



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



 **iata**
Instituto de Agroquímica
y Tecnología de Alimentos

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS ÁCIDOS LIPOTEICOICOS EN LA CAPTACIÓN DE MERCURIO EN *Lactobacillus plantarum*.

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN
DE LA SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNA:

CARMEN LIZ SANDRA SOLIS MÁLAGA

TUTORA ACÁDEMICA:

GABRIELA CLEMENTE POLO

DIRECTORES EXPERIMENTALES:

VICENTE MONEDERO GARCIA

MANUEL ZÚÑIGA CABRERA

Curso Académico:

2017-2018

VALENCIA, 5 DE JULIO DEL 2018

ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS ÁCIDOS LIPOTEICOICOS EN LA CAPTACIÓN DE MERCURIO EN *Lactobacillus plantarum*.

Solís-Málaga C¹, Zúñiga M², Monedero V²

RESUMEN

Las bacterias lácticas (BL), constituyen un grupo microbiano muy importante debido a su uso en alimentos; algunas de sus cepas poseen la capacidad de captar metales pesados, lo que permitiría usarlas como herramienta para la detoxificación de mercurio a nivel intestinal, al reducir su bioaccesibilidad y promover su eliminación en heces. Diversas moléculas bacterianas, como el polifosfato o los ácidos teicoicos de la superficie celular, han sido caracterizadas por su capacidad de interacción y captura de cationes metálicos. Se han propuesto varios mecanismos como la adsorción, quelación o la interacción electrostática para los procesos de captación de metales pesados por estas bacterias. En estudios anteriores, se ha planteado la necesidad de estudiar qué componente de la pared celular es el que proporciona a estas bacterias la capacidad de captación de metales pesados. En el presente trabajo se estudió el papel del ácido lipoteicoico (LTA) de la pared celular de *L. plantarum* en la captación de mercurio en su forma orgánica (CH₃Hg) e inorgánica [(Hg(II)], llevando a cabo ensayos con cepas de *L. plantarum* silvestres (WCFS1 y Lpp +) y sus mutantes (WCFS1 *ltaS* 5 y Lpp+ *ltaS* 2), modificados a través de técnicas moleculares en el gen *ltaS*, que codifica la enzima sintasa del LTA. Esta enzima cataliza la polimerización del LTA mediante la adición de moléculas de fosfatidilglicerol, con lo que estas cepas son incapaces de sintetizar LTA. Mediante ensayos de toxicidad, caracterización de las propiedades de la superficie celular, capacidad de captación y retención de mercurio Hg(II) y CH₃Hg, se muestra que *L. plantarum* posee una fuerte unión al mercurio y que esta capacidad se ve parcialmente afectada por la ausencia de LTA.

Palabras Claves:

Lactobacillus plantarum, ácidos lipoteicoicos, metales pesados, mercurio inorgánico y metilmercurio.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (BL) are a very important microbial group due to their use in foods. On the other hand, some strains possess the ability to capture heavy metals, which would allow them to be used as a tool for the detoxification of mercury at the intestinal level, by reducing their bioavailability and promoting their elimination in feces.

Various bacterial molecules, such as polyphosphate or teichoic acids on the cell surface, have been characterized by their ability to interact and capture

¹ Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n 46022. Valencia. España.

² Laboratorio de Bacterias Lácticas, Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos, Científicas (IATA-CSIC). Av. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia, España.

metal cations. Several mechanisms have been proposed, such as adsorption, chelation or electrostatic interaction for the heavy metal uptake processes by these bacteria. In previous studies the need to study which component of the cell wall provides these bacteria with the ability to retain heavy metals has been raised. In the present study, the role of lipoteichoic acid (LTA) from *L. plantarum* in the uptake of mercury in its organic (CH₃Hg) and inorganic form [(Hg (II))] was determined, carrying out tests with strains *L. plantarum* WCFS1 and Lpp+, and their modified mutants in the *ltaS* gene, which encodes the LTA synthase enzyme. This enzyme catalyzes the polymerization of LTA by the addition of phosphatidylglycerol molecules, whereby these strains are unable to synthesize LTA in their cell walls. Through toxicity assays, characterization of cell surface properties, mercury uptake and retention capacity of Hg(II) and CH₃Hg, it has been shown that *L. plantarum* has a strong binding for mercury and this capacity is partially affected by the absence of LTA.

Keywords

Lactobacillus plantarum, lipoteichoic acids, heavy metals, inorganic mercury and methylmercury.

RESUM

Els bacteris làctics (BL), constitueixen un grup microbià molt important a causa del seu ús en aliments. D'altra banda, alguns ceps posseïen la capacitat de captar metalls pesants, la qual cosa permetria usar-les com a ferramenta per a la detoxificació de mercuri a nivell intestinal, al reduir la seua bioaccessibilitat i promoure la seua eliminació en excrements. Diverses molècules bacterianes, com el polifosfat o els àcids teicoics de la superfície cel·lular, han sigut caracteritzades per la seua capacitat d'interacció i captura de cations metàl·lics. S'han proposat diversos mecanismes com l'adsorció, quelació o la interacció electrostàtica per als processos de captació de metalls pesants per estos bacteris. En estudis anteriors, s'ha plantejat la necessitat d'estudiar quin component de la paret celular, és el que els proporciona a estos bacteris la capacitat de retenció de metalls pesants. En el present estudi es va determinar el paper de l'àcid lipoteicoic (LTA) de la paret cel·lular de *L. plantarum* en la captació de mercuri en la seua forma orgànica (CH₃Hg) i inorgànica [(Hg (II))], duent a terme assajos amb ceps de *L. plantarum* WCFS1 i Lpp +, i els seus mutants modificats a través de tècniques moleculars en el gen *ltaS*, que codifica l'enzim sintasa del LTA. Este enzim catalitza la polimerització del LTA per mitjà de l'addició de molècules de fosfatidilglicerol, amb la qual cosa estos ceps són incapaços de sintetitzar LTA en les seues parets cel·lulars. Per mitjà d'assajos de toxicitat, caracterització de les propietats de la superfície cel·lular, capacitat de captació i retenció de mercuri Hg(II) i CH₃Hg, s'ha demostrat que *L. plantarum* poseeix una forta unió del mercuri i que esta capacitat es veu parcialment afectada per l'absència de LTA.

Paraules Claus:

Lactobacillus plantarum, àcids lipoteicoics, metalls pesants, mercuri inorgànic i metilmercuri.

I. INTRODUCCIÓN

El mercurio es uno de los elementos más contaminantes y de mayor distribución en la naturaleza y el medio ambiente; el agua, el aire y los alimentos son fuentes primarias de exposición a este elemento, el cual puede presentarse en los alimentos normalmente en forma de mercurio divalente $Hg(II)$ y metilmercurio CH_3Hg . Este elemento tóxico es liberado al medioambiente a través de procesos naturales, debido a la actividad volcánica y erosión de las rocas por acción del agua y el viento. Sin embargo, también puede liberarse a través de la acción del hombre mediante numerosas actividades como: la industria, la minería, quema de combustibles fósiles, eliminación de residuos, entre otras.

En la Figura 1, podemos observar que el mercurio, en el medio ambiente, sufre una serie de transformaciones y ciclos entre la atmósfera, océanos y suelo, se puede presentar de tres formas distintas: Mercurio metálico o elemental $[Hg(0)]$, mercurio inorgánico $[Hg(I)$ y $Hg(II)]$ y mercurio orgánico CH_3Hg .

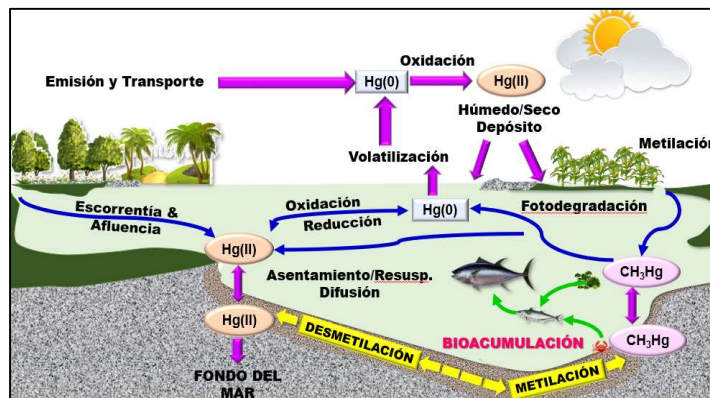


FIGURA 1. Ciclo geoquímico del mercurio en el medio ambiente.

El CH_3Hg afecta al sistema nervioso central en desarrollo, de ahí que el feto y los niños más pequeños sean los más sensibles a este metal. El $[Hg(II)]$ afecta principalmente al riñón, causando un aumento de su peso, aunque también puede afectar a otros órganos como el hígado, sistema nervioso, sistema inmune, sistemas reproductores y del desarrollo, pero a dosis mayores que el CH_3Hg . La FAO/OMS estableció una ingesta tolerable de mercurio inorgánico de $4 \mu g/semana/kg$ peso corporal aplicable a la exposición alimentaria para alimentos distintos de pescado y marisco. La EFSA el 2012 actualizó su opinión fijando valores de ingesta semanal tolerable (IST) de CH_3Hg en $1.3 \mu g/kg$ de peso corporal y en $4 \mu g/kg$ de peso corporal para el $Hg(II)$.

Por otro lado, las bacterias ácido lácticas (BAL), son bacterias Gram-positivas anaerobias aerotolerantes, denominadas así debido a que la mayoría de sus miembros convierten los azúcares en ácido láctico, dando lugar a la fermentación láctica.

TABLA 1: Especies de mercurio mayoritarias en muestras biológicas y medioambientales

MERCURIO ELEMENTAL	Mercurio metálico Hg (0)	Hg ⁰
MERCURIO INORGÁNICO	Mercurioso Hg(I) Mercúrico Hg(II) Sales inorgánicas de mercurio X: -OH; -CN; -Cl; -Br	Hg ₂ ⁺² Hg ⁺² HgX ₂ HgX ₃ ⁻ HgX ₄ ²⁻
MERCURIO ORGÁNICO	Metilmercurio (MeHg ⁺) Dimetilmercurio (Me ₂ Hg) Etilmercurio (EtHg ⁺) Fenilmercurio (PhHg)	CH ₃ Hg ⁺ (CH ₃) ₂ Hg CH ₃ CH ₂ Hg ⁺ CH ₆ CH ₅ Hg ⁺
Fuente: EFSA 2012		

Poseen requerimientos nutricionales complejos y están integradas por alrededor de 124 especies, que incluyen especies homofermentativas obligadas, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas obligadas. Utilizando la glucosa como fuente de carbono pueden producir más del 85% de ácido láctico por la glucólisis; las especies heterofermentativas producen ácido láctico, CO₂, etanol y/o ácido acético en cantidades equimolares. En general son benignas e incluso necesarias, habitan en el cuerpo humano y de otros animales; estando presentes, mayoritariamente en el tracto gastrointestinal y en la vagina.

Así mismo los *Lactobacillus*, son el género de BAL más relevante, estos han sido cruciales en la elaboración de productos fermentados durante siglos. Recientemente, se ha prestado más atención a sus capacidades probióticas y promotoras de la salud. Su habita natural es diverso pudiéndolos encontrar en el aparato gastrointestinal de mamíferos y aves e incluyendo alimentos de origen vegetal y animal.

El presente trabajo de investigación se ha centrado básicamente en el estudio de cepas de *L. plantarum* silvestres y mutantes en LTA. Esta especie, es una de las más conocidas entre las BAL. Son bacilos cortos heterofermentativos facultativos y comúnmente se encuentran en diversos productos fermentados y también se presentan en la saliva y el tracto gastrointestinal.

En cuanto a la pared celular, la mayoría de Gram-positivos se caracteriza por una capa gruesa de peptidoglucano (PG). Esta multicapa de PG está compuesta de 20 a 100nm de espesor desempeña un papel primordial en la integridad estructural y de protección de la célula contra la lisis. Está decorada adicionalmente de forma covalente y no covalente con los ácidos teicoicos, polisacáridos y proteínas. Los PG están compuestos de cadenas de glucanos de repetición de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc) repetidamente reticulados mediante dos cadenas laterales pentapéptidas. Los ácidos teicoicos (TA) son el segundo componente principal de la pared celular de la mayoría de bacterias Gram positivas (20 al 50% del peso seco de la pared celular). Estos polímeros aniónicos de la pared celular, generalmente están formados por unidades repetitivas de fosfato de poliglicerol o polirribitol covalentemente ancladas al PG (TA de pared [WTA])

o unidas a la membrana citoplásmica (ácidos lipoteicoicos [LTA]). Tanto la WTA como la LTA a menudo se sustituyen con ésteres de glicósido o D-alanila, que compensa la carga negativa de los fosfatos). Aunque todos los lactobacilos tienen LTA en sus paredes celulares, no todas las paredes celulares de *Lactobacillus* parecen contener WTA. Por ejemplo, la pared celular de muchas cepas de *L. rhamnosus* y *L. casei* solo contienen LTA, en contraste con la mayoría de las cepas de *L. plantarum*, que contienen LTA y WTA. Las LTA y WTA son responsables en gran medida de la carga negativa de las bacterias Gram-positivas dado que se trata de ácidos fuertes y contribuyen a determinar la porosidad y carga electrostática de la envoltura celular. Pero su carga negativa contribuye también a la homeostasis de cationes, principalmente de Mg^{2+} . La carga neta negativa que aportan los TA a la pared, permite a la bacteria interactuar con cationes como el Pb o Cd, entre otros metales, explicando los fenómenos de bioadsorción.

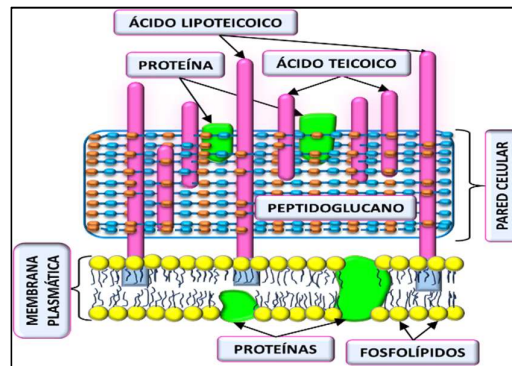


FIGURA 2: Estructura de la superficie celular de Grampositivas, compuesta por la membrana celular bilipídica; múltiples capas de peptidoglucano; proteínas asociadas a la pared celular; ácidos lipoteicoicos; ácidos teicoicos de la pared; proteína de membrana asociada; proteínas incrustadas en la membrana celular.

Las bacterias Gram positivas en especial, el género *Lactobacillus* tiene una alta capacidad de adsorción de metales, esto posiblemente sea debido al alto contenido de PG y TA de su pared celular. Un proceso que utiliza biomasa viva o muerta, para retirar o inmovilizar iones metálicos de un medio líquido o sólido, es la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. La acumulación por parte de lactobacilos de metales tóxicos podría promover su eliminación en heces, reduciendo su bioaccesibilidad a nivel intestinal.

Los principales mecanismos que explican la retención pasiva o secuestro del metal en las diferentes partes del biosorbente (biosorción) son: (i) La complejación: Consiste en que el metal se une a los centros activos de la pared celular mediante enlaces químicos formando determinados complejos y la adsorción física, que es la unión entre la superficie del sorbente y el metal, se produce por fuerzas de atracción electrostática o de Van der Waals. (ii) El intercambio iónico: Es propio de los iones metálicos divalentes que se intercambian con iones propios de los polisacáridos presentes en la biomasa. Gran parte de los sorbentes contienen sales de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} en sus estructuras. Estos cationes pueden ser intercambiados por los iones metálicos quedando éstos unidos al material. (iii) La precipitación y quimiosorción: Estos

son otros mecanismos de sorción menos frecuentes. En la quimiosorción la unión entre sorbente y metal se produce por enlaces químicos mediante el intercambio de electrones. Por otro lado, en la precipitación el mecanismo está asociado a la formación de un complejo en la pared celular que posteriormente es hidrolizado. En tanto la acumulación de iones metálicos en las BAL, así como en otros microorganismos, es un proceso complejo que depende del mecanismo básico de biosorción, y de bioacumulación asociados al metabolismo en el cual los iones metálicos atraviesan la membrana celular, logrando acumularse dentro de la célula (Mrvcic et al., 2012). Asimismo, es como alguna microbiota intestinal Gram-positiva e.g. los *Lactobacillus* empleados en aplicaciones alimentarias significarían un complemento potencial para reducir la toxicidad de metales pesados en humanos y animales. Por otra parte, las fuerzas físicas como, las interacciones electrostáticas podrían ser las responsables de generar una unión pasiva de metales pesados sobre la superficie celular de BAL (Salim et al., 2011) y se ha considerado también que componentes tales como polisacáridos y principalmente los TA, contribuyen en optimizar la biosorción de metales pesados. El presente estudio plantea el uso de cepas silvestres y mutantes deficiente en LTA para evaluar la posible contribución del LTA al proceso de captación de mercurio por *L. plantarum*. Para ello se han propuestos los siguientes objetivos:

(1) Determinar las diferencias en las características de la superficie de cepas silvestres y mutantes *ltaS* de *L. plantarum* mediante ensayos de unión a moléculas cargadas positivamente.

(2) Caracterizar la toxicidad del Hg(II) y CH₃Hg en las diferentes cepas mediante pruebas de crecimiento en placa y medio líquido en presencia de diferentes concentraciones del metal tóxico.

(3) Estudiar la influencia de la presencia o no de LTA en la superficie celular sobre la capacidad de captación y retención de mercurio por las cepas silvestres y mutantes que serán expuestas a este tóxico, bajo diversos tratamientos (e.g. calor, lavado con quelantes) y determinar la estabilidad de la interacción bacteria-mercurio y compararlo entre cepas silvestres y mutantes *ltaS*.

La consecución de estos objetivos permitirá un mejor conocimiento de los procesos que median la captación de metales en bacterias lácticas, lo que contribuirá a una selección y uso más racional de cepas y a la posible aplicación de estrategias de mejora.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas de *L. plantarum* utilizadas en el estudio

Se han llevado a cabo ensayos con cepas de *L. plantarum* silvestres y mutantes derivados obtenidos por técnicas moleculares. Estas cepas son mutantes en el gen *ltaS*, que codifica la enzima sintasa del LTA, la cual cataliza la polimerización del LTA mediante la adición de moléculas de fosfatidilglicerol (PG), derivadas de los lípidos de membrana, con lo que son

incapaces de sintetizar LTA en sus paredes celulares. A continuación, se describe la metodología para la realización de este estudio. Se utilizaron cultivos frescos de cepas silvestres (WCFS1 y Lpp+) y mutantes (WCFS1 *ltaS* 5 y Lpp+ *ltaS* 2) de *L. plantarum*. Las bacterias se cultivaron a 30°C durante 24h en medio MRS (de Man, Rogosa and Sharpe), bajo condiciones estáticas. Para el caso de las cepas mutantes se añadió eritromicina (5 mg/mL) para mantener la mutación en todos los ensayos. Para el medio sólido se preparó añadiendo 1.8% (p/v) de agar y para el medio blando preparó con 0.8% (p/v) de agar.

Las cepas empleadas en este estudio han sido generadas por el Laboratorio de Bacterias Lácticas y Probióticos del IATA, lugar donde se desarrolló el trabajo de investigación. Estas cepas estaban mantenidas por medio de glicerizados de las bacterias crecidas en medio MRS, propio del cultivo de *L. plantarum* y glicerol al 15% (v/v), que permite conservar las cepas a -80°C, para su posterior uso, realizando una siembra en placas por el método de triple estría e incubando el medio a 30°C por 24h, y de este modo activar las cepas y obtener colonias aisladas. Se emplearon dos medios de cultivo, el medio MRS lactobacilos y el medio MEI (5 g/L extracto de levadura, 5 g/L triptona, 4 g/L K₂HPO₄, 5 g/L KH₂PO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.005% MnSO₄, 1 ml/L Tween80 y 0.5% Glucosa), este medio es menos enriquecido que el MRS. Su diferencia principal está en una menor cantidad de extractos proteicos y ausencia de extracto de carne, lo que permite que la toxicidad del mercurio sea mayor y estudiar mejor las diferencias entre cepas. El MRS es un medio más rico en nutrientes y permite un mejor crecimiento de las BAL.

2.2 Ensayo de unión al citocromo c para caracterizar la superficie celular.

El citocromo c, es una proteína globular de tipo catiónico, de 12.4 kDa de peso molecular, que se ha venido utilizando para determinar la densidad de la carga negativa de superficie en bacterias, ya que a un determinado pH (e.g. pH 7) el citocromo c es una molécula con carga positiva que puede interactuar con cargas negativas de la superficie, uniéndose a las células. Esta interacción puede determinarse cuantificando su presencia por su absorbancia a 530 nm. En este ensayo se cultivaron las cepas *L. plantarum*, WCFS1, Lpp+ y sus derivados WCFS1 *ltaS* 5 y Lpp+ *ltaS* 2, en 5 ml de medio MRS a 30 °C por 24h en incubación.

Luego se centrifugaron los medios crecidos a 3500rpm durante 10 min. Se realizaron 2 lavados con tampón 20 mM MOPS pH 7 y se concentraron las células resuspendiendo el pellet en 1 mL de MOPS. Se prepararon diluciones 1:100 para medir la DO a 600 nm y preparar tubos eppendorfs con 1 ml de dilución con una DO de 4 a 600 nm. Se adicionó a cada uno de los eppendorf 150 µg/ml de citocromo c, y se agitó en vortex. El contacto citocromo-bacteria se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente por un tiempo de 10 min, tras lo cual se centrifugaron a 12000 rpm (centrifuga sobremesa Eppendorf) por 5 min y se retiró el sobrenadante para medir su DO a 530 nm. Posteriormente se realizaron los cálculos de porcentaje de unión mediante la ecuación 1.

$$\left(\left[1 - \left(\frac{A_{530} \text{ con bacterias}}{A_{530} \text{ sin bacterias}} \right) \right] \times 100 \right) \quad \text{Ecuación 1.}$$

2.3 Ensayo de caracterización de la toxicidad de Hg(II) y CH₃Hg .

2.3.1 INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO POR DIFUSIÓN EN DISCO DE Hg(II) Y CH₃Hg EN SOBREPLACAS.

Mediante esta técnica de difusión en disco impregnado de mercurio podemos observar el grado de inhibición de las cepas WCFS1, Lpp+ y sus derivados WCFS1 *ItaS* 5 y Lpp+ *ItaS* 2, en medio de cultivo sólido en sobrecapa. Para llevar a cabo este ensayo, se cultivaron las cepas en 5 ml de MRS a 30 °C durante 24 h, después de centrifugar las células en los tubos se recogieron, lavaron y concentraron en PBS. Para ello se centrifugaron los tubos con las células crecidas a 3500rpm por 10min (centrifuga Hermle Z383 K con rotor 221.08 V01). Descartando el sobrenadante, se añadió 5 ml de PBS, para lavar resuspendiendo por agitación en vortex, se realizó 2 lavados; los pellets se concentraron en 1 ml de PBS y luego en una dilución 1:100, se midió la DO a 600 nm, mediante espectrofotómetro (Spectronic 20D, Milton Roy Company).

En 3ml de medio MEI blando, el cual se fundió a 100°C y se atempero en bloque térmico a 45 °C para realizar la inoculación en estado líquido, sin que el agar llegue a solidificar y a una temperatura que no comprometa la viabilidad de las bacterias, luego se adicionó una cantidad de inóculo calculada según la Ecuación 2, que representa una recta patrón que relaciona las UFC por mililitro con la DO y obtener una concentración de células bacterianas del orden de 10⁶ UFC/ml.

Esta concentración permite visualizar mejor el crecimiento de las cepas y la formación de los halos de inhibición. Es importante realizar el inóculo de células en medio líquido para poder homogenizar al vortex manteniendo una temperatura de 42 °C y después verter el agar MEI blando sobre placas Petri (medio MEI sólido).

$$Y = 8 \times 10^8 x - 6 \times 10^7 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde: X = Densidad óptica a 600nm; Y = UFC/ml

Luego se añadió mercurio a discos de papel filtro Whatman 3MM de 4mm de diámetro, a razón de 5 µL de una solución de Hg(II) y 3µL de una solución de CH₃Hg de 1000 ppm de concentración en ambos casos. Con pinzas estériles y en medio aséptico, se colocaron los discos sobre la superficie del medio MEI inoculado y sólido, 4 discos con Hg(II) y 3 discos con CH₃Hg. Posteriormente se incubaron las placas a 30 °C por 24 h, se realizaron 4 réplicas para cada forma de mercurio, después de la incubación se midieron los halos de inhibición del crecimiento.

2.3.2 CRECIMIENTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Hg(II) Y CH₃Hg.

Mediante las curvas de crecimiento microbiano en presencia de mercurio inorgánico Hg(II) y orgánico CH₃Hg a diferentes concentraciones planteamos determinar la toxicidad del metal en las cepas. Para ello se cultivaron en 5ml de medio MRS las cepas silvestres y mutantes a 30 °C por 24 h, bajo condiciones estáticas (5 mg/mL de eritromicina en mutantes). Después de la incubación, las cepas se recogieron, lavaron y concentraron. Se centrifugaron a 3500 rpm por 10 min (centrifuga Hermle Z383 K con rotor 221.08 V01), descartándose el sobrenadante. Se lavó el pellet con 5ml de *phosphate buffered saline* (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM fosfato pH 7.4; PBS), luego se eliminó el sobrenadante, las células se concentraron en 1ml de PBS. Con una dilución 1:10 se midió la DO a 595 nm en espectrofotómetro (Spectronic 20D, Milton Roy Company). Luego se preparó 4 ml de medio MRS y MEI con inóculo de las cepas a una DO de 0.05 a 595 nm, luego se repartieron en placas de 96 pocillos a razón de 100 µL. Se adicionó el mercurio inorgánico Hg(II) y orgánico CH₃Hg (a partir de un stock concentrado de 1000 ppm) en ambos medios a diferentes concentraciones: 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, y 10 ppm para medio MEI y de 0, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 ppm para medio MRS. La placa de 96 pocillos se incubó en un lector de placas multipocillos (POLARstar Omega, BMG Labtech, Offenburg, Alemania), a 30 °C por 24 h. Para cada una de las concentraciones se hicieron 4 réplicas para todos los ensayos. Los resultados se expresaron como la media y las desviaciones estándar, calculadas mediante el software GraphPad Prism 4.

2.4 Ensayo tratamiento de quelación con EDTA, después de la captación de Hg(II) y CH₃Hg.

En este ensayo analizamos la capacidad de retención de las cepas para luego determinar si existen diferencias significativas entre ellas con respecto al efecto del EDTA. Para ello se cultivaron las cepas en 10 ml de medio MRS a 30 °C por 24 h. Luego se recogieron, lavaron y concentraron las células. Se centrifugaron los medios cultivados a 3500 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y lavó 2 veces en 5ml de PBS. Finalmente se concentró el pellet en 1ml de PBS, preparando luego diluciones de 1:100 para medir la DO a 600nm, se prepararon tubo con 4 ml de disolución (PBS+cepas) con 0.5 de DO a 600 nm, adicionando 1 µL de una solución de 1000ppm de Hg(II) o de una solución de 1000ppm de CH₃Hg respectivamente a cada uno de ellos. Las muestras fueron por duplicado en cada tratamiento y su control. Se llevo a incubación por 1 h a 30 °C. Tras la incubación, las muestras se lavaron con 4 ml de PBS, luego se resuspendieron en 4 ml de PBS, las muestras se repartieron en tubos eppendorf a razón de 1 ml por tubo y a dos de ellos se añadió el quelante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) hasta 10 mM (solución stock de 0.5 M pH 8). Las muestras se mantuvieron en agitación constante por 1h a temperatura ambiente. Tras el contacto con quelante se centrifugó a 12000rpm por 5min en microcentrífuga de eppendorfs, eliminando el sobrenadante, se adiciono 1 ml de PBS para lavar y finalmente al pellet se

añadió 100 μL de HNO_3 concentrado (14 N) y se conservaron para posteriormente medir el mercurio retenido por las cepas.

2.5 Ensayo de influencia de la viabilidad de las bacterias en la captación de Hg(II) y CH_3Hg .

Mediante este ensayo analizamos la influencia de la viabilidad de las células en la captación del mercurio y comparamos en efecto que tienen en ambas cepas silvestres frente a sus mutantes. Para esto las cepas se cultivaron de la misma forma descrita anteriormente. Para el contacto de las cepas con Hg(II) y CH_3Hg se resuspendieron los sedimentos bacterianos y se calculó una DO de 0.5 a 595 nm. Se distribuyeron tubos eppendorf a 1 ml de muestra por triplicado de células viables y no viables. Las muestras denominadas viables se conservaron en hielo y las no viables, se sometieron a 80 °C en placa térmica por 15 min. Tras el tratamiento se adicionó 1 ppm de Hg(II) o CH_3Hg a cada uno de los eppendorf en un volumen final de 1 mL, los eppendorfs con las muestras tanto de Hg(II) como de CH_3Hg se llevaron a incubación a 30 °C por 1 h. La pérdida de viabilidad tras el tratamiento se determinó mediante contaje de las UFC/ml de las muestras mantenidas en el hielo y las tratadas térmicamente por diluciones seriadas y siembra en medio MRS. Después de la incubación, las bacterias se recogieron, lavaron y concentraron. Se centrifugó a 12000 rpm en centrífuga Eppendorf por 5 min. El sobrenadante se descartó y el pellet bacteriano se lavó 2 veces con 1mL de PBS. Al pellet de células obtenido, se añadió 100 μL de ácido nítrico (HNO_3) 14N, conservándose hasta el análisis de cuantificación del mercurio.

2.6 Determinación de mercurio en cepas silvestres y mutantes.

Las muestras de los ensayos se sometieron a una digestión ácida en horno de microondas (MARS, CEM, Vertex, España) y posterior cuantificación mediante generación de vapor en frío acoplada a espectrometría de fluorescencia atómica (CV-AFS) (Millennium Merlin PSA 75 10.025, PS Analytical, Reino Unido). Para la digestión en el horno microondas, las muestras se colocaron en reactores de teflón y se adicionaron 4 mL de HNO_3 14 mol/L (Merck, España) y 1 mL de H_2O_2 (30% v/v, Panreac, España). Los reactores fueron irradiados en el horno microondas a 800 W de potencia durante 15 min (180 °C). Tras el proceso de digestión, las muestras se colocaron en tubos de 15 ml y se dejaron reposar toda la noche con el fin de eliminar los vapores nitrosos que pudieran interferir en el análisis. Finalmente se llevaron a un volumen final de entre 8 y 15 ml con HCl al 0.6 mol/L. Las condiciones instrumentales empleadas se detallan en la Tabla 2. El control de la calidad analítica de la cuantificación se evaluó mediante el análisis de una muestra de agua de referencia (RTC, QCI-049-1, LGC Standards) con un contenido de mercurio certificado en $40.8 \pm 0.396 \mu\text{g/L}$.

TABLA 2. Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación del mercurio total mediante CV-AFS.

Disolución reductora	SnCl ₂ 2% (m/v) en HCl 1.8 mol/L. Flujo 4.5 mL/min	Tiempo de retorno	60 s
		Tiempo de demora	15 s
Blanco de reactivos	HCl al 0.6 mol/L. Flujo 9 mL/min	Tiempo de medida	40 s
Gas transportador	Argón. Flujo 0.1 L/min	Filtro	32
Gas de secado	Aire. Flujo 0.3 L/min	Rango de amplificación	100

2.7 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó, utilizando el paquete estadístico del programa GraphPad versión 4.0. Se aplicó la prueba t-Student y el análisis de la varianza con un sólo factor (ANOVA) con comparaciones múltiples post hoc mediante la prueba de Tukey HSD. Las diferencias se consideraron significativas para $p \leq 0.05$.

III. RESULTADOS

3.1 Porcentaje de unión al citocromo c de las cepas de *L. plantarum* silvestres y mutantes.

Este ensayo de unión de citocromo c, es clásico para la determinación de las propiedades de superficie de bacterias, es decir que al poner en contacto esta molécula cargada positivamente se produce una interacción con la bacteria que resulta en una unión citocromo-bacteria medible espectrofotométricamente. Se realizó este ensayo en las cepas tanto silvestres y mutantes *ltaS*, incapaces de producir LTA. La hipótesis inicial indicaba que la falta de LTA, un polímero de elevada densidad de carga negativa, produciría una disminución de la capacidad de los mutantes de unir citocromo c en comparación con las cepas silvestres. Sin embargo, como se observa en la Figura 3, los porcentajes de retención del citocromo c se incrementaron drásticamente en las dos mutantes *ltaS* en comparación con sus cepas parentales. La cepa WCFS1 es la que mostro una menor capacidad de unir citocromo, aun así, los porcentajes de unión de WCFS1 *ltaS* 5 llegaron a más del 90% bajo las condiciones del ensayo. La capacidad de unión de Lpp+ *ltaS* 2 también pasó a ser de más del 90%.

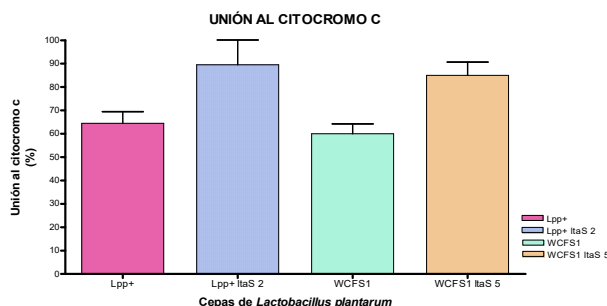


FIGURA 3. Porcentajes de unión al citocromo c de las cepas *L. plantarum*.

3.2 Inhibición por difusión en disco de Hg(II) y CH₃Hg sobre placas.

Para determinar una mejor cuantificación del efecto inhibitor del Hg(II) y CH₃Hg en las diferentes cepas silvestres y mutantes ensayados y confirmar los resultados obtenidos en el crecimiento en medio líquido, se realizaron ensayos de inhibición en placa con discos impregnados de Hg(II) y CH₃Hg usando medio MEI, en sobre capa con agar blando inoculado con las cepas. Al igual que para el crecimiento en medio líquido se demostró un mayor efecto inhibitor del CH₃Hg, que dio lugar a halos de inhibición mucho más grandes que Hg(II), tanto en las cepas silvestres como en sus mutantes. En la Figura 5, se puede observar que el efecto inhibitor fue mayor en la cepa mutante *ItaS* un efecto significativo en el caso de la cepa *Lpp+*. Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos en las curvas de crecimiento en medio líquido. El menor efecto aparente de la mutación en la cepa *Lpp+*, sobre todo con CH₃Hg, indica que la toxicidad del mercurio depende de alguna media de las condiciones de cultivo³.

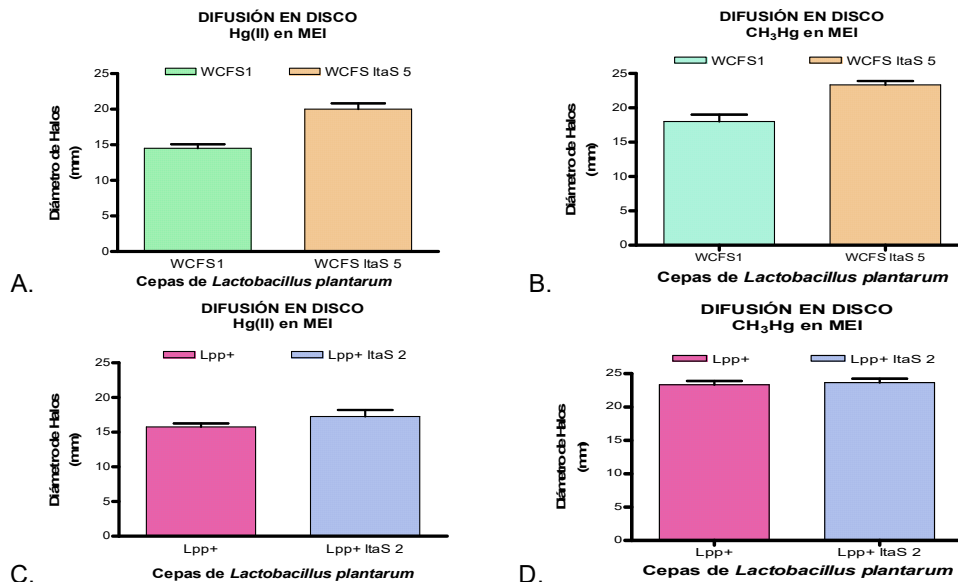


FIGURA 4. Halos de inhibición de crecimiento de las cepas silvestres (WCFS1 y *Lpp+*) y sus mutantes (*ItaS* 5 y *ItaS* 2) en Hg(II) (A y C) y CH₃Hg (B y D), bajo las condiciones de estudio a 30°C por 24h y en medio MEI.

3.3 Curvas de crecimiento de *L. plantarum* en Hg(II) y CH₃Hg

Para determinar el efecto de la falta de LTA sobre la toxicidad del mercurio en *L. plantarum* se realizaron curvas de crecimiento bacteriano de las diferentes cepas disponibles: WCFS1, *Lpp+* WCFS1 *ItaS* 5 y *Lpp+* *ItaS* 2, en presencia de mercurio inorgánico [Hg(II)] y orgánico (CH₃Hg) a concentraciones crecientes y en dos medios diferentes MRS y MEI. Se realizaron múltiples ensayos en diferentes días tanto para mercurio Hg(II) y

³ Microaerofilia y suspensión en el medio líquido y aerobiosis y crecimiento en soporte sólido en las placas de Petri.

CH₃Hg las concentraciones empleadas fueron para MRS de 0, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 ppm y 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, y 10 ppm para el medio MEI. En general, la toxicidad del mercurio fue mayor en medio MEI que en MRS⁴. En el caso del Hg(II), este tóxico no produjo una ausencia total de crecimiento a su mayor concentración en MRS (20ppm), aunque las cepas mutantes comparadas con sus silvestres vieron afectado drásticamente su crecimiento a esta concentración en termino de velocidad y biomasa final alcanzada. En el medio MEI la falta de crecimiento se registró a 10 ppm y la concentración de 5ppm afecto más severamente a la cepa WCFS1 en comparación con la Lpp+. Los mutantes *ltaS* de ambas cepas se vieron afectados por el Hg(II) en mayor medida que las cepas silvestres, cesando su crecimiento a 20 ppm (cepa Lpp+ *ltaS* 2, MRS), mostrando un tiempo de latencia mayor a una DO final menor de 5ppm (cepa Lpp+ *ltaS* 2, MEI). El efecto de la falta de LTA fue mayor para la cepa WCFS1, donde ya a 10ppm se manifestó la falta de crecimiento en el mutante *ltaS* en medio MRS y 2.5 ppm provocaron un periodo de latencia de más de 7h, con crecimiento reducido en comparación con la cepa silvestre en medio MEI.

Con respecto al CH₃Hg, esta forma de mercurio tuvo una toxicidad mayor que el mercurio inorgánico Hg(II), aunque el efecto de la mutación *ltaS* en la cepa Lpp+ fue limitado: ausencia de crecimiento a 20 ppm en MRS para ambas cepas, mientras que en medio MEI la inhibición total se detectó a 5ppm para el mutante en *ltaS*, registrándose a esta concentración un crecimiento residual en la cepa silvestre.

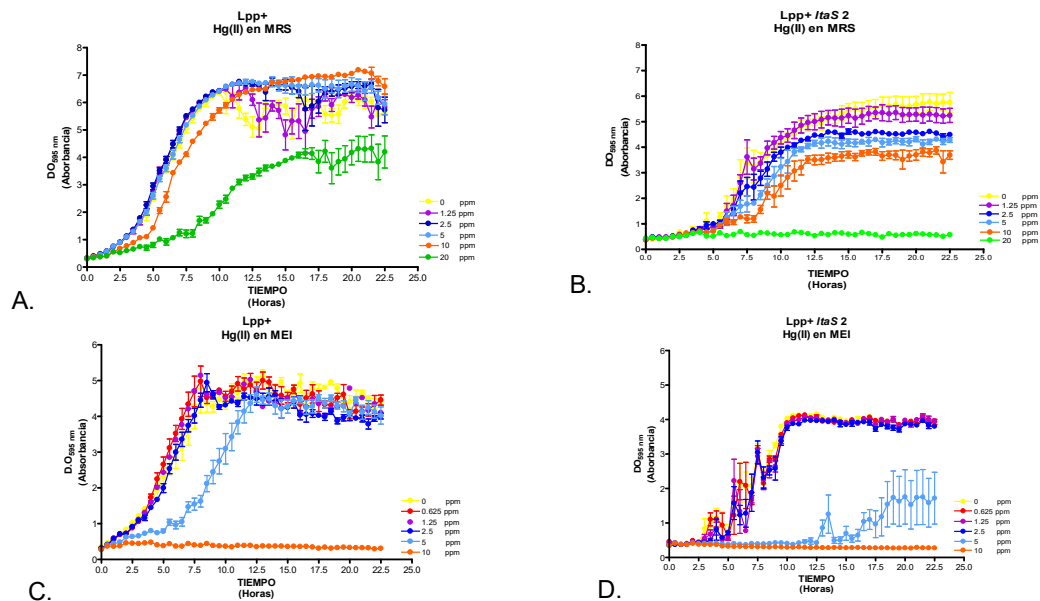


FIGURA 5. Curvas de crecimiento de las cepas Lpp+ y mutante Lpp+ *ltaS* 2 en medio MRS (A y B) y MEI (C y D) a diferentes concentraciones de mercurio inorgánico [Hg (II)]. Los gráficos representan la media de cuatro curvas de crecimiento bacteriano para las diferentes concentraciones.

⁴ Medio más rico.

Por el contrario, ya a 5 ppm se observó un fuerte efecto inhibitorio en la cepa WCFS1 en MRS y MEI, que se vio exacerbado en el mutante WCFS1 *ItaS* 5. En este mutante no se detectó crecimiento prácticamente a ninguna concentración de CH₃Hg ensayada, tanto en medio MRS como MEI.

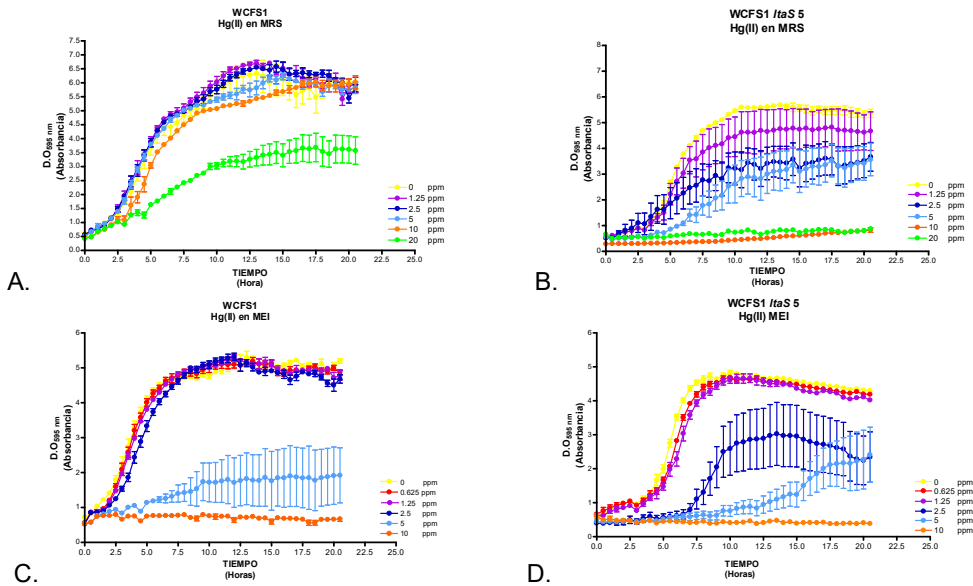


FIGURA 6. Curvas de crecimiento de las cepas WCFS1 y WCFS1 *ItaS* 5 en medio MRS (A y B) y MEI (C y D) a diferentes concentraciones de mercurio inorgánico [Hg (II)]. Los gráficos representan la media de cuatro curvas de crecimiento bacteriano para las diferentes concentraciones.

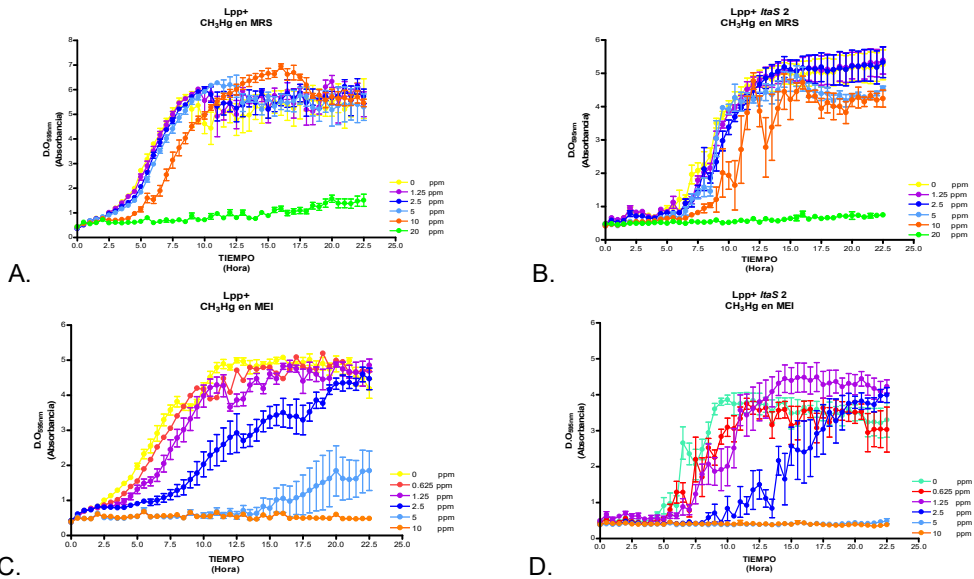


FIGURA 7. Curvas de crecimiento de las cepas Lpp+ y mutante Lpp+ *ItaS* 2 en medio MRS (A y B) y MEI (C y D) a diferentes concentraciones de mercurio inorgánico CH₃Hg. Los gráficos representan la media de cuatro curvas de crecimiento bacteriano para las diferentes concentraciones.

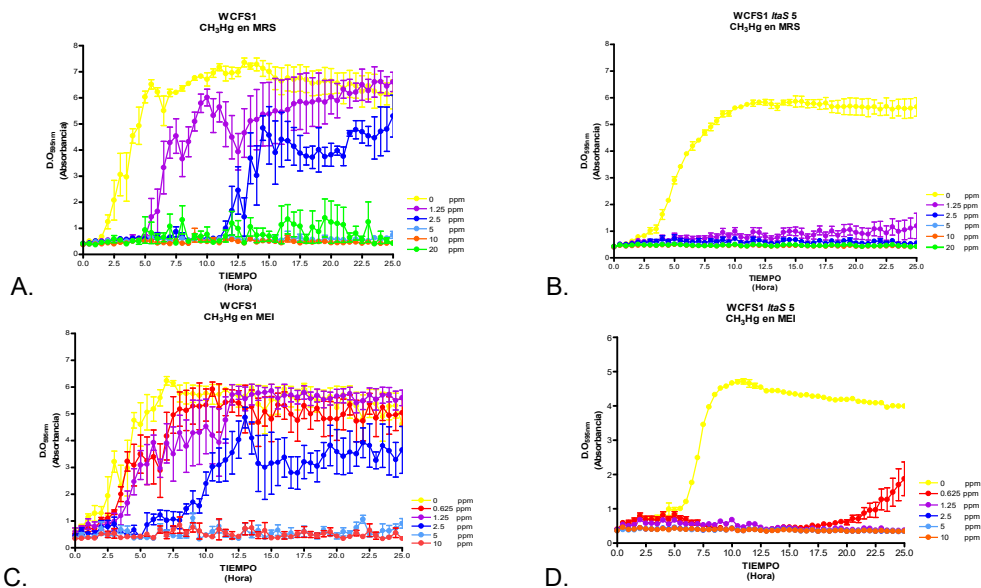


FIGURA 8. Curvas de crecimiento de las cepas WCSF1 y mutante WCSF1 *ItaS 5* en medio MRS (A y B) y MEI (C y D) a diferentes concentraciones de mercurio inorgánico CH₃Hg. Los gráficos representan la media de cuatro curvas de crecimiento bacteriano para las diferentes concentraciones.

3.4 Porcentaje de retención de Hg(II) y CH₃Hg por quelación con EDTA.

En la Figura 9, se muestran los valores de captación de Hg(II) y CH₃Hg tras la incubación de un patrón de mercurio con las diferentes cepas silvestres (WCSF1 y *Lpp+*) y sus mutantes deficientes en LTA (*ItaS 5* y *ItaS 2*). Todas las cepas captaron el mercurio de la solución, aunque con diferencias entre ellas. Destacaron las cepas silvestres WCSF1 y *Lpp+* en el tratamiento con Hg(II) en comparación a sus mutantes WCSF1 *ItaS 5* y *Lpp+* *ItaS 2*. Así los mutantes *ItaS* de estas cepas mostraron una capacidad de unión de Hg(II) de un 30 a un 40% inferior comparado con las cepas silvestres. Por el contrario, no hubo diferencias en la capacidad de unión para el mercurio orgánico (CH₃Hg).

Para determinar la fuerza de la interacción mercurio-bacteria y si existían diferencias entre las cepas silvestres y sus mutantes. Células que habían retenido mercurio fueron sometidas a lavados extensos con concentración alta (10mM) de un quelante de cationes (EDTA) y se determinó el mercurio que permanecía unido a la bacteria tras el tratamiento. Las cepas en general no mostraron ser afectadas significativamente por los lavados con EDTA, presentando diferencias mínimas y no significativas con las condiciones de lavado solo con PBS. En general podemos afirmar que la unión de mercurio en las cepas de *L. plantarum*, no es significativamente afectada por tratamiento con quelantes como el EDTA. Esto implica que la interacción del mercurio con la superficie es muy fuerte tanto en las cepas silvestres como en los mutantes carentes de LTA. Por otro lado, se ha demostrado que las cepas afectadas en la superficie de su estructura celular (sin LTA) disminuyen su

capacidad de retención de mercurio inorgánico Hg(II), pero manifiestan una similar captación y retención de mercurio orgánico CH₃Hg.

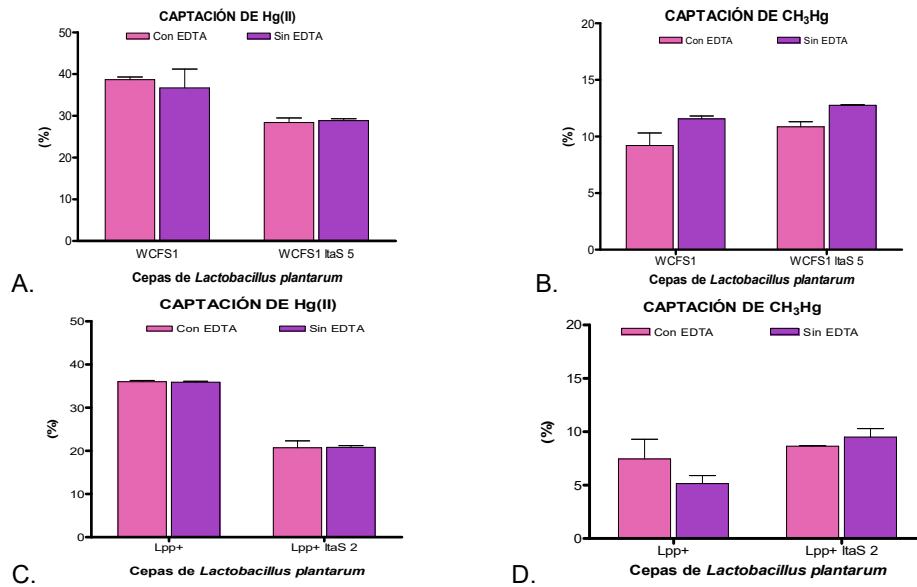


FIGURA 9. Porcentaje de captación de mercurio (A y C) inorgánico Hg(II) y (B y D) orgánico CH₃Hg con tratamiento de quelación con EDTA, comparando las cepas de *L. plantarum* silvestre (WCFS 1 y Lpp+) y sus mutantes (*ItaS 5* y *ItaS 2*). Se realizó un análisis estadístico t-student, comparando cepas WCFS1 - *ItaS 5* y Lpp+ - *ItaS 2*, para predecir diferencias significativas entre ellas con respecto a la carencia de LTA.

3.5 Porcentaje de captación de Hg(II) y CH₃Hg por bacterias viables y no viables.

Para determinar si la viabilidad de las bacterias influía en la captación de Hg (II) y CH₃Hg se llevaron a cabo ensayos de captación con células viables y no viables (muertas por tratamiento térmico). En la Figura 10, se puede observar un aumento de la captación de Hg(II) y CH₃Hg por parte de cepa WCFS1, cuando se ha sometido a un tratamiento de 80°C durante 15 min, que produce una pérdida en su viabilidad (UFC/ml) de al menos 6 órdenes de magnitud, determinado por recuento de viables en placa. Los resultados permiten sugerir que la captación de Hg(II) y CH₃Hg no es un proceso que requiera células vivas. La interacción con el mercurio se da en superficie y probablemente no requiere de transportadores bacterianos que internalicen el Hg(II) o CH₃Hg, por los que no se precisan bacterias metabólicamente activas. El hecho de que las células muertas por calor incrementen el porcentaje de captación lleva a pensar que en estas células el tratamiento térmico produce ciertas desestructuraciones que posiblemente aumentan la exposición de los sitios superficiales de unión al mercurio. Cabe destacar que estos experimentos pusieron de nuevo en manifiesto la menor capacidad del mutante *ItaS* de *L. plantarum* WCFS1 de captar Hg(II) en comparación con la cepa silvestre. Sin embargo, esto no sucedió con la captación en la cepa deficiente en LTA solo se detectó en las bacterias tratadas térmicamente.

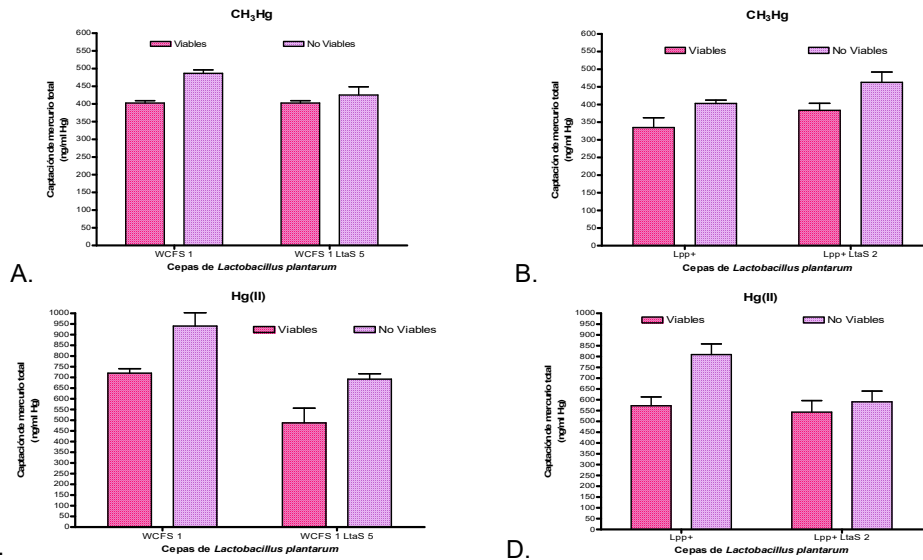


FIGURA 10. Captación de mercurio (A y C) inorgánico Hg(II) y (B y D) orgánico CH₃Hg por la cepa de *L. plantarum* silvestres (WCFS 1 y Lpp+) y sus mutantes (*ltaS 5* y *ltaS 2*) y realizar una comparación de la influencia de la viabilidad de las células.

IV. DISCUSIÓN

Diferentes investigaciones han demostrado la capacidad de captación de metales pesados (e.g. Cd) por las BL en disoluciones acuosas (Zhogi et al., 2014) y que su captación es principalmente superficial (González M., (2017)). En el presente estudio, se ha evaluado la capacidad de captación de Hg por cepas de *L. plantarum* silvestres y mutantes deficientes en LTA, con el objeto de identificar el LTA como el responsable de la unión de Hg. Se ha realizado el ensayo de unión al citocromo c, para evaluar la cantidad de carga negativa de la pared celular de las cepas estudiadas y determinar las diferencias entre las cepas silvestres y mutantes en LTA, mediante el uso de citocromo c como indicador y cuantificar esta capacidad, ya que esta molécula al estar cargadas positivamente y como se ha citado anteriormente la pared celular de los *Lactobacillus* están cargadas negativamente, mediante su capacidad de retención tendríamos una idea de la contribución del LTA a la carga negativa total de la superficie. Los resultados fueron inesperados, ya que cabría haber detectado que los mutantes *ltaS* uniesen menos citocromo c (menor carga negativa neta). Este resultado indica que: (i) existe un cambio drástico en las propiedades de superficie debido a la falta de LTA en *L. plantarum*; (ii) la capacidad de unir citocromo c no reside únicamente en la densidad de carga negativa de la superficie. Posiblemente existe interacción de esta molécula con otros elementos estructurales de la pared que se ven influenciados por la falta de LTA.

La toxicidad del Hg en medio sólido y medio líquido, mostraron una relación de semejanza ya que el comportamiento de inhibición de las cepas mutantes frente a sus parentales fue mayor en ambos medios, donde observamos que las curvas de crecimiento de las cepas mutantes se muestran en algunos

casos drásticamente afectadas a concentraciones en las que sus cepas silvestres aun crecen. Este efecto es el mismo mostrado por cepas mutantes de *L. casei* deficientes en la D-alanilación de LTA, que poseen mayor densidad de carga negativa en superficie, por Alcántara et al. (2017).

Al igual que en *L. casei* (Alcántara et al. (2017)), la unión mercurio Hg(II) y CH₃Hg por cepas de *L. plantarum*; silvestres y mutantes sin LTA, no se vio afectada por el tratamiento con quelantes sugiriéndose que la unión bacteria-metal es muy fuerte. De igual manera el tratamiento térmico aumentó la capacidad de captar mercurio tal y como se ha descrito en *L. casei*. Así, la posible desnaturalización (proteínas, polisacáridos) expone más sitios de unión de mercurio, que probablemente es retenido principalmente a nivel de superficie, sin mediar internalización. Estudios previos han evidenciado que el mecanismo de captación de metales/metaloideos como el Cd o el As por parte de las BAL es principalmente adsorción superficial. De hecho, un estudio en el que se modificaron químicamente los grupos carboxilo y fosforilo de la superficie de las bacterias utilizadas para captar Cd, muestra que, al modificar dichos grupos, la célula pierde la capacidad de captación de Cd (Zhogi et al., 2014).

Se ha demostrado una menor captación de Hg en los mutantes *ltaS*, dependiendo de la cepa y el tipo de Hg (inorgánico u orgánico). Puesto que tanto las cepas mutantes de *L. casei* (Alcántara et al. 2017) que unen más Hg, como las de *L. plantarum* que unen menos tienen más sensibilidad al mercurio, no parece existir relación entre capacidad de unión y toxicidad del Hg. Nuestros resultados prueban que en *L. plantarum* el LTA no juega un papel esencial en el proceso, por lo que todavía es necesaria una mejor caracterización de la interacción *Lactobacillus*/Hg.

V. CONCLUSIONES

A partir del análisis y discusiones de los resultados obtenidos en este estudio, se exponen las siguientes conclusiones:

1. El déficit de LTA en la pared celular de *L. plantarum* produce un efecto drástico en las cualidades de su superficie, tal y como evidencian los experimentos de unión de citocromo c.
2. El déficit de LTA en *L. plantarum* resulta en una mayor toxicidad para el mercurio, tanto en medio líquido como sólido. Esta toxicidad es mayor para el CH₃Hg y presenta diferencias según la cepa.
3. Las células de *L. plantarum* poseen capacidad de unir mercurio en sus formas inorgánica y orgánica, destacando en ello la cepa WCFS1 sobre la Lpp+.
4. La falta de LTA sólo produce una disminución parcial (8-24%) de la capacidad de unir Hg(II), con poco efecto sobre el CH₃Hg. Se deduce pues que existen otras componentes de superficie con capacidad de interaccionar con el mercurio, evidenciándose una limitada participación del LTA en el proceso y una falta de relación entre la unión de mercurio y su nivel de toxicidad.

5. La unión de mercurio en *L. plantarum* es muy estable y no se ve afectada por el tratamiento con quelantes.

6. La capacidad de unir mercurio no se ve afectada de manera negativa por la muerte celular por calor, lo que sugiere que la captación de mercurio no es un proceso de transporte activo.

7. Las bacterias muertas por calor muestran una mayor capacidad de unir mercurio que es influenciada por la presencia/ausencia de LTA. Esta capacidad incrementada sugiere que la desnaturalización por calor produce una mayor exposición de los sitios de interacción con el mercurio.

8. Se hacen necesario más estudios con la finalidad de valorar la capacidad de captación de mercurio de estas cepas en matrices alimentarias contaminadas y en simulaciones de digestión gastrointestinal. Este paso es requisito antes de comprobar su efectividad en modelos *in vivo* animales expuestos a este contaminante, para de esta manera tener datos confiables y mejorar la selección de cepas con fines de poder contribuir a mejorar la salud de poblaciones expuestas a este metal tóxico.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alcántara, C., et al. 2017. Characterization of the binding capacity of mercurial species in Lactobacillus strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(15), 5107-5113.
- Beltrán, M. et al. (2016). Biorremediación de Metales Pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg), Mecanismos Bioquímicos e Ingeniería Genética: Una Revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 172-197.
- Bhakta, J. et al. 2012. Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. *Journal of applied microbiology*, 112(6), 1193-1206.
- Cano, S. E. (2012). Contaminación con mercurio por la actividad minera. *Biomédica*, 32(3), 309-11. Bogotá, D.C., Colombia.
- Burgain, J. et al. 2014. Lactic acid bacteria in dairy food: surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in colloid and interface science*, 213, 21-35.
- Cañizares-Villanueva, R. O. 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. México D.F. *REVISTA LATINOAMERICANA DE MICROBIOLOGÍA* 42(3), 131-143.
- Comisión del Codex Alimentarius. 2017. 11ª reunión. Rio de Janeiro, Brasil. Documento de Debate sobre Niveles Máximos de Metilmercurio en el Pescado.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2012. Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA J.* 10, 2985.
- EFSA Scientific Committee. (2012). Scientific Opinion on Exploring options for providing advice about possible human health risks based on the concept of Threshold of Toxicological Concern (TTC). *EFSA journal*, 10(7), 2750.
- Gerbino, E. et al. 2011. FTIR spectroscopy structural analysis of the interaction between Lactobacillus kefir S-layers and metal ions. *Journal of Molecular Structure*, 987(1-3), 186-192.
- Gerbino, E. et al. 2012. Use of Raman spectroscopy and chemometrics for the quantification of metal ions attached to Lactobacillus kefir. *Journal of applied microbiology*, 112(2), 363-371.
- González M., (2017) Bacterias lácticas en la reducción de la bioaccesibilidad de cadmio en alimentos. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Valencia.
- Gutiérrez G. y Cardoso P. 2006. Ácido Lipoteicoico: Receptores y Mecanismo de Transducción. *REB* 25(2): 41-49. Universidad Nacional Autónoma de México D.F.
- Hajeb, P. and Jinap, S. 2009. Effects of washing pre-treatment on mercury concentration in fish tissue. *Food Additives and Contaminants*, 26(10), 1354-1361.

- Halttunen, T. (2008, January). Removal of cadmium, lead and arsenic from water by lactic acid bacteria. Functional Foods Forum; Department of Biochemistry and Food Chemistry. ISBN 978-951-29-3458-4.
- Jadan Piedra, C. A. (2017). *Estrategias dietéticas para disminuir la biodisponibilidad de mercurio desde alimentos*. (Doctoral dissertation).
- Bhakta, J. N. et al. 2010. Isolation and probiotic characterization of arsenic-resistant lactic acid bacteria for uptaking arsenic. *International Journal of Chemical and Biological Engineering*, 3(4), 167-174.
- Kumar N. et al. (2017). Efficacy of indigenous probiotic Lactobacillus strains to reduce cadmium bioaccessibility – An in vitro digestion mode. *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (1241-1250).
- Liu, Z. et al. 2017. Characterization and bioactivities of the exopolysaccharide from a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* WLPL04. *Journal of dairy science*, 100(9), 6895-6905.
- Merroun, M. L. 2007. Interactions between metals and bacteria: Fundamental and applied research. *nature*, 4, 5.
- Mejía Sandoval, G. 2006. Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 1(1). Colombia.
- Mendoza, J. et al. 2010. Biosorción de Cromo, Arsénico y Plomo de soluciones acuosas por cultivos bacterianos en suspensión. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 1(2): 67-73. México.
- Mobili, P. et al. 2010. S-layers in lactobacilli: structural characteristics and putative role in surface and probiotic properties of whole bacteria. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 22, 1224-1234.
- Monachese, M. et al. 2012. Bioremediation and human tolerance to heavy metals through microbial processes: a potential role for probiotics? *Applied and environmental microbiology*, AEM-01665. 78(18), 6397-6404.
- Moreno-Brush, M. et al. 2016. Is mercury from small-scale gold mining prevalent in the southeastern Peruvian Amazon? *Environmental pollution*, 218, 150-159.
- Mrvčić, J. et al. 2012. Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: opportunities for improving food safety and quality. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(9), 2771-2782.
- Pacheco, G. et al. 2013. Oxidación del arsénico regulada por un sistema bacteriano de dos componentes. *Revista Bio Ciencia*. 2(3) 92-97. ISSN 2007-3380.
- Panel, E. C. (2012). Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA Journal* 2012; 10 (12): 2985, 241 pp.
- Polak-Berecka, M. et al. 2017. Studies on the removal of Cd ions by gastrointestinal lactobacilli. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(8), 3415-3425.
- Poulin, J. et al. 2013. Mercurio: Evaluación de la carga de morbilidad ambiental a nivel nacional y local. OMS Ginebra, 2008.
- Rodríguez Salazar, N. 21 mayo, 2018, "Bacterias Gram Positivas, características de la pared celular" (en línea), Información sobre animales, mascotas, naturaleza y turismo, <https://www.paradais-sphynx.com/ciencias-naturales/bacterias-grampositivas-pared-celular.htm>, ISSN 2529-895X.
- Saar R. et al. 2012. D-Alanylation of Lipoteichoic Acids Confers Resistance to Cationic Peptides in Group B Streptococcus by Increasing the cell wall Density. *PLoS Pathog* 8(9): e1002891. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002891.
- Sinha, V. et al. 2011. Amplification of arsH gene in *Lactobacillus acidophilus* resistant to arsenite. *Biotechnology*, 10(1), 101-107.
- Suárez, P. y Reyes, R. 2002. La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia*, 27(4). Venezuela.
- Vullo, D. L. 2003. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*, 2(3). ISSN 1666-7948. www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar
- Weidenmaier, C. et al. 2004. Role of teichoic acids in Staphylococcus aureus nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nature medicine*, 10(3), 243.
- Zhogi A, Khosravi-Darani, K., & Sohrabvandi, S. 2014. Surface Bindings of Toxins and Heavy Metal by Probiotics. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, 14(1), (84-98).