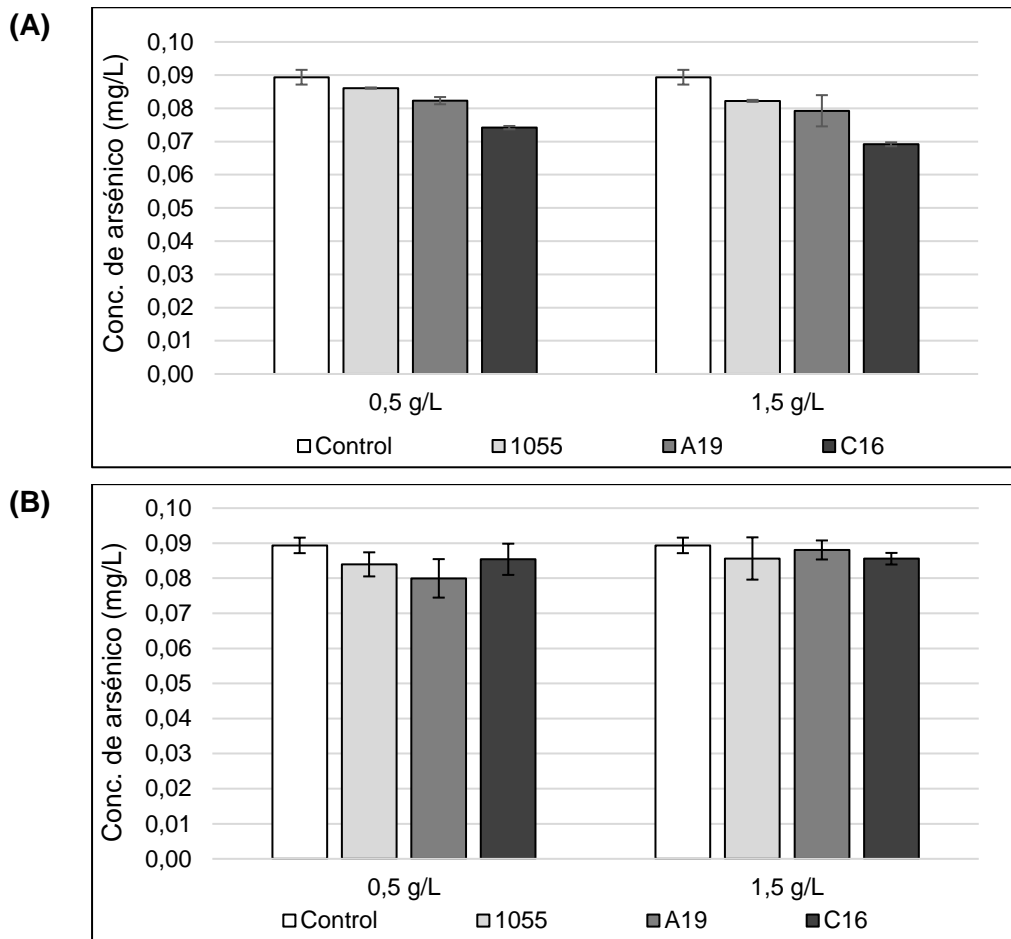


Figura 3-9 Concentraciones de As(III) (mg/L) en ensayos de remoción, aplicando diferente concentración de biomasa seca (0,5g/L y 1,5g/L) de *L. plantarum* C16, A19 y 1055, bajo condiciones de (A) pH 5 y (B) pH 8. Cada tratamiento se evaluó por triplicado.

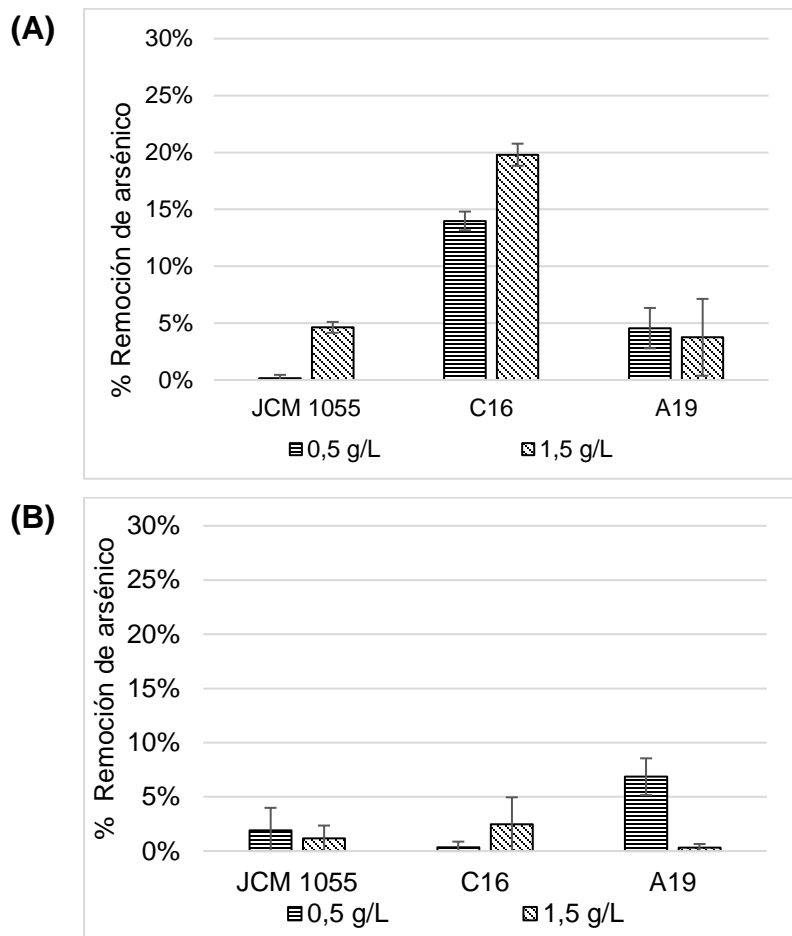


Figura 3-10 Porcentajes de remoción de As(III) aplicando diferente concentración de bioamasa seca de *L. plantarum* C16, A19 y 1055, bajo condiciones de (A) 0,1 mg As/L a pH 5 y (B) 0,1 mg As/L a pH 8. Cada tratamiento se evaluó por triplicado.

En la Figura 3-10.A se presentan los porcentajes de remoción de As(III) a pH 5 y a una concentración inicial de 0,1 mg/L de Cd(II), encontrando resultados entre 0 y 20% con las tres *L. plantarum* (C16, A19 y JCM 1055). A una concentración de 0,1 mg/L de Cd(II), a pH 8 (Figura 3-10.B), se obtienen porcentajes de remoción de 0 a 7%.

Adicionalmente, se realizó el cálculo de coeficientes de unión específica Q (mg/g) para As(III), los cuales se presentan en la Figura 3-11.

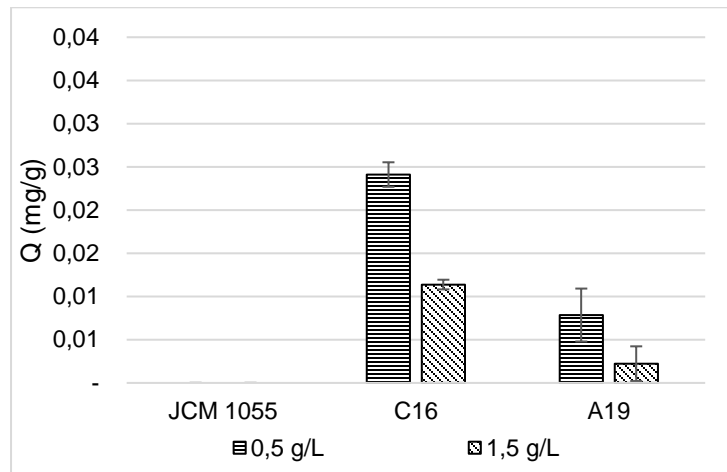


Figura 3-11 Coeficientes de unión específica (Q) de As(III) aplicando diferente concentración de biomasa seca de *L. plantarum* C16, A19 y JCM 1055, bajo condiciones de 0,1 mg/L de As(III) a pH 5. Cada tratamiento se evaluó por triplicado.

En la Figura 3-11, que corresponde a los valores de Q (mg/g) obtenidos evaluando 0,1 mg/L de As(III) como concentración inicial (pH 5), se observaron valores entre 0 y 0,02 mg As(III)/g, que resultaron ser de 5 órdenes de magnitud inferiores a los encontrados para Cd(II). Debido a los bajos porcentaje de remoción para As(III), no se realizó el análisis estadístico de significancia de variables para este elemento.

3.4.4 Evaluación de la capacidad de remoción de cadmio y de arsénico en un modelo *in vitro* del sistema digestivo humano

Una vez evaluada la capacidad de remoción de Cd(II) y As(III) por los *L. plantarum* C16, A19 y JCM 1055, se realizaron ensayos para determinar la capacidad de estas cepas para retener Cd(II) y As(III) en condiciones de un modelo RIVM *in vitro* que simulan el sistema digestivo humano. Se tomaron alícuotas en cada una de las fases del modelo, y se calculó el número de UFC/mL. Este ensayo se realizó con el fin de verificar la viabilidad de las bacterias durante el modelo *in vitro* del sistema digestivo humano.

En la Figura 3-12 se representa el conteo de UFC/mL en cada una de las fases del proceso (saliva, jugos gástricos y jugos intestinales) en las unidades experimentales sin Cd(II) o As(III).

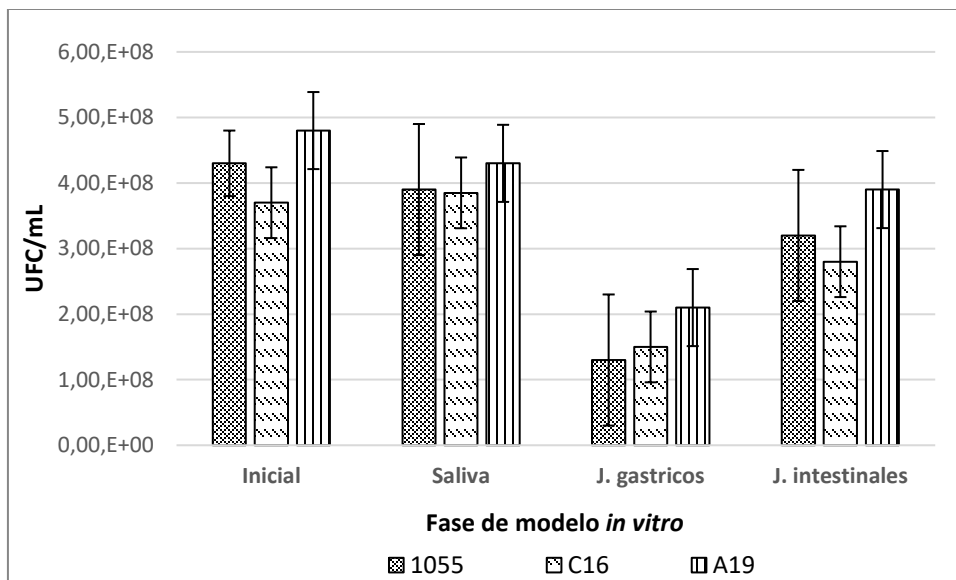


Figura 3-12 Conteo de UFC/mL para *L. plantarum* C16, A19 y JCM 1055, durante las 4 fases del modelo *in vitro* del sistema digestivo humano RIVM (Versantvoort et al., 2002). Análisis por triplicado.

Los resultados de UFC/mL de la Figura 3-12, obtenidos mediante el cultivo en medio sólido (agar MRS $\frac{1}{2}$) de diluciones seriadas de las suspensiones de las diferentes fases del modelo *in vitro* RIVM, indican que las tres *L. plantarum* (C16, A19 y JCM 1055) permanecieron viables en el modelo. Todas las cepas presentaron crecimiento en el mismo orden de magnitud de 10^8 , por lo que fue posible normalizar las condiciones en las que se evaluaron los tres microorganismos.

En un modelo *in vitro* RIVM, se evaluaron algunas unidades experimentales con una concentración inicial de Cd(II) de 1 mg/L. Se tomaron muestras de sobrenadante después de la fase final (jugos intestinales) y se realizó la cuantificación de Cd(II) en disolución. Con estas concentraciones se calculó el porcentaje de bioaccesibilidad de Cd(II), el cual se representa en la Figura 3-13.

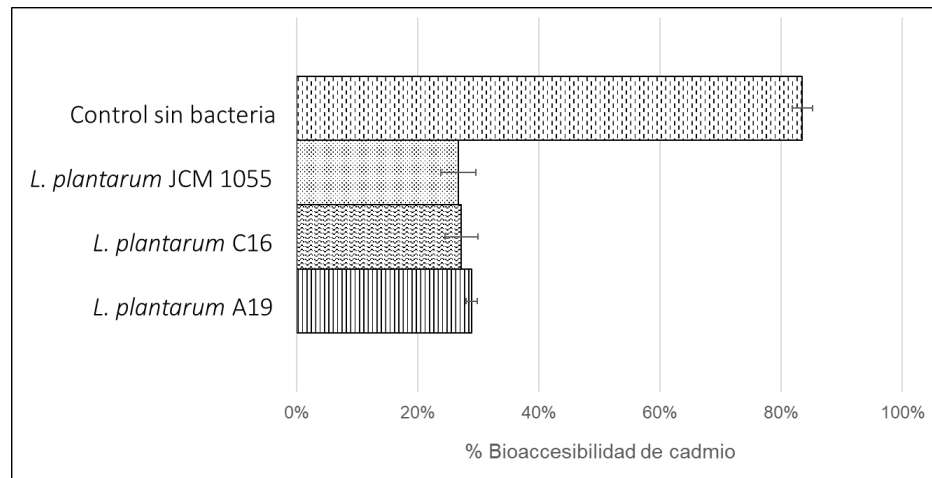


Figura 3-13 Porcentajes de bioaccesibilidad de Cd(II) en modelo in vitro RIVM con las cepas *L. plantarum* C16, A19 y JCM 1055. Cada tratamiento se evaluó evaluó por triplicado.

En la Figura 3-13 se observaron porcentajes de bioaccesibilidad de 83%, 29%, 27% y 27% con un control sin bacteria, *L. plantarum* JCM 1055, *L. plantarum* C16 y *L. plantarum* A19, respectivamente. Por lo tanto, las 3 bacterias tienen la capacidad de disminuir la bioaccesibilidad en un 54% (*L. plantarum* JCM 1055), 56% (*L. plantarum* C16) y 56% (*L. plantarum* A19), respecto al control sin bacteria. Estos resultados indican una alta capacidad de las tres bacterias de disminuir la bioaccesibilidad de Cd(II) en este modelo.

Simultáneamente, en el mismo ensayo se evaluaron algunas unidades experimentales con una concentración inicial de As(III) de 0,1 mg/L. Se realizó la cuantificación de As(III) en los sobrenadantes tomados después de la fase final (jugos intestinales). Con estas concentraciones se calculó el porcentaje de bioaccesibilidad de As(III), el cual se representa en la Figura 3-14.

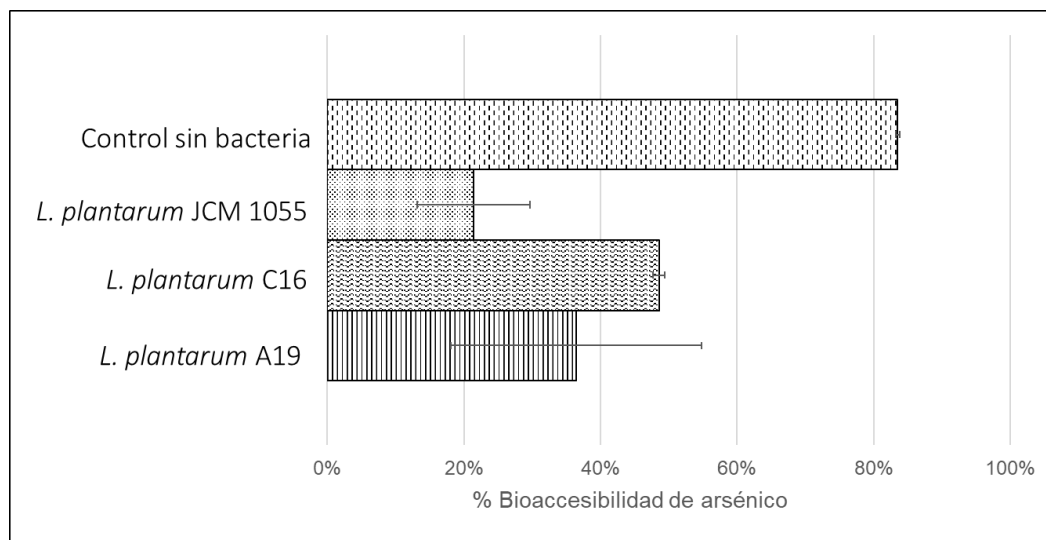


Figura 3-14 Porcentajes de bioaccesibilidad de As(III) en modelo in vitro RIVM con las cepas *L. plantarum* C16, A19 y JCM 1055. Cada tratamiento se evaluó evaluó por triplicado.

En la Figura 3-14 se observaron los porcentajes de bioaccesibilidad de 83%, 36%, 49% y 21% con un control sin bacteria, *L. plantarum* JCM 1055, *L. plantarum* C16 y *L. plantarum* A19, respectivamente. Por lo tanto, las 3 bacterias tienen la capacidad de disminuir la bioaccesibilidad en un 47% *L. plantarum* JCM 1055, 34% *L. plantarum* C16 y 62% *L. plantarum* A19, respecto al control sin bacteria. Estos resultados indican una alta capacidad de las tres bacterias de disminuir la bioaccesibilidad de As(III) en este modelo, aunque en este caso se encontró que la desviación de los resultados es alta (error estándar calculado hasta de 20%).

3.5 Discusión

Se evaluó la capacidad de remoción de Cd(II) y As(III) por acción de tres cepas de *Lactobacillus plantarum* (los aislados de fermento de cacao C16 y A19, y la cepa de referencia JCM 1055) seleccionadas previamente, en medio acuoso y en un modelo *in vitro* del sistema digestivo humano RIVM.

La caracterización de las tres cepas de trabajo mediante la construcción de sus curvas de crecimiento permitió determinar un comportamiento similar entre las cepas de trabajo, estos datos concuerdan con lo reportado. Gerbino et al. (2014) reportó que para *L. kefir* JCM 5818 utilizando caldo de cultivo MRS diluido ($MRS_{1/2}$). Con estas curvas de

crecimiento se definieron 18 h como el tiempo de incubación de los inóculos para los ensayos de remoción.

Posteriormente, la relación de BS (g/L) en función de OD_{600} permitió determinar de forma expedita la cantidad de biomasa a utilizar en los ensayos de remoción de Cd(II) y As(III). Esto permitió normalizar las condiciones iniciales de la cantidad de biomasa usada de las 3 cepas de *L. plantarum* (los aislados de fermento de cacao C16 y A19, y la cepa de referencia JCM 1055) evaluadas.

Se realizaron ensayos de remoción de Cd(II) y As(II), utilizando un diseño experimental factorial 3^2 y 2^2 , respectivamente. Con estos ensayos se evaluó la capacidad de remoción de Cd(III) y As(II) a diferentes condiciones de pH, concentración de biomasa y concentración de metal (para el caso del Cd(II)).

A pH 5 se obtuvieron eficiencias de remoción hasta del 100% con las 3 cepas evaluadas a una concentración de 1 mg/L (Figura 3.5 B). Resultados similares fueron reportados por Gerbino et al. (2014), quienes mostraron que un porcentaje de remoción de Cd(II) de 100%, con la cepa *Lactobacillus kefir* JCM 5818. Por otro lado, se obtuvieron porcentajes de remoción superiores a los registrados por Bhakta et al. (2012), que indicaron un rango de 69 a 87%, bajo condiciones similares (1mg/L de Cd(II), 3g/L de bacteria y 2 h de contacto).

A una concentración de 10 mg/L de Cd(II) a pH 5 se obtuvieron porcentajes de remoción entre 60 y 67% a una concentración de biomasa de 0,5 g/L y entre 82 y 89% a una concentración de biomasa de 1,5 g/L (Figura 3.5 C). Se obtuvieron los mejores resultados con la cepa *L. plantarum* A19, con la que se alcanzó el 89% de remoción. Estos resultados son muy similares a los reportados por Halttunen et al. (2007b), quienes reportaron el 90% de remoción bajo condiciones similares (10 mg/L de Cd(II), pH 6, 1,5 g/L de bacteria, 1 h de contacto).

No se obtuvieron buenas eficiencias de remoción de Cd(II) a pH de 2, comparado con los ensayos a pH 5, ya que se presentaron resultados en un rango de 0 a 25%, partiendo de concentraciones de 1 mg/L y 10 mg/L (Figura 3.5 A). Esto se refleja en el valor de Q calculado, el cual es menor respecto a otras condiciones evaluadas.

En los ensayos de remoción se evidenció la diferencia en las eficiencias de remoción a diferentes valores de pH, siendo mayores las eficiencias de remoción de Cd(II) a mayor

valor de pH. Este resultado fue soportado por el análisis estadístico (gráficas de Pareto, Figura 3-8) por medio del cálculo de la significancia de esta variable, la cual es mayor respecto a las variables concentración de Cd(II) y concentración de biomasa. Otros autores, ya habían reportado la importancia de esta variable (pH), ya que de las condiciones de pH depende el punto isoeléctrico de las proteínas de membrana en la superficie de las bacterias, y de esto depende la carga, que influye sobre la interacción metal-bacteria, y, por lo tanto, sobre la capacidad de remoción de Cd(II) (Ibrahim et al., 2006). En un estudio realizado con una cepa de *Lactobacillus crispatus* aislada del tracto gastrointestinal humano, se obtuvo una eficiencia de remoción de Cd(II) del 85%, se reporta que el Cd(II) se acumula al interior de la bacteria, por lo que las características de la pared y de la membrana celular influyen directamente en la interacción de la bacteria con el Cd(II) (Polak-Berecka et al., 2017). Además, al ser el Cd(II) un catión, este puede interactuar con las cargas negativas presentes en la pared celular de las bacterias (Halttunen et al., 2007b). Los ácidos teicoicos, peptidoglicano, exopolisacáridos y proteínas S, los cuales son componentes de la pared celular de las bacterias Gram (+), están directamente relacionados con el mecanismo de remoción de bacterias del género *Lactobacillus* spp. (Gerbino et al., 2011; Polak-Berecka et al., 2014; Hansda et al., 2016; Polak-Berecka et al., 2017).

Los resultados de los ensayos de remoción de As(III) en medio acuoso mostraron eficiencias en un rango de 0 a 20% bajo las condiciones evaluadas de 0,1 mg/L a pH 5 y 8 y a concentraciones de biomasa de 0,5 g/L y 1,5 g/L (Figura 3-10). Se obtuvieron los mejores resultados con la cepa *L. plantarum* C16., sin embargo, más bajos a los reportados previamente por Bhakta et al. (2010), quienes obtuvieron porcentajes de remoción entre 25% a 41% con bacterias del género *Pediococcus* spp. En el caso de la interacción de las bacterias con As(III), al ser este un metaloide se encuentra en su forma de anión $[AsO_2^{1-}]$ pudiendo interaccionar más fácilmente si la bacteria presenta una carga positiva en su superficie. Por este motivo, en un estudio previo se realizó la modificación superficial de las bacterias, obteniendo resultados de 38% de remoción (Halttunen et al., 2007a). Los coeficientes de unión específica de As(III) fueron de hasta 5 órdenes de magnitud inferiores con referencia a los de Cd(II), por lo que bajo las condiciones evaluadas en el presente trabajo, las bacterias de *Lactobacillus plantarum* (los aislados de fermento de cacao C16 y A19, y la cepa de referencia JCM 1055) no tienen la capacidad de adsorber As(III).

Después de los ensayos de remoción en medio acuoso se realizaron ensayos en un

modelo RIVM *in vitro* que simula el sistema digestivo humano para evaluar el efecto de *L. plantarum* A19, C16, y JCM 1055 sobre la bioaccesibilidad del Cd(II) y el As(III). Se encontró que las bacterias tienen la capacidad de retener y disminuir la bioaccesibilidad de Cd(II) y As(III) en el modelo RIVM, respecto al control sin bacteria utilizado. Se comprobó la viabilidad de las bacterias mediante cultivo de alícuotas tomadas en las diferentes fases del modelo (Figura 3-12) por lo que la disminución de la bioaccesibilidad puede ser atribuido a la acción de las bacterias. Se encontró que los componentes de las disoluciones sintéticas de los jugos digestivos del modelo en sí, disminuyen la bioaccesibilidad en un 30 % en el caso del Cd(II) y en 17% en el caso del As(III), esto por la presencia de materia orgánica que interactúa con el metal(oide) y disminuye su bioaccesibilidad. Resultados similares fueron obtenidos por Kumar et al. (2017), donde reportan una disminución de 20% de bioaccesibilidad de cadmio utilizando el mismo modelo.

Por otro lado, se encontró que con las bacterias se disminuye la bioaccesibilidad de Cd(II) en un rango de 54% a 56% con las tres cepas de *L. plantarum* evaluadas (Figura 3-13). En este sentido, estos resultados fueron más prometedores que los reportados por Kumar et al. (2017), quienes encontraron la disminución de la bioaccesibilidad de cadmio de 40% con una cepa de *L. plantarum* HD 48, utilizando el mismo modelo.

Los resultados obtenidos para As(III) se encuentran en un rango del 34% al 62% de disminución de la bioaccesibilidad (Figura 3-14). Los resultados más favorables se obtuvieron para el aislado de fermento de cacao *L. plantarum* A19. Previamente, no se habían reportado ensayos donde se pretendiera evaluar el efecto sobre la bioaccesibilidad de As(III) en modelos *in vitro* del sistema digestivo humano, por lo que que resultados son novedosos en este aspecto. Lo anterior, implica un mayor rango de elementos que se podrían mitigar utilizando esta estrategia de detoxificación.

Kumar et al. (2017) fueron los primeros en reportar el uso del modelo RIVM para evaluar la disminución de la bioaccesibilidad de Cd(II) por intermedio de *Lactobacillus* spp. El presente trabajo, donde se evalúa el efecto de este tipo de microorganismos sobre la bioaccesibilidad de Cd(II) y As(III), permite completar la información disponible para el metal y es el primero en reportar este aspecto para el metaloide.

Teniendo en cuenta que la detoxificación generalmente ocurre en el tracto intestinal, en el hígado y en los riñones (Monachese et al., 2012), para futuros estudios es fundamental

evaluar el efecto de los microorganismos presentes en el tracto intestinal en modelos *in vivo* o modelos que contemplen la presencia de bolo alimenticio, células del intestino y microbioma, para conocer el efecto de estos componentes del sistema. El bolo alimenticio por un lado interacciona con el elemento tóxico disminuyendo la fracción bioaccesible, la cual corresponde a la cantidad disponible para ser absorbida por el epitelio intestinal (Versantvoort et al., 2005). Adicionalmente, la presencia de elementos tóxicos como el Cd(II) y el As(III) en el intestino ocasiona un cambio de las poblaciones microbianas en el sistema microbiota gastrointestinal, lo que tiene una influencia directa sobre la capacidad de colonización de las bacterias que se desean evaluar para detoxificación (Tinkov et al., 2018). Además, la presencia de células intestinales puede generar un cambio en las poblaciones microbianas, ya que la presencia de elementos tóxicos como el Cd(II) genera una respuesta inflamatoria que incrementa la permeabilidad intestinal y ocasiona la translocación bacteriana en el epitelio intestinal (Tinkov et al., 2018).

Los resultados reportados en este estudio dan indicios del potencial que pueden tener las bacterias de *Lactobacillus plantarum* A19, C16 y JCM 1055 para ser evaluadas en modelos animales, por su capacidad de disminuir la bioaccesibilidad de Cd(II) y As(III) utilizando el modelo RIVM.

3.6 Conclusiones

Mediante este estudio fue posible comprobar la capacidad de remoción de Cd(II) de hasta 100% en medio acuoso de *Lactobacillus plantarum* A19 y C16 aisladas de fermento de cacao, y de la cepa de referencia *Lactobacillus plantarum* JCM 1055. Por otro lado, estas bacterias no presentaron eficiencias de remoción de As(III) superiores al 20% en medio acuoso. Sin embargo, se comprobó su potencial para disminuir la bioaccesibilidad de Cd(II) y As(III) (hasta en un 56% y 62%, respectivamente) mediante estudios *in vitro* en un modelo RIVM que simula las condiciones del sistema digestivo humano.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las especies de *Lactobacillus plantarum* evaluados presentan un gran potencial para ser aplicados en los procesos biotecnológicos relacionados con la mitigación de los elementos tóxicos, como el Cd(II) y As(III), y como procesos de detoxificación en el sistema digestivo humano.

4. Capítulo 4. Discusión final, Conclusiones y Perspectivas

4.1 Discusión final

En una primera etapa de esta investigación fue posible aislar *Lactobacillus* spp., con capacidad de crecer en presencia de Cd(II) y de As(III), a partir de muestras tomadas a las 48 y 72 h del proceso de fermentación de cacao en la finca Granja Luker, Palestina, Caldas, Colombia, siguiendo la metodología basada en el estudio de Bhakta et al. (2012). En esta, fueron seleccionadas y criopreservadas 39 aislados de BAL, las cuales fueron identificadas por técnicas moleculares, encontrando que 38 aislados corresponden al género *Lactobacillus* spp. y que 1 corresponde a *Pediococcus acidilactici* (Tabla 1-3).

La metodología utilizada fue útil para seleccionar adecuadamente las BALs del género *Lactobacillus* spp. Sin embargo, para futuros estudios se deben contemplar otras metodologías de preservación para mantener viables también las bacterias con baja tolerancia a la criopreservación (Fonseca et al., 2015). Las especies de *Lactobacillus* spp., que fueron aisladas en este estudio (*L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. amylovorus* y *L. paracasei*) habían sido previamente reportadas como bacterias presentes en el proceso de fermentación de cacao (Camu et al., 2007).

En futuros estudios se deben utilizar medios de cultivo que amplíen la prospección a no solo un grupo de microorganismos (BALs), si no a otros grupos presentes en el proceso de fermentación de cacao con los cuales se puedan obtener resultados novedosos. Un ejemplo reportado es el uso del medio Mergeay (Mergeay, 1995), con el Bravo et al. (2018) aislo recientemente bacterias tolerantes a cadmio a partir de suelos de cultivos de cacao colombianos.

En la segunda etapa del trabajo, se evaluaron los 38 aislados del género *Lactobacillus* spp., y 3 cepas de referencia, encontrando que las bacterias aisladas tienen la capacidad

de tolerar concentraciones de Cd(II) en un rango de 1 a 100 mgCd(II)/L y concentraciones de As(III) de 50 a >300 mgAs(II)/L. Fueron seleccionadas las 13 bacterias con mayor capacidad de crecer en presencia de estos elementos, con el fin, de evaluar su tolerancia a condiciones *in vitro* del sistema digestivo humano, encontrando que 9 permanecen viables después de su interacción con buffer ácido a pH 2,5 por 2 h. Los 5 microorganismos *L. plantarum* JCM 1055, A19, A26, C16 y el aislado no identificado C6 fueron los de mayor valor de relación de viabilidad después de contacto con el buffer ácido, fueron seleccionados y evaluados de acuerdo a su capacidad de tolerar altas concentraciones de sales biliares, encontrando que todos fueron tolerantes hasta 4 g/L de sales biliares durante su crecimiento.

Las bacterias evaluadas presentaron valores de CMI, menores para Cd(II) respecto a As(III). Esto puede deberse a las diferencias en los mecanismos de interacción de estos elementos con las bacterias, siendo el ingreso a la bacteria menos selectivo para el Cd(II) (Zhai et al., 2017), y más específico en el caso del As(III), cuyo ingreso a la célula depende de la presencia de proteínas de transporte específicas (Halttunen et al., 2007a; Shen et al., 2013). La interacción de las bacterias con el metal o el metaloide es un factor de selección importante, para la obtención de bacterias con alto potencial de capacidad de biosorción de Cd(II) y As(III).

L. plantarum JCM 1055, *L. plantarum* A19 y *L. plantarum* C16 fueron seleccionados debido a su mayor CMI (Tabla 2-1) y mayor relación de viabilidad después de contacto con buffer ácido (Figura 2-2), además, de mostrar tolerancia a una alta concentración de sales biliares (4 g/L) (Figura 2-3).

En la tercera y última etapa de la investigación, se evaluó la capacidad de remoción de cadmio y de arsénico por estas tres bacterias seleccionadas. Se realizó la caracterización de las tres cepas de trabajo mediante la construcción de sus curvas de crecimiento y relación de BS (g/L) en función de OD₆₀₀, normalizando de esta forma las condiciones iniciales de la cantidad de biomasa usada para los ensayos de remoción.

Se realizaron ensayos de remoción de Cd(II) encontrándose que a pH 5 se obtienen porcentajes de remoción de hasta el 100% con las 3 cepas evaluadas a una concentración de 1 mg/L (Figura 3.5 B) y entre 69 a 87% a una concentración de 10 mg/L (Figura 3.5 C). Por otro lado, a pH 8 se encontraron porcentajes de remoción de 0 a 25% partiendo de concentraciones de 1 mg/L y 10 mg/L de Cd(II) (Figura 3.5 A). Los resultados obtenidos

con los tres *L. plantarum* (JCM 1055, C16 y A19) son similares a los reportados por Gerbino et al. (2014) y Halttunen et al. (2007b), quienes obtuvieron porcentajes de remoción de Cd(II) de 100% (partiendo de 1 mg/L) con *L. kefir* JCM 5818 y de 60% (partiendo de 10 mg/L) con una cepa de *L. rhamnosus*, respectivamente. Los resultados de los ensayos de remoción de As(III) en medio acuoso mostraron eficiencias en un rango de 0 a 20% bajo las condiciones evaluadas de 0,1 mg/L a pH 5 y a 8, y las concentraciones de biomásas de 0,5 g/L y 1,5 g/L (Figura 3-10). Estos valores de remoción son menores a los reportados previamente por Bhakta et al. (2010), que indicaron valores entre 25% y 41% de remoción.

Después de los ensayos de remoción en medio acuoso se realizaron ensayos en un modelo RIVM *in vitro* que simula el sistema digestivo humano para evaluar el efecto de las bacterias *L. plantarum* JCM 1055, *L. plantarum* A19 y *L. plantarum* C16, sobre la bioaccesibilidad del Cd(II) y el As(III). Se encontró que las bacterias tienen la capacidad de retener y disminuir la bioaccesibilidad de Cd(II) y As(III) en el modelo RIVM en un rango de 54% a 56% y de 34% al 62%, respectivamente. Esta capacidad de retener metal(oid)es, aun bajo condiciones de un modelo *in vitro*, dan indicios del potencial que pueden tener estos *L. plantarum* para ser evaluadas en modelos con animales.

Con las tres cepas de *L. plantarum* JCM 1055, A19 y C16 se encontraron mejores resultados a los reportados por Kumar et al. (2017), quienes encontraron la disminución de la bioaccesibilidad de Cd(II) de 40% con una cepa de *L. plantarum* HD 48. En cuanto a los resultados obtenidos de disminución de bioaccesibilidad de As(III), este es el primer estudio que reporta el uso de estas bacterias para evaluar la disminución de la bioaccesibilidad en un modelo *in vitro* RIVM.

4.2 Conclusiones

En esta investigación se demostró el potencial de BALs aisladas de fermento de cacao para remover arsénico y cadmio en condiciones *in vitro* de pH ácido y concentraciones de sales biliares que simulan el sistema digestivo humano, utilizando el modelo RIVM.

En una primera etapa fue posible aislar e identificar 38 bacterias con capacidad de crecer en presencia de cadmio y de arsénico partir de fermento de cacao, correspondientes al género *Lactobacillus* spp de las especies *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. amylovorus* y *L. paracasei*.

En una segunda etapa fueron seleccionadas las bacterias más con capacidad de crecer en medio de cultivo con mayores concentraciones de cadmio y arsénico mediante ensayos de CMI y, posteriormente, fue evaluada su tolerancia a condiciones *in vitro* del sistema digestivo mediante ensayos de pH ácido y concentraciones de sales biliares. De acuerdo a su capacidad de tolerar estas condiciones fueron seleccionadas tres *Lactobacillus plantarum* (la cepa de referencia JCM 1055, y las cepas nativas aisladas a partir de fermento de cacao A19 y C16).

Finalmente, en una última etapa, se evaluó la remoción de cadmio y arsénico por las bacterias seleccionadas en medio acuoso y en condiciones *in vitro* que simulan el sistema digestivo humano.

Estos *Lactobacillus* spp. nativos de Colombia y aislados a partir de fermento de cacao podrían presentar gran potencial para la detoxificación de elementos tóxicos como el cadmio y arsénico, ya que tienen capacidad de crecer ante altas concentraciones de estos elementos, y las condiciones de pH ácido y altas concentraciones de sales biliares, que caracteriza el modelo RIVM que simulan las condiciones fisiológicas del sistema digestivo humano.

4.3 Perspectivas

Utilizando los microorganismos *L. plantarum* A19 y *L. plantarum* C16, los cuales presentaron alta capacidad de disminuir la bioaccesibilidad de cadmio y arsénico en el modelo *in vitro* de sistema digestivo humano RIVM, se podían realizar estudios en modelos *in vivo* o *in vitro* evaluando el efecto de las características de la microbiota intestinal y las células del intestino (líneas celulares Caco-2/HY-29), con el objetivo de evaluar el potencial de estas bacterias para aplicación en detoxificación de forma más cercana a las condiciones reales,

La aplicación de *Lactobacillus* spp., aislados de fermento de cacao en los procesos biotecnológicos da un valor agregado a la cadena productiva de cacao, ya que el proceso de fermentación de cacao desarrollado en Colombia, puede ser una fuente de microorganismos con potencial en una gran gama de aplicaciones. Estos incluyen: la producción de probióticos, la aplicación en los procesos fermentativos, la producción de biomoléculas de alto valor agregado, entre otros.

En futuros estudios se podría evaluar la presencia de otros géneros de las BALs, como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactosphaera*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium* (Giraffa et al., 2010; Holzapfel et al., 2001), en el proceso de fermentación de cacao. También, se puede evaluar su capacidad de tolerar condiciones *in vitro* del sistema digestivo humano (Saito et al., 2014), para aplicarlos en procesos biotecnológicos de detoxificación de elementos tóxicos. También, se puede ampliar la prospección a otros grupos de microorganismos presentes en el proceso de fermentación, con los cuales se podrían obtener resultados novedosos.

A. Anexo: Protocolo de preparación de medios bajo condiciones de aerotolerancia

1. En un Erlenmeyer de 500 mL pesar 26 g de medio de cultivo caldo MRS por litro de caldo MRS $\frac{1}{2}$ a preparar.
2. Adicionar agua de acuerdo a la cantidad requerida, y marcar una línea de afore.
3. Adicionar de 10 a 20 mL de agua adicionales.
4. Calentar el medio de cultivo, utilizando un mechero de gas y dejar hervir hasta que alcance de nuevo el nivel de afore original.
5. Retirar el medio de cultivo del mechero y dejar enfriar bajo flujo de nitrógeno por 10 minutos (Figura A1-1).
6. Colocar los tubos de vidrio de 10 mL en una gradilla y dejar en contacto con flujo de nitrógeno por 10 min (Figura A1-1).
7. Purgar una jeringa de 10 mL con flujo de nitrógeno absorbiendo y expulsando nitrógeno a través de una manguera, 5 veces consecutivas.
8. Inmediatamente después, con la jeringa purgada con nitrógeno, tomar 9 mL de medio de cultivo a partir del erlenmeyer (Figura A1-1).



Figura A1-1 Medios de cultivo preparados bajo condiciones de anaerobiosis y usados en la fase de enriquecimiento. Fuente: Edison Abdiel Rodríguez Torres, 2018.

9. Adicionar el volumen del medio en los tubos de vidrio purgados e inmediatamente cerrar con un corcho de caucho y asegurar con una tapa plástica de rosca.
10. Esterilizar en autoclave los tubos cerrados.
11. Almacenar en nevera hasta su uso.

B. Anexo: Protocolo de extracción de ADN genómico por método enzimático

1. Preparar un cultivo fresco de bacteria de interés.
2. Tomar 1 mL de cultivo y centrifugar a 13.000 rpm por 5 min en un microtubo de 1,5 mL.
3. Adicionar 1 mL de NaCl 0,85% p/v, dar pulso con vortex hasta suspensión de la biomasa y centrifugar 5 min a 13.000 rpm. Descartar sobrenadante.
4. Realizar 2 lavados más con NaCl 0,85% p/v (dar pulso con vortex y centrifugar cada vez). NOTA: Es posible guardar el precipitado en este punto a 4 °C.
5. Añadir 450 µL de TE (Tris 10mM – EDTA 1mM) y 40 µL de lisozima, concentración de 10mg/ml (Sigma) al precipitado.
6. Incubar a 37 °C por 1h.
7. Añadir 70 µL de SDS 10% p/v y 10 µL de proteinasa K a una concentración de 90U/mL (Fermentas).
8. Dejar en baño-maría 50 °C durante 1 h.
9. Añadir 100 µL NaCl 0,85% p/v y 100 µL de CTAB – NaCl y agitar con vortex. NOTA: El CTAB – NaCl una vez se retira de la nevera, se debe dejar 1-2 h en baño-maría 60 °C para que se disuelva completamente y así facilitar su uso.
10. Colocar en baño-maría a 65 °C por 10 min.
11. Añadir 750 µL de fenol – cloroformo y agitar con vortex.
12. Centrifugar a 15.200 rpm por 5 min.
13. En la parte superior o intermedia quedará una capa sólida (precipitado de impurezas) y dos fases líquidas. Tomar la fase superior (sobrenadante acuoso) y transferir a un nuevo microtubo de 1,5 mL.
14. Repetir los pasos 11, 12 y 13, hasta que no se forme la fase sólida. (Repetir la menor cantidad de veces posible para evitar la pérdida de ADN).

15. Añadir 450 μ L de isopropanol y colocar en nevera a -20 °C durante 1 h como mínimo. NOTA: Es posible dejarlo durante toda la noche para promover una mayor precipitación de ADN.
16. Centrifugar a 15.200 rpm por 5 min y descartar sobrenadante por decantación.
17. Añadir 50 μ L de etanol 70 %v/v y centrifugar a 15.200 rpm por 5 min.
18. Descartar sobrenadante por decantación y secar el precipitado colocando los tubos boca abajo sobre un papel absorbente. Para acelerar el secado, se pueden colocar los tubos boca abajo sobre el flujo de aire que emite la campana de bioseguridad. NOTA: puede que a simple vista no se observe ningún precipitado. No hay que preocuparse, el ADN está allí y es transparente.
19. Añadir 50 μ L de agua MilliQ o buffer TE (baja concentración de EDTA) y 5 μ L de RNAsa, a una concentración final de 15 μ g/mL (Fermentas) (de acuerdo a manual de uso de la enzima). NOTA: El ADN se puede almacenar a -20 °C y descongelarlo cuando sea requerido.
20. Obtener una disolución de ADN molde de buena calidad y ajustar a una concentración de 100 ng/ μ L. NOTA: Tener en cuenta los valores de las relaciones de absorbancia:
 - 260/280 debe estar en un valor entre 1,8 y 2,0.
 - 260/230 debe estar en un valor aproximado de 2,0 (Si el valor de esta relación es muy bajo esto podría deberse a la presencia de inhibidores de PCR como fenol o guanidinio).

C. Anexo: Protocolo de amplificación de la región V4 y V5 del gen 16S rRNA por PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

1. Esterilizar los tubos cerrados en la autoclave.
2. Almacenar en la nevera hasta su uso.
3. Realizar la extracción y la purificación de ADN genómico (Anexo B).
4. Preparar las soluciones stock (productos de BIOLINE: BIO- 21042 y BIO- 39025, Mix de *primers*).
5. Preparar la solución de PCR Master Mix:

	Vol x rxn de 50 μ L
Buffer de rxn 10X*	5 μ L
MgCl ₂ 50 mM	1,5 μ L
dNTPs 25 mM	0,5 μ L
Primer Com1 10 mM	0,4 μ L
Primer 909R 10 mM	0,4 μ L
ADN polimerasa 5U/ μ L	0,5 μ L
Agua MiliQ	36,5 μ L
	49 μ L x tubo **

* El Buffer de reacción 10X NH₄ se compone de: Tris-HCl 670 mM (pH 8,8), (NH₄)₂SO₄ 160 mM y estabilizador al 0,1%

** Se prepara una sola solución multiplicando cada volumen por el número de reacciones y se colocan 49 μ L de Master mix por tubo de reacción.

6. Adicionar 1 μ L o 5 μ L de ADN molde por tubo de reacción.
7. Dar un pulso con la centrífuga para asentar toda la solución en el fondo del tubo.
8. Colocar los tubos en el termociclador.
9. Correr el siguiente programa de amplificación:
 - 94 °C 5 min
 - (94 °C 20 s; 50 °C 20 s; 72 °C 40 s) x30 ciclos

72 °C 5 min

12 °C *Infinito*

10. Retirar los tubos del termociclador y almacenar a -20 °C hasta su uso.
11. Preparar un gel de agarosa 1%, adicionando 0,3 g en 30 mL (de acuerdo al tamaño de la cámara de electroforesis). Calentar la solución en microondas hasta que esta sea completamente homogénea.
12. Adicionar 3 µL de SYBR Safe por 30 mL de gel.
13. Servir el gel en el molde de la cámara de electroforesis colocando la peineta de acuerdo al número de pozos a utilizar.
14. Colocar el gel en la cámara.
15. Colocar 3 µL de marcador de peso molecular en un pozo.
16. Colocar 2 µL de muestra con 3 µL de buffer de carga por pozo.
17. Correr la electroforesis a 100 V por 50 min.
18. Visualizar gel en cámara de UV y tomar fotografía.

D. Anexo: Protocolo de amplificación del gen 16S rRNA por PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

1. Realizar la extracción y purificación de ADN genómico.
2. Preparar las soluciones stock (productos de BIOLINE: BIO- 21042 y BIO- 39025).
3. Preparar la solución Master Mix:

	Vol x rxn de 50 μ L
Buffer de rxn X10*	5 μ L
MgCl ₂ 50 mM	1,5 μ L
dNTPs 25 μ M	0,5 μ L
Primer F 10 μ M	2,5 μ L
Primer R 10 μ M	2,5 μ L
ADN polimerasa	0,5 μ L
Agua MiliQ	36,5 μ L
	49 μ L x tubo **

* El Buffer de reacción X10 NH₄ se compone de: Tris-HCl 670 mM (pH 8,8), (NH₄)₂SO₄ 160 mM y estabilizador al 0,1%.

** Se prepara una sola solución multiplicando cada volumen por el número de reacciones y se colocan 49 μ L de Master mix por tubo de reacción.

4. Adicionar 1 o 5 μ L de ADN molde por tubo de reacción.
5. Dar un pulso con la centrífuga para asentar toda la solución en el fondo del tubo.
6. Colocar los tubos en el termociclador.
7. Programar el termociclador con el siguiente programa:
 - 94 °C 5 min
 - (94 °C 20 s ; 55 °C 20 s ; 72 °C 30 s) x30 ciclos
 - 72 °C 1 min
 - 12 °C infinito

8. Retirar los tubos del termociclador y almacenar en la nevera hasta su uso.
9. Se realiza la visualización por la técnica electroforesis siguiendo la metodología descrita en el Anexo C.

E. Anexo: Protocolo de extracción de ADN genómico por método mecánico

1. A partir de un cultivo fresco tomar 1 mL y centrifugar a 13.000 rpm por 5 min.
2. Lavar 3 veces la biomasa con NaCl 0,85%.
3. Resuspender precipitado con 490 μ L de Buffer Tris-HCl y 34 μ L de SDS 10% p/v.
4. Adicionar en seguida 200 μ L de NaCl (2,8 M) y mezclar con vortex.
5. Adicionar 100 μ L de CTAB/NaCl (10%/4,1%) e incubar a 65 °C por 10 min.
6. Colocar la suspensión en un criovial con $\frac{1}{4}$ de volumen de perlas de vidrio de 200 μ m de diámetro.
7. Realizar 4 ciclos de 15 s en el equipo FastPrep Homogenizer (MPBIO).
8. Centrifugar por 10 min a 1.400 rpm y transferir sobrenadante a un nuevo microtubo.
9. Agregar al sobrenadante 450 μ L de Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamilico (25:24:1), mezclar vigorosamente y centrifugar por 5 min a 13.000 rpm.
10. Transferir el sobrenadante a otro eppendorf nuevo y agregar 450 μ L de Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamilico (25:24:1), mezclar vigorosamente utilizando vortex y centrifugar a 13.000 rpm por 5 min.
11. Transferir sobrenadante a otro microtubonuevo y agregar 350 μ L de isopropanol frio.
12. Dejar 1 h a -20 °C (o toda la noche).
13. Centrifugar a 13.000 rpm por 10 min, descartar sobrenadante y lavar el precipitado con 200 μ L de etanol 70 %v/v frio.
14. Centrifugar a 13.000 rpm por 10 min y secar el precipitado.
15. Resuspender precipitado en 100 μ L agua MilliQ.

F. Anexo: Gráficas de crecimiento de *Lactobacillus* spp. a diferentes concentraciones de cadmio y arsénico.

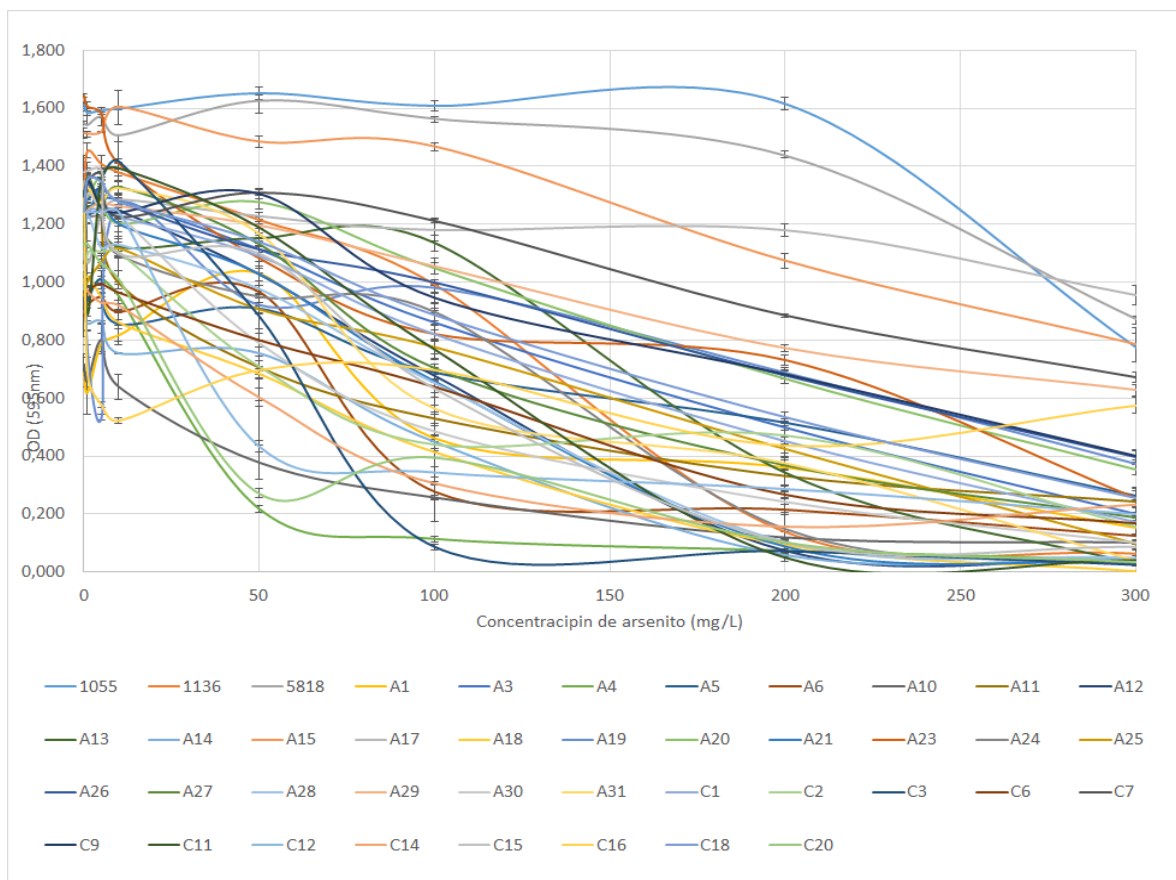


Figura A1-2 Crecimiento de *Lactobacillus* spp. (aisladas de fermento de cacao y cepas de referencia) a diferentes concentraciones de As(III), en un rango de 0 a 300mg/L, cada bacteria se evaluó por triplicado.

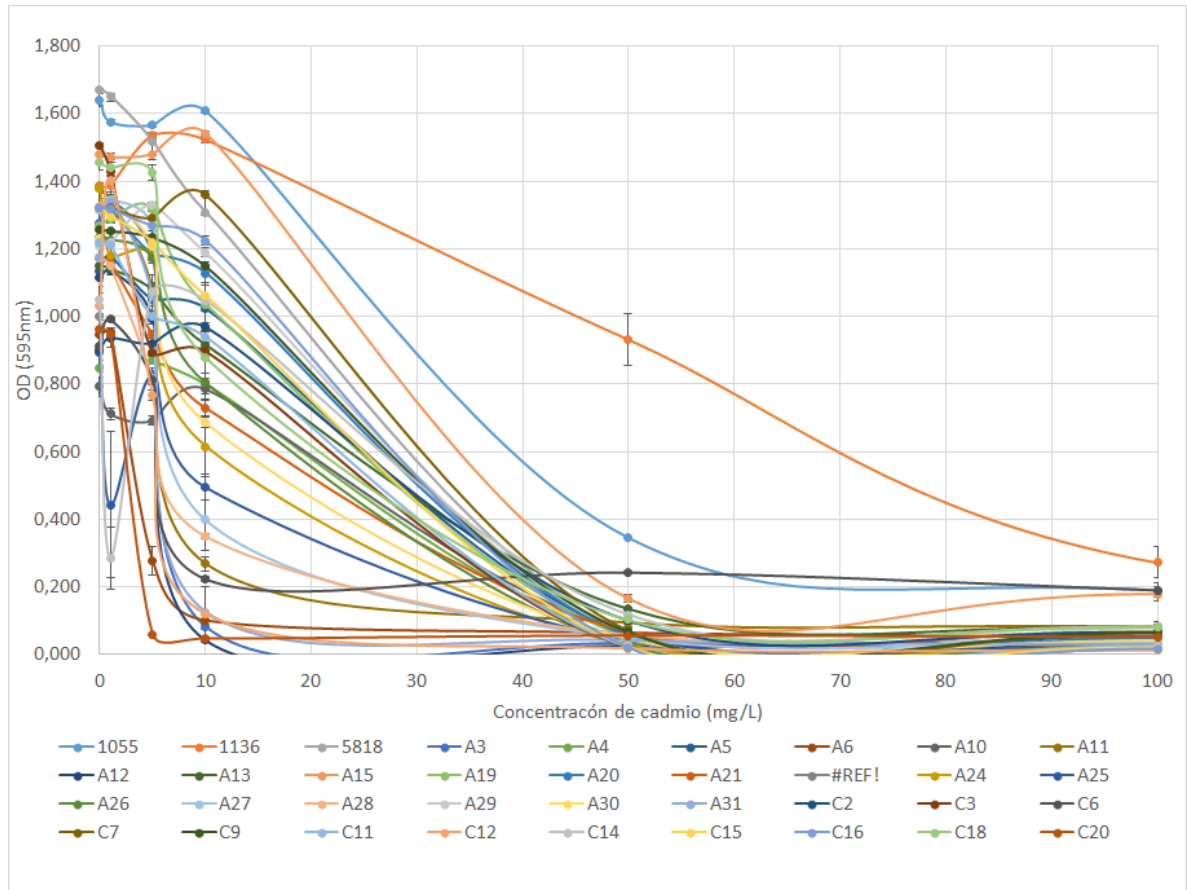


Figura A1-3 Crecimiento de *Lactobacillus* spp. (aisladas de fermento de cacao y cepas de referencia) a diferentes concentraciones de Cd(II) en un rango de 0 a 100mg/L, cada bacteria se evaluó por triplicado.

Bibliografía

- Alimolaei, M., Golchin, M. (2016). An Efficient DNA Extraction Method for *Lactobacillus casei*, a Difficult-to-Lyse Bacterium. *International Journal of Enteric Pathogens*, 4(1), 35-40.
- Alonso, D., Latorre, S., Castillo, E., Brandão, P. F. B. (2014). Environmental occurrence of arsenic in Colombia: A review. *Environmental Pollution*, 186 (1), 272–281.
- Ardhana, M., Fleet, G. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 87-99.
- Arias, V., Rodriguez, A., Bardos, P., Naidu, R. (2018). Contaminated land in Colombia: A critical review of current status and future approach for the management of contaminated sites. *Science of The Total Environment*, 618(1), 199-209.
- Bhakta, J. N., Ohnishi, K., Muneke, Y., Iwasaki, K. (2010). Isolation and Probiotic Characterization of Arsenic-Resistant Lactic Acid Bacteria for Uptaking Arsenic. *International Journal of Bioengineering and Life Sciences*, 4(11), 831-838.
- Bhakta, J. N., Ohnishi, K., Muneke, Y., Iwasaki, K., Wei, M. Q. (2012). Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1), 1193–1206.
- Bienert, G., Desguin, B., Chaumont, F., Hols, P. (2013). Channel-mediated lactic acid transport: a novel function for aquaglyceroporins in bacteria. *The Biochemical journal*, 454(1), 559–570.
- Bravo, D., Pardo-Díaz, S., Benavides-Erazo, J., Rengifo-Estrada, G., Braissant, O., Leon-Moreno, C. (2018). Cadmium and cadmium-tolerant soil bacteria in cacao crops from northeastern Colombia. *Journal of Applied Microbiology*, 124(5), 1175-1194.
- Butel, M. J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Medecine et maladies infectieuses*, 44(1),1-8.

- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., ... De Vuyst, L. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1809–1824.
- Cheng, W., Tian, F., Qixiao, T., Wang, G., Liu, X., Zhang, Q., Fan, D., Zhao, J., Zhang, H. (2012). Strain of cadmium-removing *Lactobacillus plantarum* bacterium, and uses of the same, United States. US9451781B2 2012.
- Chou, L. S., Weimer, B. (1999). Isolation and Characterization of Acid and Bile-Tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 82(1), 23-31.
- Das, S., Dash, H. R. (2017). *Handbook of Metal-Microbe Interactions and Bioremediation*. Boca Raton: Taylor & Francis.
- De Angelis, M., Bini, L., Pallini, V., Cocconcelli, P., Gobbetti, G. (2001). The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Microbiology* (2001), 147(1), 1863–1873
- De S., Kaur, G., Roy, A., Dogra, G., Kaushik, R., Yadav, P., et al. (2010). A simple method for the efficient isolation of genomic DNA from Lactobacilli isolated from traditional indian fermented milk (dahi). *Indian Journal of Microbiology*, 50(1), 412–418.
- De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F., Schleifer, G. M., Whitman, W. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. New Delhi: Springer-Verlag New York. 465-466.
- De Vuyst, L., Lefeber, T., Papalexandratou, Z., & Camu, N. (2010). The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. In *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. 301–325.
- Dohrmann, A., & Tebbe, C. (2008). Section 3 update: Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Molecular Microbial Ecology Manual*.
- Fonseca, F., Cenard, S., Passot, S. (2015) Freeze-Drying of Lactic Acid Bacteria. In: Wolkers W., Oldenhof H. (eds) *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, Vol 1257. Springer, New York.

- Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2(1), 106–117.
- García.Cáceres, R., Perdomo, A., Ortiz, O., Beltrán, P., López, K. (2014). Characterization of the supply and value chains of Colombian cocoa. *Dyna*, 81 (187), 30-40.
- Gerbino, E., Carasi, P., Tymczyszyn, E. E., & Gómez-Zavaglia, A. (2014). Removal of cadmium by *Lactobacillus kefir* as a protective tool against toxicity. *Journal of Dairy Research*, 81(3), 280-287.
- Gerbino, E., Mobili, P., Tymczyszyn E., Fausto, R., Gómez-Zavaglia, A. (2011). FTIR spectroscopy structural analysis of the interaction between *Lactobacillus kefir* S-layers and metal ions. *Journal of Molecular Structure*, 987(1), 186–192.
- Giraffa G., Chanishvili N., & Widyastuti Y. (2010). Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, 161(6), 480–487.
- Halttunen, T., Kankaanpää, P., Ouwehand, A., Tahvonen, R., Salminen, S. (2003). Cadmium decontamination by lactic acid bacteria. *Bioscience Microflora*, 22(3), 93-97.
- Halttunen, T., Finell, M., Salminen, S. (2007a). Arsenic removal by native and chemically modified lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1), 173–178.
- Halttunen, T., Salminen, S., Tahvonen, R. (2007b). Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 30-5.
- Halttunen, T., Salminen, S., Jussi, M., Rajja, T., & Kalle L. (2008). Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125(2), 170-175.
- Hansda A, Kumar V, Anshumali (2016) A comparative review towards potential of microbial cells for heavy metal removal with emphasis on biosorption and bioaccumulation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(170), 1-14.
- Ho V. T. T., Zhao J., & Fleet G. (2015). The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 205(1), 54–67.

- Holzapfel, W. H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., & Schillinger U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 365–373.
- Ibrahim, F., Halttunen, T., Tahvonen, R., & Salminen, S. (2006). Probiotic bacteria as potential detoxification tools: assessing their heavy metal binding isotherms. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(1), 877–885.
- Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68(1), 167–182.
- Kinoshita, H., Sohma, Y., Ohtake, F., Ishida, M., Kawai, Y., Kitazawa, H., ... Kimura, K. (2013). Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. *Research in Microbiology*, 164(1), 701-709.
- König, H., Fröhlich, J. (2017) Lactic Acid Bacteria. In: König H., Uden G., Fröhlich J. (eds) *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer, Cham.
- Kumar, R., Kaur, M., Garsa, A. K., Shrivastava, B., Reddy, V. P., Tyagi, A. (2015). Natural and Cultured Buttermilk. In: Puniya A. K., editor. *Fermented milk and dairy products*. CRC Press/Taylor and Francis. 203–225.
- Kumar, N., Kumar, V., Panwar, R., & Chand, R. (2017). Efficacy of indigenous probiotic *Lactobacillus* strains to reduce cadmium bioaccessibility - An in vitro digestion model. *Environ Environmental Science and Pollution Research*, 24(1), 1241-1250.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15(2), 67–78.
- Lima, L. J. R., Almeida, M. H., Nout, M. J. R., Zwietering, M. H. (2011). Theobroma cacao “The Food of the Gods”: quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(1), 731–761.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23(1), 3-25.

- Liu, Y., Tang, H., Lin, Z., Xu, P. (2015). Mechanisms of acid tolerance in bacteria and prospects in biotechnology and bioremediation. *Biotechnology Advances*, 33(1), 1484–1492.
- Mandal, B. K., Suzuki, K. T. (2002) Arsenic round the World: A Review. *Talanta*, 58(1), 201-235.
- Mergeay M. (1995) Heavy metal resistances in microbial ecosystems. In: Akkermans A.D.L., Van Elsas J.D., De Bruijn F.J. (eds) *Molecular Microbial Ecology Manual*. Springer, Dordrecht.
- Monachese, M. A. (2012). Sequestration of lead, cadmium and arsenic by *Lactobacillus* species and detoxication potential. Thesis submitted University of Western Ontario, 1-154.
- Montaño-Salazar, S. M., Lizarazo-Marriaga, J., Brandão, P. F. B. (2018). Isolation and potential biocementation of calcite precipitation inducing bacteria from Colombian buildings. *Current Microbiology*, 75(3), 256–265.
- Mosa, K., Saadoun, I., Kumar, K., Helmy, M., Parkash O., (2018). Potential Biotechnological Strategies for the Cleanup of Heavy Metals and Metalloids. *Plant Biotechnol Reports*, 12(1), 1–14.
- Pacheco-Montealegre, M. E., Dávila-Mora, L. L., Botero-Rute, L. M., Reyes, A., Caro-Quintero, A., (2019). Fine grained longitudinal analysis of cocoa bean fermentation 1 provides insights into the dynamics of microbial populations. *Biorxiv*, The preprint server for biology. Cold Spring Harbor Laboratory. Preprint posted July 15.
- Palm, K., Luthman, K., Ungell, A. L., Strandlund, G., Artursson, P. (1996). Correlation of drug absorption with molecular surface properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(1), 32-39.
- Polak-Berecka, M., Szwajgier, D., Wásko, A. (2014). Biosorption of Al⁺³ and Cd⁺² by and Exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Food Science*, 79(1), 404-408.
- Polak-Berecka, M., Boguta, P., Ciesla, J., Bieganowski, A., Skrzypeck, T., Czernecki, T., & Wásko, A. (2017). Studies on the removal of Cd ions by gastrointestinal lactobacilli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1), 3415-3425.

- Quigley E. M. M. (2010). Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacological Research*, 61(3), 213–218.
- Saito, V. S. T., Dos Santos, T. F., Vinderola, C. G., Romano, C., Nicoli, J. R., Araújo, L. S., ... Uetanabaro, A. P. T. (2014). Viability and resistance of lactobacilli isolated from cocoa fermentation to simulated gastrointestinal digestive steps in soy yogurt. *Journal of Food Science*, 79(2), 208–213.
- Satarug, S., Baker, J. R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, M., Reilly, P. E. B., Williams, D. J., Moore, R. A. (2003). Global Perspective on Cadmium Pollution and Toxicity in Non Occupationally Exposed Population. *Toxicology Letters*, 137(1-2), 65-83.
- Sebastian, A., Prasad, M. N. V. (2014). Cadmium minimization in rice: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(1), 155–173.
- Shen, S., Li, X., Cullen, W., Weinfeld, M., Le. X. (2013). Arsenic Binding to Proteins. *Chemical Reviews*, 113(1), 7769–7792
- Singh A. L., Sarma P. N. (2010). Removal of arsenic(III) from waste water using *Lactobacillus acidophilus*. *Bioremediation Journal*, 14(2), 92–97.
- Sips, A., Bruil, M., Dobbe, C., Kamp, E., Oomen, A., Pereboom, D., Rompelberg, C., Zeilmaker, M., (2001). RIVM report 711701012/2001. Bioaccessibility of contaminants from ingested soil in humans. Method development and research on the bioaccessibility of lead and benzo[a]pyrene (<https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/711701012.pdf>).
- Slover C. M., Danziger L. (2008). *Lactobacillus*: a review. *Clinical Microbiological Newsletter*, 30(4), 23-27.
- Spiro, T., Stigliani, W. (2007). *Química medioambiental*. Segunda edición. Madrid: PEARSON. Prentice Hall.
- Sun, Z., Harris, H. M., McCann, A... Toole, P. (2015). Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nature communications*, 6(8322), 1-13.
- Van de Wiele, T., Oomen, A., Wragg, J., Cave, M., Minekus, M., Hack, A., Cornelis, A., Rompelberg, C... Sips A. (2007). Comparison of five *in vitro* digestion models: lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract. *Journal of environmental science health*, 42(9), 1203-1211.

- Van Het Hof, K. H., West, C. E., Weststrate, J. A., Hautvast, J. G. (2000). Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *The journal of nutrition*, 130(3), 503-506.
- Veglio, F., & Beolchini, F. (1997). Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy*, 44(1), 301 -316.
- Versantvoort, C., Van de Kamp, E., Rompelberg, C. (2002) RIVM report 320102002/2004. Development and applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food (<https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/320102002.pdf>)
- Versantvoort, C., Van de Kamp, E., Rompelberg, C., Sips, A. (2005) Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, 43(1), 31-40.
- Wacher, M. (2011). Microorganismos y chocolate. *Revista Digital Universitaria*, 12(4), 1-9.
- Weisburg, W. G. S., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(1), 697-703.
- Wienk, K., Marx, J. Beynen, A. (1999). The concept of iron bioavailability and its assessment. *European Journal of Nutrition*, 38(2), 51-75.
- Yuswir, N., Praveena, S., Aris, A., Hashim, Z. (2013). Bioavailability of heavy metals using *in vitro* digestion model: a state of present knowledge. *Reviews on Environmental Health*, 28(4), 181-187.
- Zhai, Q, Xiao, Y, Zhao, J, Tian, F, Zhang, H, Narbad, A, Chen, W. (2017). Identification of key proteins and pathways in cadmium tolerance of *Lactobacillus plantarum* strains by proteomic analysis. *Scientific Reports*, 7(1),1182.
- Zhai, Q., Guo, Y., Tang, X., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W. (2019). Removal of cadmium from rice by *Lactobacillus plantarum* fermentation. *Food Control*, 96(1), 357-364.
- Zhai, Q., Wang, G., Zhao, J., Liu, X., Tian, F., Zhang, H., Chen, W. (2013). Protective effects of *Lactobacillus plantarum* ccfm8610 against acute cadmium toxicity in mice. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(5), 1508-1515.

Zoghi, A., Khosravi-Darani, K., Sohrabvandib, S. (2014). Surface Binding of Toxins and Heavy Metals by Probiotics. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 14(1), 84-98.