



TRABAJO FIN DE GRADO

**GRADO EN
BIOTECNOLOGÍA**

Capacidad de captación y resistencia a metales pesados de cepas seleccionadas de bacterias lácticas

Autora: María Forteza Guillot

Directores: Manuel Zúñiga Cabrera y Vicente Monedero García

Tutora UCV: Belén Frigols Garrido

2019-2020



iata

Instituto de Agroquímica
y Tecnología de Alimentos



Facultad de Veterinaria
y Ciencias Experimentales
Universidad Católica de Valencia
San Vicente Mártir

Índice

Resumen	0
1. Introducción	1
Bacterias	2
Bacterias lácticas	3
El problema del As y Hg en los alimentos	4
Mercurio:	5
Arsénico:	6
Sobre el uso de microorganismos como estrategia para reducir la presencia de metales	8
2. Objetivos	11
3. Materiales y métodos	12
Cepas de bacterias y condiciones de crecimiento	12
Ensayos de crecimiento y resistencia a Hg(II), MeHg, As(III) y As(V)	12
Ensayo de unión de Hg(II)	13
Determinación de la cantidad de Hg(II)	13
4. Resultados	15
Ensayos de resistencia	15
Ensayos de unión	24
5. Discusión	26
6. Conclusiones	32
7. Líneas futuras	33
8. Bibliografía	35

I. Índice de Figuras

Figura 1. Estructura de la pared celular de una bacteria láctica y los procesos de interacción con contaminantes químicos SLP (<i>Surface-layer proteins</i>); PG (peptidoglicano). Las flechas discontinuas señalan los ácidos teicoicos (TA) y lipoteicoicos (LTA). Estos últimos se hayan unidos covalentemente a los lípidos de la membrana celular. (Elaboración propia)	9
Figura 2. Crecimiento de diferentes cepas BAL con distintas concentraciones de Hg(II) que van desde de 0-10 ppm	16
Figura 3. Crecimiento de diferentes cepas BAL con distintas concentraciones de MeHg que van desde de 0-5 ppm	18
Figura 4. Crecimiento de diferentes cepas BAL con distintas concentraciones de As(III) que van desde de 0-100 ppm	20
Figura 5. Crecimiento de diferentes cepas BAL con distintas concentraciones de As(V) que van desde de 0-100 ppm	22
Figura 6. Capacidad de captación de mercurio (Hg) de las cepas BAL a DO1,25 (a) y DO5 (b)	25

II. Índice de Tablas

Tabla 1. Cepas usadas en el presente estudio	12
Tabla 2. Condiciones instrumentales	14
Tabla 3. Densidad óptima máxima y tasa de crecimiento de las cepas BAL en función de la concentración de Hg(II)	23
Tabla 4. Densidad óptima máxima y tasa de crecimiento de las cepas BAL en función de la concentración de MeHg	23
Tabla 5. Densidad óptima máxima y tasa de crecimiento de las cepas BAL en función de la concentración de As(III)	23
Tabla 6. Densidad óptima máxima y tasa de crecimiento de las cepas BAL en función de la concentración de As(V)	24

Resumen: Podemos encontrar metales pesados en diversas formas en el medio ambiente, llegando estos a ser dañinos al estar en ciertas concentraciones y convirtiéndose en tóxicos para los seres vivos. Estos metales pesados los podemos encontrar acumulados en determinadas zonas del mundo, produciendo mayores daños sobre ciertas poblaciones, aunque su presencia y la exposición a ellos es global. Pueden ocasionar distintos tipos de afecciones sobre el ser humano llegando incluso a causar enfermedades crónicas o graves como puede ser el cáncer. En este estudio se ha trabajado con cepas bacterianas provenientes de muestras fecales y de la leche de mujeres altamente expuestas a mercurio que no presentaban síntomas de intoxicación. Se han realizado ensayos de resistencia a metil mercurio (CH_3Hg), mercurio (Hg(II)), arsenito (As(III)) y arsenato (As(V)) para comprobar la capacidad de crecimiento, y ensayos de unión para determinar la capacidad de captación de Hg(II) que poseen estas cepas. Se ha comprobado que los metales tienen efectos tóxicos sobre las bacterias, siendo el MeHg más tóxico que el Hg , y el As(V) más tóxico que el As(III) . Además, estas cepas presentan una gran capacidad de captación de Hg(II) . Dada esta capacidad, se considera que estas cepas tienen potencial para posteriores estudios sobre su uso como probióticos que puedan mejorar la salud de la población expuesta.

Palabras clave: Metales pesados, bacterias ácido lácticas, mercurio, metil mercurio, arsénico inorgánico, adsorción.

Inglés: Heavy metals can be found in several forms in the environment, and some of them become harmful once certain concentrations have been met and subsequently become toxic for all forms of life. These heavy metals are present at high concentration in water and food in certain regions of the world, representing higher risks for specific populations groups, even though they are present all over the world and the whole population is exposed to them. These heavy metals can cause a myriad of different side effects to human, ranging from chronic diseases to cancer. This work reports research on commensal bacterial strains isolated from the feces and from the milk of women highly exposed to mercury but they did not display symptoms of poisoning. Tests have been conducted on the resistance to methylmercury, inorganic mercury, arsenite and arsenate to determine their growth capacity in the presence of these toxics. In addition, the biosorption capacity of the bacterial strains of these metals has been assessed. It has been proven that these metals have toxic effects on the bacteria, with MeHg being more toxic than Hg, and As(V) being more toxic than As(III). Furthermore, these strains present a great binding capacity to Hg(II). Due to this capacity, it is considered that these strains have potential for further studies involving their probiotic capacity to diminish heavy metals bioaccessibility/bioavailability that can improve the health of populations exposed to these toxic metals.

Keywords: Heavy metals, lactic acid bacteria, inorganic mercury, methylmercury, arsenite, arsenate, biosorption.

1. Introducción

Metal pesado es un término con una definición controvertida sobre el que no hay acuerdo en la comunidad científica e incluso se ha propuesto no utilizarlo (Pourret, 2018; Duffus, 2002). En este trabajo se utiliza el término metal pesado refiriéndose a metales y metaloides, como el As, asociados con contaminación ambiental y/o efectos tóxicos sobre los organismos. Se define la toxicidad como “la capacidad intrínseca que posee un agente químico de producir efectos adversos sobre un órgano” (Stellman, 2012, p. 33.5) y se categorizan los niveles de toxicidad en función de los niveles de exposición. Así pues, se puede realizar una distinción entre efectos agudos o crónicos, donde se establece una exposición de corta duración o una de larga duración respectivamente. Los efectos agudos pueden ser reversibles o irreversibles, mientras que los crónicos permanecen incluso durante toda la vida aún después de que se haya suspendido la exposición. El órgano diana es el órgano que resulta más afectado tras la exposición a la sustancia (Stellman, 2012). Un ejemplo de toxicidad de forma aguda la podemos ver en síntomas como náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea severa debido a una exposición a arsénico. En este caso, si hablamos de una exposición prolongada a arsénico inorgánico aumenta de forma significativa el riesgo de padecer cáncer (Nurchi et al., 2020).

Los metales pesados son elementos presentes en la corteza terrestre. Pueden tener efectos tóxicos cuando los encontramos en ciertas formas o cantidades, y debido a su amplia distribución, la exposición a menudo es inevitable. Debido a que algunos de estos elementos se acumulan en los organismos o a que la exposición ocurre de forma crónica, los efectos de estos en los humanos y animales se ven a lo largo del tiempo y pueden llegar a ser graves (Bisanz et al., 2014).

Entre los metales pesados destacan por su incidencia el mercurio (Hg), el plomo (Pb), el cadmio (Cd), el cromo (Cr) y el arsénico (As; un metaloide). En determinadas ocasiones estos metales actúan limitando la acción de un elemento esencial en el cuerpo y esto supone la aparición de enfermedades. Las actividades humanas como la minería, la industria o el transporte elevan los niveles de metales en el medio ambiente, por lo que, también pueden estar presentes como residuos en los alimentos, ya que el metal llega a la cadena alimentaria, y su acumulación en el cuerpo puede llegar a provocar efectos nocivos con el tiempo (Alcántara et al., 2017). Por ejemplo, una de las principales fuentes de proteína en la dieta proviene del pescado, aunque no es tan popular en la dieta occidental, y este alimento es uno de los que presenta mayores niveles de metales. Aunque la exposición a metales es un problema universal, debido a las regulaciones laxas y a la explotación por actividades antropogénicas, muchas

toxinas ambientales afectan de manera desproporcionada al mundo en desarrollo. Los niños y las mujeres embarazadas son dos de las poblaciones más vulnerables en riesgo de exposición a tóxicos ambientales (Bisanz et.al., 2014).

A pesar de que hay ciertos medicamentos que son quelantes de los metales como el ácido dimercaptosuccínico (DMSA) y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), se requieren otras alternativas para paliar sus efectos. Esto es así ya que estos fármacos no están indicados para uso a largo plazo además de que no hay una normativa aprobada que indique estos productos como aptos para consumo como quelantes (Bisanz et al., 2014). En este aspecto, las bacterias lácticas han sido estudiadas por sus amplias posibilidades en aplicaciones para la salud. Son capaces de reducir la entrada de tóxicos y metales a la circulación sistémica después de la ingesta uniéndose a contaminantes alimentarios. Esta capacidad de las bacterias lácticas ha sido utilizada como estrategia para disminuir el riesgo asociado al consumo de bebida y comida contaminada de metales (Alcántara et al., 2017; Chiocchetti et al., 2018; Chiocchetti et al., 2019; Jadán-Piedra et al., 2017; Jadán-Piedra et al., 2019).

Bacterias

La taxonomía divide a los seres vivos en tres dominios: Archaea, Eukarya y Bacteria. Las bacterias son microorganismos unicelulares independientes que están muy extendidas por toda la Tierra. Se caracterizan por tener una pared celular de peptidoglicano además de no presentar un núcleo limitado u orgánulos intracelulares, lo que las diferencia del dominio eucariota. Podemos encontrar bacterias en todos los hábitats, incluidos los alimentos y el cuerpo humano.

Inicialmente, para realizar una clasificación de las bacterias en especies, y poder diferenciar unas de otras, se tuvo que prestar atención a las características metabólicas y no a los rasgos morfológicos ya que estos son escasos. Para ello, se determinaba la capacidad de transformar unos compuestos en otros como, por ejemplo, azúcares en ácidos orgánicos. Conforme se tuvo acceso a nuevas tecnologías se fue ampliando o modificando el tipo de caracteres empleados en la clasificación. Así, a los caracteres metabólicos, se añadió la determinación del contenido en G+C, hibridación de ADN, serotipado o comparación de patrones de proteínas. Finalmente, el desarrollo de la tecnología de secuenciación de ADN permitió basar la clasificación directamente en la secuencia de nucleótidos de genes conservados como el gen que codifica el ARN 16S en las bacterias. Esto permitió, mediante el análisis de las secuencias con modelos evolutivos, establecer con una precisión sin precedentes las relaciones filogenéticas entre los distintos taxones. En la actualidad se dispone de técnicas de secuenciación

masiva además de secuencias de genomas completos lo que supone una mejora en el análisis filogenético de estas (Aznar y Zúñiga, 2011).

Las bacterias son vitales en muchas etapas de los ciclos geoquímicos, por ejemplo, en los ciclos de los nutrientes en los que participan en la fijación del nitrógeno en la atmósfera. En la industria también presentan un papel importante ya que pueden participar tanto en tratamientos de aguas residuales, como en la fabricación de antibióticos, o en la producción de alimentos. Por la acción de microorganismos se pueden producir alimentos fermentados como el queso o el yogur. Se realiza mediante un proceso de biotransformación de las materias primas. En este aspecto, las bacterias lácticas son el grupo de bacterias más importante. Estos alimentos se encuentran entre las formas más antiguas de alimentación procesada que sigue estando en la dieta de hoy en día.

Bacterias lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se caracterizan por producir ácido láctico como producto principal de la fermentación de azúcares. Las BAL se clasifican dentro del orden *Lactobacillales*. Son bacilos o cocos Gram-positivos, catalasa-negativos, anaerobios facultativos, microaerófilos o aerotolerantes, generalmente desprovistos de citocromos, no esporulados, acidófilos o acidotolerantes, de metabolismo quimioorganotrofo y estrictamente fermentativo (Papadimitriou et al., 2016). Las BAL por lo general poseen un contenido bajo de GC en su ADN menor del <50%, mientras que se han reportado que algunos lactobacilos pueden alcanzar hasta el 57%. El orden *Lactobacillales* consta de seis familias con 38 géneros y más de 400 especies y a pesar de su diversidad genética, se ha demostrado que los géneros proceden de un antepasado común (Klein, Pack, Bonaparte & Reuter, 1998; Makarova et al., 2006; Stiles & Holzapfel, 1997).

Clásicamente las BAL se han dividido en función de los productos finales de su metabolismo de azúcares en homofermentativas estrictas, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas estrictas (Kandler, 1983), aunque actualmente esta característica carece de valor taxonómico. El producto final en la mayoría de los casos del metabolismo de las BAL es el ácido láctico en la vía homofermentativa. Mediante esta vía fermentan hexosas como glucosa, manosa, galactosa o fructosa, es decir, se convierte 1 mol de hexosa en 2 moles de ácido láctico. En cambio, con la vía heterofermentativa, además de producir ácido láctico forman etanol y CO₂, por lo que al menos el 50% de los productos finales por esta vía es el ácido láctico. Las BAL heterofermentativas facultativas utilizan la ruta homofermentativa para metabolizar las

hexosas, pero poseen una ruta heterofermentativa para la degradación de pentosas (Aznar y Zúñiga, 2011).

Las BAL poseen una capacidad biosintética limitada por lo que se encuentran en hábitats ricos en nutrientes, aunque las podemos encontrar en una amplia variedad de ambientes. Requieren de factores de crecimiento complejos como vitaminas y aminoácidos entre otros. Fueron las primeras bacterias estudiadas debido a su importante papel en las fermentaciones de alimentos y en la salud humana. Producen alimentos tales como el queso y el yogur. Además, con estas se obtienen compuestos importantes de aroma y sabor mediante sus actividades metabólicas (p. ej. Lipólisis y proteólisis) que contribuyen a la textura.

Algunas BAL forman parte de la microbiota de humanos y animales según secundan diversos estudios (Cho & Blaser, 2012; Hammes & Hertel, 2006). Participan en el equilibrio del ecosistema de diversas mucosas del huésped (p. ej. el intestino), lo cual puede ser determinante tanto para la salud como la enfermedad. Pueden impulsar ciertas actividades del sistema inmunitario llegando a prevenir el desequilibrio en la microbiota debido a un tratamiento con antibióticos o después de infecciones virales, produciendo vitaminas *in situ* o reduciendo los niveles de colesterol en la sangre (Papadimitriou et al., 2015). Por lo tanto, se pueden usar como bacterias probióticas y contribuir a la salud de un huésped. No obstante, las BAL deben adaptarse a las diferentes alteraciones que predominan en el huésped y el probiótico debe sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal (Papadimitriou et al., 2016).

El problema del As y Hg en los alimentos

Diversos estudios han mostrado que la exposición por la dieta a As o Hg provoca importantes problemas de salud (Alcántara et al., 2017; Taylor et al., 2016). Mientras que la principal ruta de exposición a ambos elementos es por la ingesta oral, muchos de los efectos que causan a nivel gastrointestinal son desconocidos. Estudios *in vitro* han demostrado una elevada respuesta pro-oxidante y pro-inflamatoria en exposiciones agudas a especies de As y Hg que afecta a la distribución de las proteínas de unión intercelulares y aumenta la permeabilidad en las células epiteliales intestinales (Calatayud, Devesa & Vélez, 2013; Calatayud, Gimeno-Alcañiz, Devesa & Vélez, 2015; Calatayud, Gimeno-Alcañiz, Vélez & Devesa, 2014; Vázquez, Vélez & Devesa, 2014). También se ha observado una respuesta proinflamatoria mantenida en exposiciones *in vitro* subcrónicas a As(III) y As(V), acompañadas de alteraciones estructurales y funcionales de las monocapas epiteliales de las células intestinales (Chiocchetti, Vélez,

& Devesa, 2019). Estos estudios *in vitro* indican que especies de As y Hg pueden ejercer un efecto tóxico en la mucosa intestinal.

Por lo tanto, se han evidenciado los efectos tóxicos de la exposición subcrónica a As y Hg en el intestino. Sin embargo, no hay estudios sobre la toxicidad intestinal en exposiciones crónicas, lo cual es la situación real de las poblaciones expuestas. Es por ello que el presente estudio es muy significativo, ya que se pretende demostrar la capacidad de absorción de metales pesados de una colección de cepas que hasta ahora no han sido estudiadas y que pueden ser relevantes para estas investigaciones y, por consiguiente, conseguir una mejora en la salud global. Además, varios estudios han relacionado una mayor permeabilidad intestinal con otras patologías como la diabetes de tipo I y II (Arrieta, Bistriz & Meddings, 2006). Así, los efectos tóxicos de Hg y As en la mucosa intestinal y sus interacciones con los efectos sistémicos deben abordarse en exposiciones crónicas para comprender completamente los mecanismos de toxicidad de estos elementos. La toxicidad intestinal causada por As y Hg también puede afectar a la microbiota intestinal. Algunos estudios han mostrado cambios notables en la composición de la microbiota intestinal y las capacidades funcionales después de la exposición a oligoelementos tóxicos (Breton et al., 2013; Richardson et al., 2018). Algunas patologías humanas van acompañadas de una disbiosis (cambio en la población normal de las bacterias) intestinal, pero establecer un vínculo entre la enfermedad y la disbiosis es una tarea difícil (Gagliardi et al., 2018; Ni, Wu, Albenberg & Tomov, 2017; Sommer, Anderson, Bharti, Raes & Rosenstiel, 2017).

Dos de los grupos poblacionales más vulnerables a la exposición de estas toxinas son las mujeres embarazadas y los niños. Un lugar donde mujeres y niños tienen una elevada exposición a metales tóxicos es Mwanza, Tanzania, debido a la proximidad al lago Victoria y que siguen una dieta rica en pescado. En un estudio realizado en esa región demostraron que las mujeres embarazadas y los niños tenían niveles en sangre de Pb y Hg elevados en comparación con canadienses de la misma edad y sexo. La diferencia entre niños y adultos se debe a que los adultos tienen una menor capacidad de absorción, ya que el intestino de los niños puede absorber hasta el 40% del metal (Bisanz et al., 2014). Puesto que es un problema de salud global en el siglo XXI y que, a menudo, es resultado de la ingesta de un determinado alimento, es importante realizar estudios sobre cómo reducir la exposición a estos tóxicos.

Mercurio:

Debido a actividades antropogénicas existe una contaminación ambiental de mercurio. La exposición humana a este elemento tóxico ocurre mayoritariamente por la

dieta, donde se encuentra principalmente como un catión divalente inorgánico [Hg(II)] o como metilmercurio (MeHg). Numerosos estudios se han centrado en la toxicidad del mercurio demostrando que un exceso de MeHg deriva en efectos neurotóxicos irreversibles y excesos de Hg(II) afecta principalmente al sistema renal (EFSA, 2012). Las principales fuentes de MeHg de la dieta son pescados, en concreto los pescados depredadores como el bonito, atún o pez espada (Sahuquillo, Lagarda, Silvestre & Farré, 2007; Storelli, Stuffer & Marcotrigiano, 2002), mientras que la principal fuente de la dieta de Hg(II) son algunos productos vegetales, los hongos y el agua contaminada debido a la actividad minera (Jadán-Piedra et al., 2017). En poblaciones que se encuentran cerca de áreas de minería como en algunas regiones de Asia, África o América latina, las situaciones de riesgo se dan por el consumo de agua contaminada y productos de pesca locales. En Europa se ha indicado que el consumo de MeHg está próximo al máximo recomendado y se identifica como un grupo de riesgo a los consumidores frecuentes de productos marinos (EFSA, 2012).

La EFSA (*European Food Safety Authority*) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) aconsejan limitar el consumo de ciertos pescados para así reducir la exposición a mercurio (EFSA, 2012). Bien es cierto que estos productos presentan un alto valor nutricional por lo que no es recomendable evitar su consumo de forma general. Para ello se están estudiando estrategias que reduzcan la entrada de mercurio en la circulación sistémica después de la ingesta (Jadán-Piedra et al., 2019).

Los grupos poblacionales que son más susceptibles de esta exposición son las mujeres embarazadas y los niños. Es por ello que existe un debate entre las organizaciones de la salud y la comunidad científica sobre el riesgo asociado con la ingesta de determinados pescados que poseen altos niveles de mercurio, ya que determinados estudios afirman que una exposición a mercurio debido al marisco en mujeres embarazadas está asociada con déficits neuropsicológicos en los niños (Grandjean, White, Weihe, & Jørgensen, 2003; Xue, Holzman, Rahbar, Trosko, & Fischer, 2007).

Arsénico:

El arsénico es un metaloide de la corteza terrestre muy distribuido en el medio ambiente (en el aire, el agua y la tierra) debido tanto a causas naturales como antropogénicas. Es altamente tóxico en su forma inorgánica (WHO, 2018). Los seres humanos están expuestos a niveles elevados de arsénico inorgánico (iAs) principalmente a través de beber agua contaminada, pero también por el riego de cultivos alimenticios, procesos industriales, comer alimentos contaminados y fumar

tabaco (WHO, 2018). Una exposición crónica al iAs se asocia con una alta prevalencia a cánceres de pulmón, vejiga, urinario, riñón, hígado y piel, además de enfermedades cardiovasculares y respiratorias, diabetes de tipo II y deficiencias en el desarrollo neuroconductual en población infantil. Mientras que una exposición aguda a iAs se manifiesta con náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea en sus inicios de exposición, como se ha mencionado anteriormente, además, puede producir una neuropatía periférica y encefalopatía (Nurchi et al., 2020). El iAs puede llegar a ocasionar una polineuropatía generalizada a través de una parestesia en las extremidades, la cual es un síntoma frecuente (Tseng et al., 2006). En cuanto a la piel, la exposición prolongada a iAs afecta en los pliegues de esta, lo que puede dar lugar a cambios en la pigmentación, hiperqueratosis, y con el tiempo, desarrollar un cáncer de piel (Nurchi et al., 2020). Se da un aumento revelador de riesgo de cáncer cuando el nivel en agua potable alcanza los 50 µg/L (National Research Council, 2001). Asimismo, se ha evidenciado en humanos una asociación entre la exposición a As y un deterioro de la función reproductiva en hombres (Tariba Lovaković, 2019).

La Organización Mundial de la Salud estima que 140 millones de personas en 50 países consumen agua contaminada con iAs, lo cual clasifica este hecho como una situación pública de emergencia, ya que el límite recomendado de arsénico es bajo (0.01 mg/L (WHO, 2012)). Los países principalmente afectados se encuentran en el sur de Asia y en América latina. El agua subterránea contaminada es la mayor amenaza para la salud pública del arsénico. En Europa, los principales factores que contribuyen a la exposición por la dieta al iAs son los productos a base de cereales, la leche y los productos lácteos (principal contribuyente en lactantes y niños pequeños) y el agua embotellada. También pueden considerarse grupos de riesgo de exposición a iAs los consumidores frecuentes de productos de arroz y algas (Chiocchetti et. al., 2019).

La exposición a arsénico por alimentos como el pescado, mariscos, carne, aves, productos lácteos o cereales es mucho menor en comparación con la exposición a través del agua subterránea contaminada (WHO, 2018). Si hablamos de marisco, el arsénico está principalmente en su forma orgánica, la cual es menos tóxica (WHO, 2018).

En cuanto al uso de arsénico en procesos industriales se puede ver que está muy extendido y lo podemos encontrar como agente de aleación, como parte del procesamiento de elaboración de vidrio, textiles y madera o incluso aditivos para productos farmacéuticos (WHO, 2018).

La planta del tabaco absorbe el arsénico presente en el suelo por lo que los fumadores de tabaco también pueden estar expuestos a arsénico inorgánico (WHO, 2018).

Sobre el uso de microorganismos como estrategia para reducir la presencia de metales

Disminuir de forma parcial o total estos metales pesados/metaloideos de los alimentos y del agua es una tarea ardua. Se han propuesto cambios a nivel de sistemas de producción, en el almacenamiento del material crudo y en los métodos de procesamiento. Pero para algunos contaminantes, como el mercurio en peces depredadores, el problema sigue sin solucionarse. Investigaciones recientes se han centrado en añadir componentes de origen natural a los alimentos y al agua potable para así reducir la solubilidad de los metales pesados en los alimentos una vez ingeridos (bioaccesibilidad) o incluso reducir la cantidad que entra a la circulación sistémica (biodisponibilidad) (Chiocchetti et al., 2018). Asimismo, se están ensayando estrategias para reducir la exposición oral a contaminantes químicos utilizando BAL, como cepas de géneros *Lactobacillus*, por la capacidad de captación de metales que poseen.

Los lactobacilos son microorganismos seguros y fáciles de cultivar a gran escala. Están presentes en numerosas investigaciones en las que se estudia su uso en sectores de medio ambiente, salud y seguridad alimentaria ya que una característica importante que presentan estas bacterias es la capacidad de adsorción y/o absorción de distintos tipos de contaminantes químicos. Con ello, se intenta mitigar la exposición a contaminantes químicos. Los mecanismos con los que interaccionan las bacterias con los metales presentes dependen de la cepa microbiana, la naturaleza del contaminante y las condiciones fisicoquímicas (Chiocchetti et al., 2018).

En el proceso de interacción del metal pesado con la BAL participa la superficie celular. La pared celular de estas bacterias está compuesta por una capa gruesa de peptidoglicano, ácidos teicoicos, proteínas y polisacáridos, los cuales contienen varios grupos cargados negativamente capaces de unir cationes (Chiocchetti et al., 2018) (Figura 1).

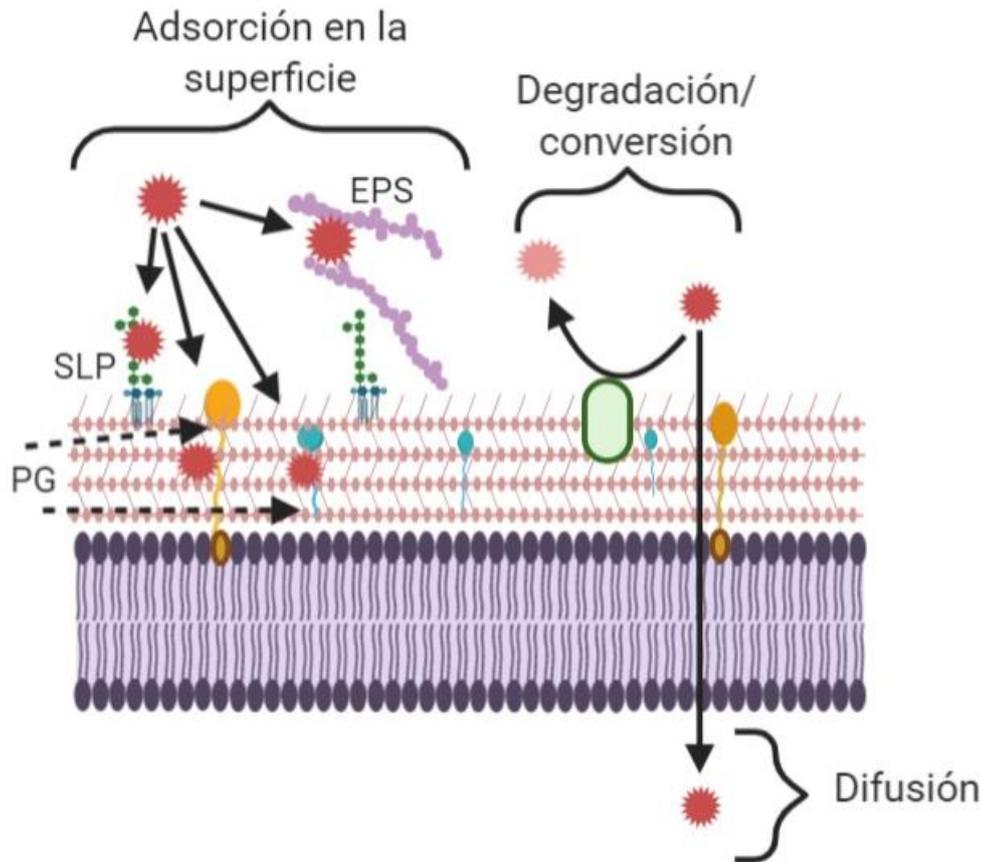


Figura 1.- Estructura de la pared celular de una bacteria láctica y los procesos de interacción con contaminantes químicos SLP (*Surface-layer proteins*); PG (peptidoglicano). Las flechas discontinuas señalan los ácidos teicoicos (TA) y lipoteicoicos (LTA). Estos últimos se hayan unidos covalentemente a los lípidos de la membrana celular. (Elaboración propia).

Halttunen et al. (2007) en estudios con Cd y Pb en bacterias lácticas, demostraron que se dan mayores acumulaciones del metal a valores de pH cercanos al neutro, por lo que el intercambio iónico podría ser en parte responsable de la unión del metal. Si hablamos de Hg en sus formas orgánica e inorgánica, la unión se produce principalmente en la pared celular de la bacteria láctica y de forma inmediata (Alcántara et al., 2017).

Cabe destacar que también se han incluido en los estudios levaduras del género *Saccharomyces* por su posible capacidad de captación de metales. Se ha demostrado que la levadura de panadería puede captar hasta el 70% de Hg(II) presente en solución acuosa (Infante et al., 2014), mientras que ésta presenta poca capacidad para retener As(V). La metilación de los grupos carboxilo en la superficie de la levadura favorece la adsorción del metal a concentraciones elevadas (Seki et al., 2005).

El proceso por el que *Saccharomyces cerevisiae* acumula metales se divide en dos: en la primera fase se da una acumulación rápida independiente del metabolismo

en la que está implicada la unión del catión del metal a la superficie celular. Seguidamente, se da una acumulación más lenta respecto de la anterior la cual es dependiente del metabolismo celular y en el que se produce la internalización del metal (Chiocchetti et al., 2018).

Ya que ha quedado establecido que los problemas de salud que surgen debido a la presencia de estos metales están muy presentes y generalizados y por todo lo mencionado anteriormente, es interesante realizar un estudio en este campo con alternativas. En el presente trabajo estas alternativas están representadas por cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de fuentes novedosas. Al provenir estas cepas de mujeres expuestas a niveles elevados de metales pesados, pueden revelarnos resultados sugestivos para una aportación a la salud mundial.

2. Objetivos

Dadas las repercusiones sanitarias y económicas de la contaminación de alimentos por metales pesados y las dificultades para reducir su presencia en los mismos, es de gran interés disponer de estrategias dietéticas que disminuyan el daño asociado a la exposición a metales pesados. Dentro de esta línea de estudio, en el presente proyecto se han planteado los siguientes objetivos:

- 1) Determinar la resistencia a mercurio inorgánico, metil mercurio, arsenito y arsenato de la colección de cepas de bacterias ácido lácticas.
- 2) Estudiar la capacidad de captación de mercurio inorgánico, metil mercurio, arsenito y arsenato de la colección de cepas de bacterias ácido lácticas.

3. Materiales y métodos

Cepas de bacterias y condiciones de crecimiento

Las cepas de bacterias utilizadas en el presente estudio se presentan en la tabla

1.

Tabla 1. Cepas usadas en el presente estudio		
Designación	Cepa	Origen/Referencia
LF18	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Colección de laboratorio
LF20	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Colección de laboratorio
LF42	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Colección de laboratorio
LP25	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Colección de laboratorio
LP27	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Colección de laboratorio
LP29	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Colección de laboratorio
ZH26-12	<i>Lactobacillus salivarius</i>	Colección de laboratorio
ZL17-16	<i>Lactobacillus salivarius</i>	Colección de laboratorio
TM	<i>Lactobacillus salivarius</i>	Colección de laboratorio
LS35	<i>Lactobacillus salivarius</i>	Colección de laboratorio
LS38	<i>Lactobacillus salivarius</i>	Colección de laboratorio
LS40	<i>Lactobacillus salivarius</i>	Colección de laboratorio

Estas cepas fueron generosamente proporcionadas por el Dr. Juan Miguel Rodríguez Gómez (Dpto. Nutrición y Ciencias de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, U. Complutense de Madrid). Las cepas fueron obtenidas a partir de un estudio en el que se analizó la microbiota de muestras de leche humana y de heces de mujeres de poblaciones africanas expuestas a una gran contaminación por metales pesados y una gran exposición a través de la dieta, pero cuya leche tenía concentraciones normales de metil mercurio, arsénico y cadmio, entre otros metales tóxicos (resultados no publicados).

Las bacterias se cultivaron en medio de cultivo Man-Rogosa-Sharpe (MRS; BD™, Difco™) a 37°C durante 24h en condiciones estáticas. Las placas de agar se prepararon añadiendo 18g/L de agar bacteriológico europeo (Condalab) al medio MRS. Los medios se esterilizaron en autoclave a 1 atm (121°C), 20 minutos. Para la conservación de las cepas, se añadió glicerol estéril a una concentración final del 15% a cultivos de 24 horas y se mantuvieron a una temperatura de -80°C. El glicerol actúa como crioprotector y ayuda a la conservación del material biológico.

Ensayos de crecimiento y resistencia a Hg(II), MeHg, As(III) y As(V)

Para cada cepa se cultivó un inóculo con 5ml de MRS durante toda la noche (*overnight*, O/N) a 37°C. Cada suspensión celular fue ajustada a una concentración de densidad óptica (DO) de 0,1. Las suspensiones bacterianas se dividieron en alícuotas a

los que se añadieron diferentes cantidades de Hg(II), CH₃Hg, As(III) o As(V) y se repartieron en volúmenes de 100 µL en placas de microtitulación de 96 pocillos.

Se determinó el crecimiento de estas cepas midiendo la DO a una longitud de onda de 595nm cada 30 minutos en un lector de placas Spectrostar Nano (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania) con condiciones de 37°C y agitación previa a cada lectura. Las tasas de crecimiento se calcularon mediante ajuste lineal del logaritmo en base 10 de la DO frente al tiempo, tomando el tramo de la curva en el que se obtenía la máxima pendiente.

Ensayo de unión de Hg(II)

Se cultivaron las cepas en alícuotas de 10 ml de MRS estéril O/N a 37°C. Se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 4°C a 4000 xg. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se lavó con 10ml de PBS (*Phosphate-buffered saline*) dos veces, centrifugando en las mismas condiciones previas. Finalmente, las células se resuspendieron en 1ml de PBS.

Se determinó la DO 595nm de las suspensiones y a partir de éstas, se prepararon suspensiones de 1 ml de células en PBS ajustadas a una DO 595nm de 5 y de 1,25. A estas suspensiones se añadieron 10 µl de Hg(II) a 100ppm. Los ensayos se realizaron por triplicado. Como controles, se prepararon tubos que contenían la cepa sin el metal, y otros que contenían el metal sin bacterias (blanco). Una vez añadido el metal, se incubaron en estufa a 37°C durante 1 hora. Las muestras control también se incubaron en la estufa en las mismas condiciones. Después de la incubación las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 12000 xg, se retiró el sobrenadante y las células se lavaron dos veces con PBS. Finalmente, las células se resuspendieron en 100 µl de ácido nítrico concentrado (HNO₃) (14 M) para la determinación del contenido de Hg(II).

Determinación de la cantidad de Hg(II)

Para analizar la capacidad de unión del mercurio a las bacterias se realizó una digestión ácida en horno de microondas de las muestras y posterior cuantificación del Hg mediante espectrometría de fluorescencia atómica con generación de vapor frío (CV-AFS). Para realizar la digestión, las bacterias y las fracciones de lavado se introdujeron en un reactor de teflón al que se añadieron 4 ml de HNO₃ 14 M (Merck) y 1 ml de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Panreac). Los reactores se irradiaron en un horno de microondas (modelo MARS, CEM, Vertex) a 800 W de potencia durante 15 min (180°C).

Tras la digestión, los digeridos se colocaron en tubos de 15 ml y se dejaron reposar durante toda la noche con el fin de eliminar los vapores nitrosos que pudieran interferir en la lectura. Posteriormente se llevaron a un volumen final (8-15 ml) con HCl 0.6 M.

La cuantificación de Hg mediante CV-AFS (PSA 10.025 Millenium Merlin, PS Analytical, Reino Unido) se realizó en las condiciones instrumentales que se indican en la tabla adjunta.

Tabla 2. Condiciones instrumentales	
Disolución reductora	SnCl ₂ 2% (m/v) en HCl al 15% (v/v). Flujo 4.5 mL/min
Blanco de reactivos	HCl al 5% (v/v). Flujo 9 mL/min
Gas transportador	Argón. Flujo 0.1 L/min
Gas de secado	Argón. Flujo 0.3 L/min
Tiempo de demora	15 s
Tiempo de medida	40 s
Tiempo de retorno	60 s
Rango de amplificación	100
Filtro	32

4. Resultados

Ensayos de resistencia

Uno de los objetivos de este estudio es determinar la capacidad de resistencia a mercurio inorgánico, metil mercurio, arsenito y arsenato de la colección de cepas de bacterias lácticas indicadas en la Tabla 1. Para ello se determinó su crecimiento en presencia de distintas concentraciones de metales. Debido a las particularidades del desarrollo del trabajo experimental durante este periodo, no se pudo realizar estos ensayos por triplicado por lo que estos resultados necesitan confirmación. A continuación, se presentan las curvas de las 6 cepas de las cuales se llegó a realizar las lecturas con los 4 tóxicos propuestos (Figuras 2-5).

El análisis de las curvas de crecimiento muestra que los cuatro compuestos ensayados presentaron efectos tóxicos sobre las bacterias si bien estos variaron en función de la cepa.

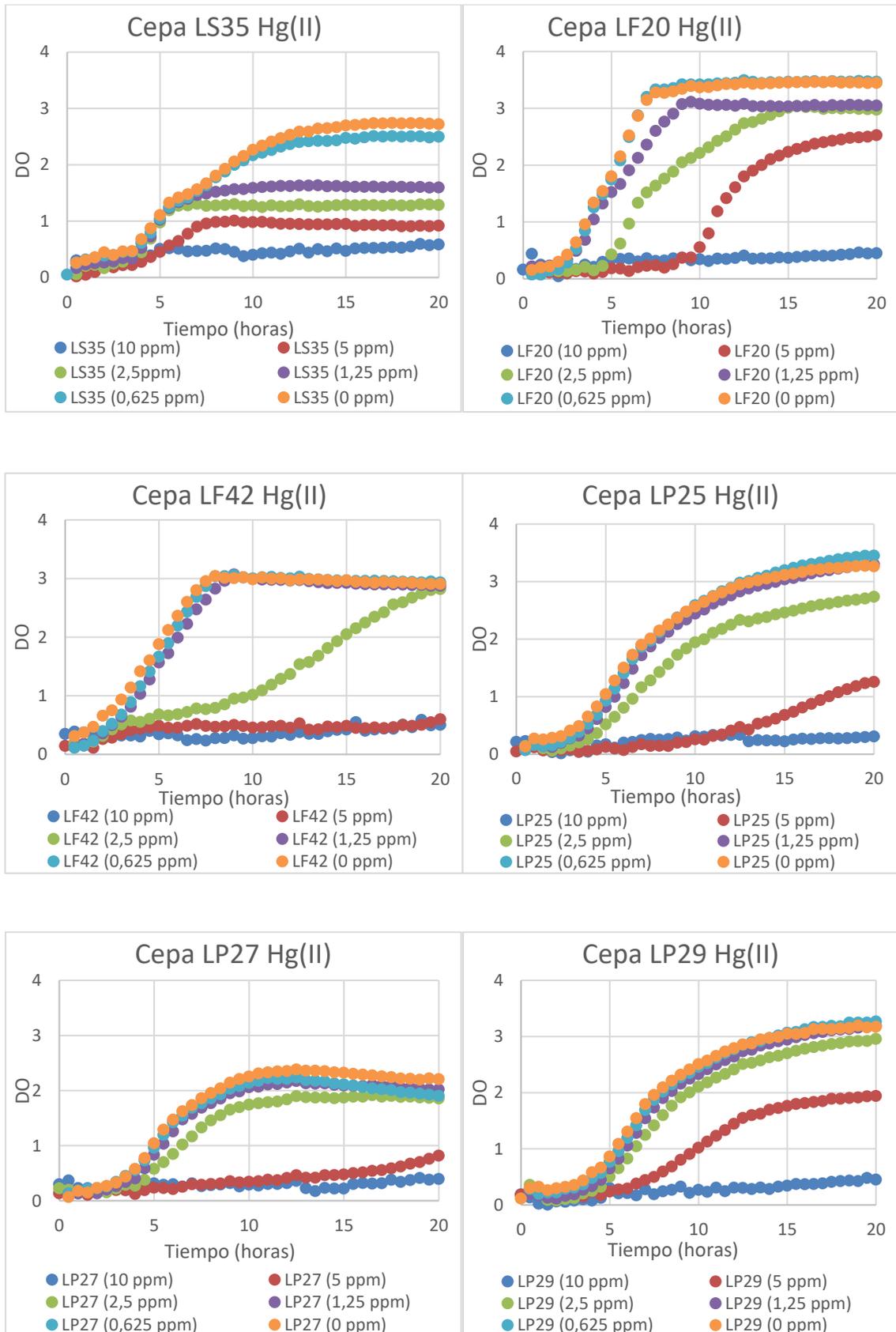


Figura 2.- Crecimiento de diferentes cepas BAL con distintas concentraciones de Hg(II) que van desde de 0-10 ppm.

En la Figura 2, se representan los resultados obtenidos en los ensayos con Hg(II) incorporado. Ninguna de las cepas analizadas creció a la concentración más alta incluida en el ensayo (10 ppm). La cepa LF42 tampoco creció en presencia de 5 ppm de Hg(II). En el caso de la cepa LP27 se observa un ligero incremento de la DO al final del periodo de ensayo, si bien sería necesario repetir el ensayo midiendo el crecimiento durante un periodo más prolongado para determinar si realmente esta cepa es capaz de crecer tras un periodo de latencia muy prolongado. Es notable la diferencia en la respuesta entre las distintas cepas. Por ejemplo, en la cepa LF20 se observa una fase de latencia progresivamente más prolongada cuanto más alta es la concentración del Hg(II). En la cepa LS35 en cambio se observa una progresiva reducción de la DO máxima alcanzada por el cultivo a medida que aumenta la concentración de Hg(II). En las cepas LP25, LP27 y LP29 se observa un crecimiento relativamente similar a las concentraciones más bajas (hasta 2.5 ppm) pero a 5 ppm se observa una gran pérdida de la capacidad de crecimiento, sobre todo en las cepas LP25 y LP27. Los resultados muestran una respuesta distintiva de cada cepa, si bien el comportamiento similar de las tres cepas de *L. plantarum* del estudio podrían sugerir una respuesta característica de esta especie frente a Hg(II). No obstante, el número tan limitado de cepas analizadas no permite sostener una conclusión sólida en este sentido.

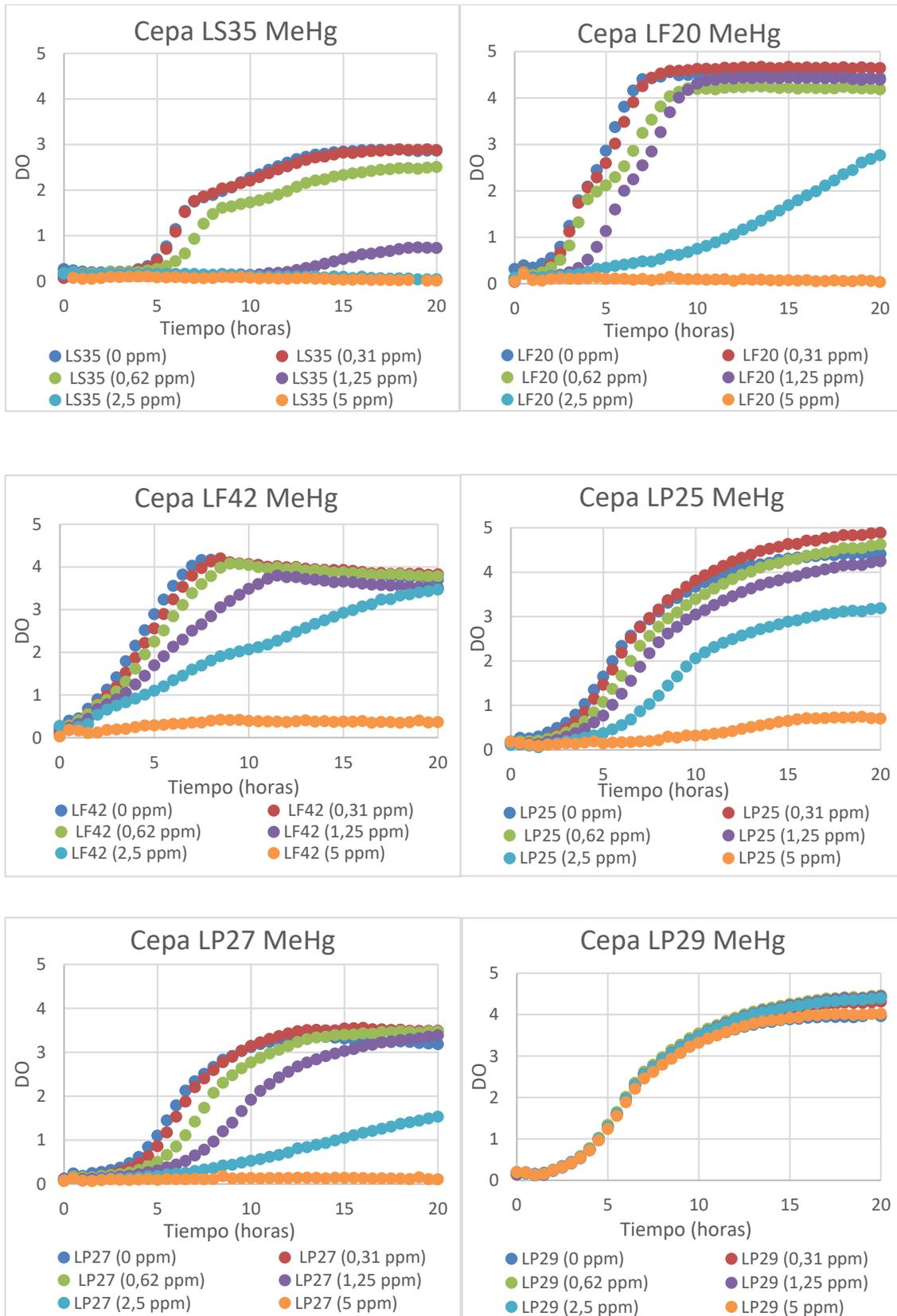


Figura 3.- Crecimiento de diferentes cepas BAL con distintas concentraciones de MeHg que van desde de 0-5 ppm.

En las curvas de crecimiento de las cepas expuestas a metil mercurio (MeHg) las cuales están reflejadas en la Figura 3, se observa que ninguna de las cepas fue capaz de crecer a la concentración más alta ensayada (5 ppm) a excepción de la cepa LP29 que muestra un crecimiento bastante similar para todas las concentraciones del metal. Es importante recordar que los resultados necesitan confirmación y no se sabe si se trata de una peculiaridad o de un artefacto. La cepa LS35 fue la más sensible ya que no fue capaz de crecer en presencia de 2,5 ppm de MeHg.

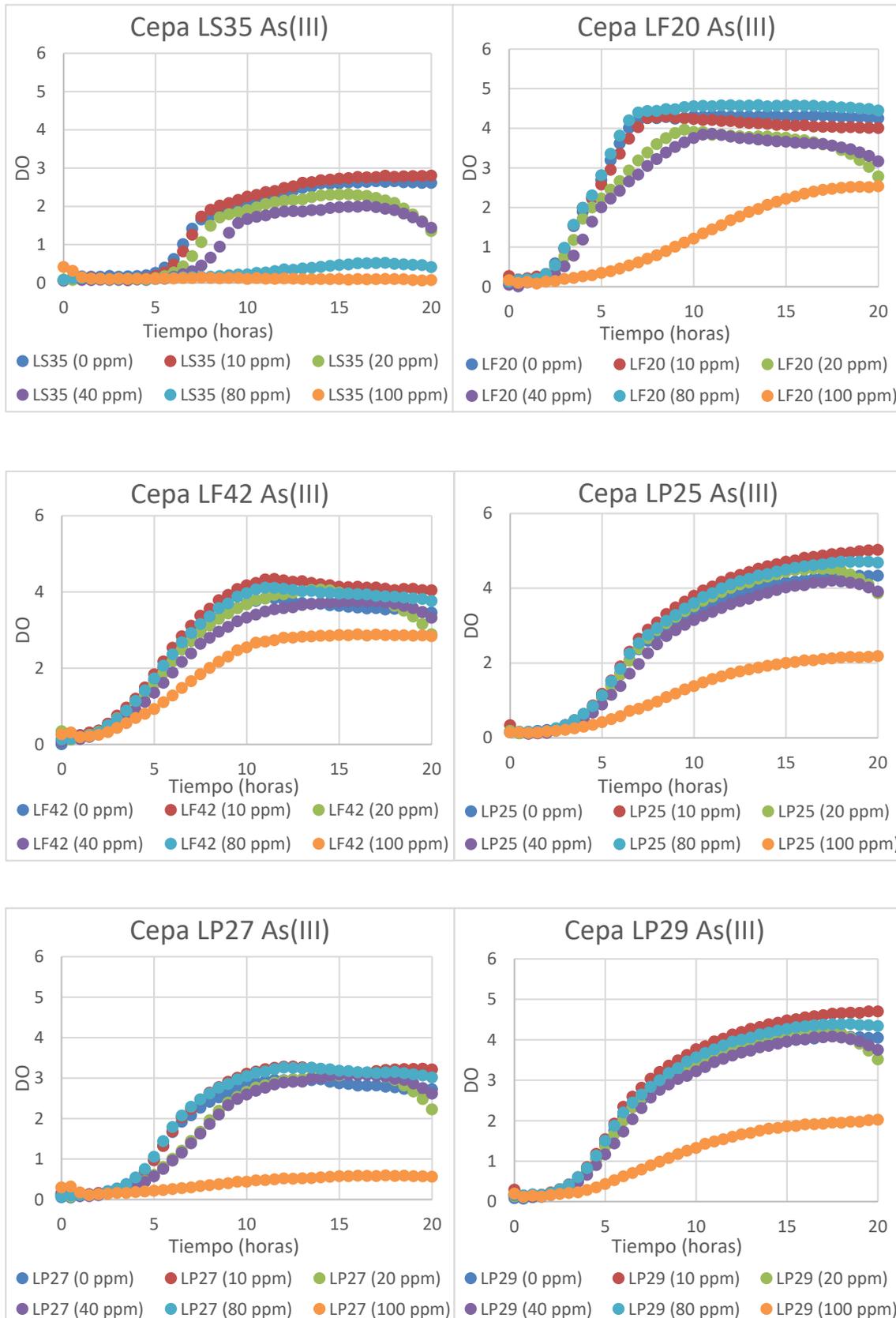


Figura 4.- Crecimiento de diferentes cepas BAL con distintas concentraciones de As(III) que van desde de 0-100 ppm.

En presencia de As(III) (Figura 4), cuatro de las cepas pudieron crecer a la mayor concentración del tóxico. La cepa LS35 vio totalmente inhibido su crecimiento a 100 ppm y solo se registró un crecimiento residual con 80 ppm de As(III). Por su parte, la cepa LP27 apenas creció en presencia de 100 ppm de As(III). De nuevo, se puede distinguir una respuesta muy semejante entre las cepas LP25, LP27 y LP29, es decir, las cepas de *L. plantarum*, si bien LP35 fue mucho más sensible a la presencia de 100 ppm de As(III) como se ha señalado antes. Se puede ver que algunas cepas revelan una caída a partir de las últimas horas de la lectura. Esto se muestra en curvas de cepas como la LS35, LF20 o LP27 y una posible explicación a este hecho podría ser que las bacterias estén en fase de lisis celular, pero se trata de un aspecto que no se ha estudiado en este experimento y puede ser para una futura investigación.

La cepa LF42 tiene un crecimiento muy elevado para la máxima concentración de As(III), es decir, para 100 ppm, ya que la diferencia de crecimiento a menores concentraciones es baja.

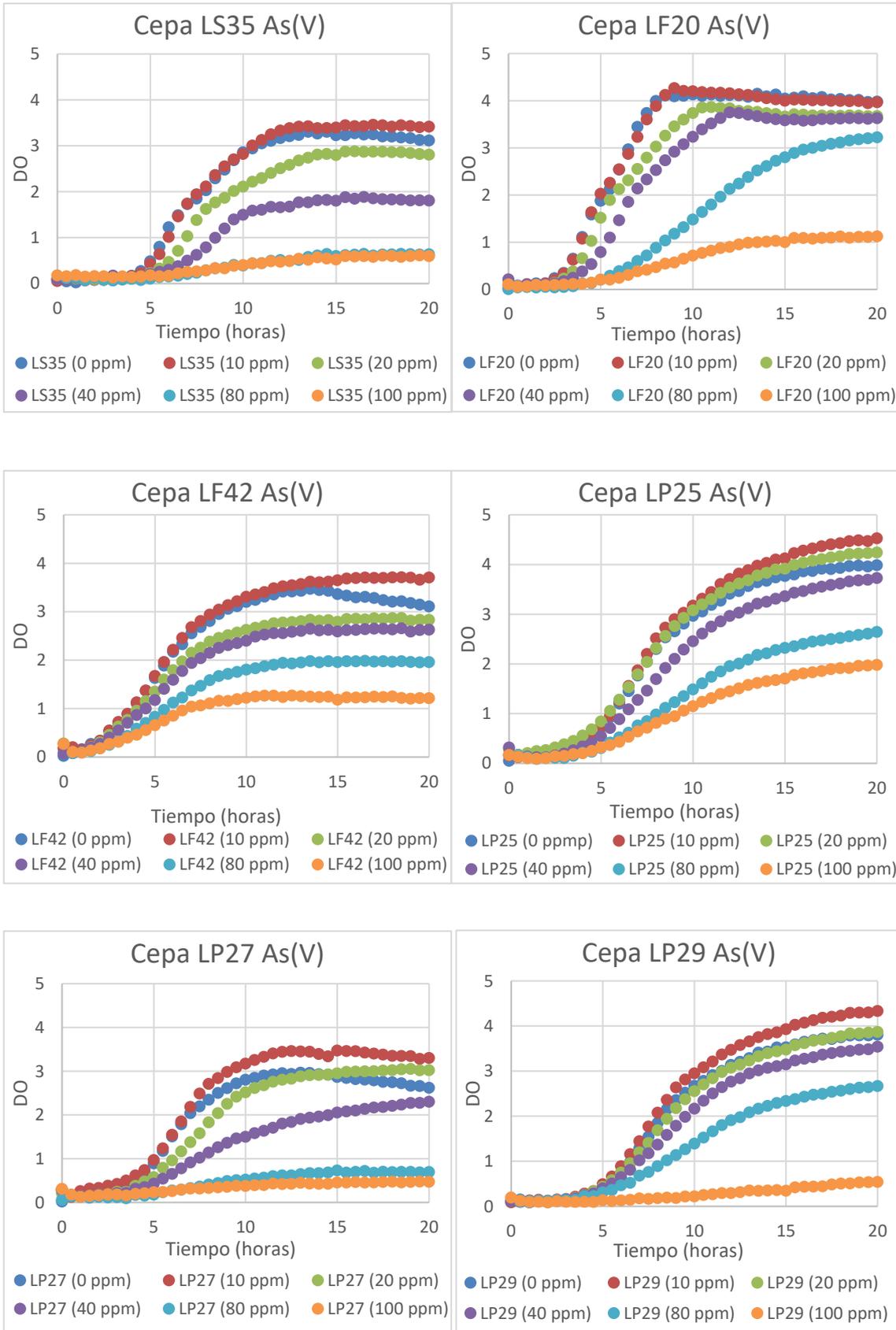


Figura 5.- Crecimiento de diferentes cepas BAL con distintas concentraciones de As(V) que van desde de 0-100 ppm.

En el ensayo con As(V) (Figura 5), las cepas estudiadas presentan una fase estacionaria extensa. Al igual que se observó con As(III), la cepa LS35 fue la más sensible a As(V), mostrando un crecimiento muy residual a las dos concentraciones más altas ensayadas (80 y 100 ppm). La cepa LP27 también mostró solo crecimiento residual a 80 y 100 ppm. Esta cepa también se había mostrado más sensible a As(III) (Figura 4). En cuanto a las demás cepas, la cepa LP29 fue severamente inhibida a 100 ppm, mientras que las cepas LF20, LF42 y LP25 fueron capaces de crecer en presencia de 100 ppm de As(V) aunque su crecimiento también fue inhibido.

En las Tablas 3, 4, 5 y 6 se muestran los datos de las tasas de crecimiento de cada cepa frente a las determinadas concentraciones del metal y la densidad óptica máxima que alcanzan.

Tabla 3. Densidad óptica máxima y tasa de crecimiento de las cepas BAL en función de la concentración de Hg(II).

Hg(II)	10 ppm		5 ppm		2,5 ppm		1,25 ppm		0,62 ppm		0 ppm	
	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)
LS35	0,623	0,0243	1,006	0,0574	1,305	0,122	1,635	0,1194	2,537	0,0963	2,74	0,0996
LF20	0,503	0,0263	2,537	0,1277	3,036	0,14	3,111	0,1324	3,494	0,1637	3,468	0,1449
LF42	0,634	0,0064	1,206	0,0282	2,823	0,0182	3,07	0,0919	3,057	0,0904	3,043	0,0821
LP25	0,363	0,0094	1,416	0,0309	2,825	0,0782	3,372	0,0922	3,494	0,0932	3,288	0,089
LP27	0,503	0,0074	1,019	0,0077	1,925	0,0726	2,171	0,0992	2,236	0,0881	2,382	0,0967
LP29	0,55	0,0079	2,002	0,0464	3,013	0,0877	3,248	0,0927	3,314	0,0891	3,216	0,085

Tabla 4. Densidad óptica máxima y tasa de crecimiento de las cepas BAL en función de la concentración de MeHg.

MeHg	5 ppm		2,5 ppm		1,25 ppm		0,62 ppm		0,31 ppm		0 ppm	
	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)
LS35	0,104	0	0,2	0	0,74	0,031	2,548	0,0058	2,905	0,1621	2,888	0,0274
LF20	0,212	0	3,113	0,0397	4,443	0,1509	4,249	0,1836	4,67	0,0858	4,555	0,1387
LF42	0,419	0,015	3,469	0,0434	3,797	0,0733	4,076	0,0899	4,199	0,1041	4,166	0,1079
LP25	0,741	0,0219	3,222	0,0729	4,334	0,0913	4,683	0,0994	4,942	0,1097	4,418	0,0997
LP27	0,176	0,0018	1,693	0,0231	3,513	0,0821	3,508	0,1009	3,555	0,1129	3,357	0,1069
LP29	4,016	0,1044	4,411	0,1033	4,45	0,1054	4,475	0,105	4,322	0,1036	4,018	0,0967

Tabla 5. Densidad óptica máxima y tasa de crecimiento de las cepas BAL en función de la concentración de As(III).

As(III)	100 ppm		80 ppm		40 ppm		20 ppm		10 ppm		0 ppm	
	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)
LS35	0,416	0	0,523	0,0088	2,016	0,1223	2,316	0,1399	2,818	0,1694	2,656	0,1386
LF20	2,556	0,0411	4,585	0,1428	3,858	0,1497	3,965	0,1592	4,295	0,0871	4,339	0,1359
LF42	2,883	0,0666	4,11	0,1039	3,752	0,0862	4,062	0,0935	4,338	0,1043	3,833	0,0918
LP25	2,191	0,0445	4,711	0,1127	4,199	0,0964	4,523	0,1072	5,028	0,1103	4,353	0,1076
LP27	0,593	0,0145	3,26	0,1251	3,084	0,0845	3,14	0,0848	3,284	0,1201	2,967	0,1192
LP29	2,032	0,0462	4,39	0,1173	4,078	0,0955	4,246	0,1046	4,698	0,1212	4,09	0,1171

Tabla 6. Densidad óptima máxima y tasa de crecimiento de las cepas BAL en función de la concentración de As(V).												
As(V)	100 ppm		80 ppm		40 ppm		20 ppm		10 ppm		0 ppm	
	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	DO max	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)
LS35	0,611	0,0168	0,643	0,0261	1,883	0,0785	2,876	0,125	3,454	0,1516	3,302	0,1521
LF20	1,135	0,0339	3,224	0,064	3,75	0,1209	3,864	0,1561	4,266	0,1838	4,145	0,1912
LF42	1,269	0,0471	1,984	0,0637	2,656	0,0744	2,869	0,0809	3,714	0,0931	3,471	0,0904
LP25	2,104	0,0469	2,837	0,0557	3,94	0,0777	4,411	0,0827	4,633	0,097	4,026	0,0893
LP27	0,48	0,013	0,741	0,0226	2,404	0,0555	3,048	0,0795	3,47	0,0965	2,963	0,0994
LP29	0,61	0,0132	2,858	0,0539	3,744	0,0734	4,107	0,0826	4,503	0,0997	3,853	0,0967

En todos los casos, los tóxicos afectaron al crecimiento y a la biomasa final. El mercurio y el arsénico son independientes por lo que no sería correcto analizarlos de forma conjunta pero sí es interesante analizar los comportamientos en las condiciones de metil mercurio/mercurio y de arsenito/arsenato.

En general, la exposición tanto a Hg(II) como a MeHg resultó en una progresiva reducción de la velocidad de crecimiento y DO máxima alcanzada, aunque con notables diferencias en la respuesta entre cepas y entre las dos formas de Hg ensayadas. La exposición a Hg(II) afectó al crecimiento de distintas maneras según la cepa. Por ejemplo, la cepa LS35 se vio afectada en la DO máxima alcanzada de modo progresivo incluso a las concentraciones de Hg(II) más bajas ensayadas, mientras que en otros casos como las cepas LP27 y LP29 la DO máxima solo se vio afectada a las concentraciones más altas de Hg(II) (Figura 2 y Tabla 3). En la cepa LF20 se observó además un incremento de la fase de latencia que no fue evidente en las demás cepas ensayadas. Como se ha señalado antes, el MeHg tiene un efecto más severo sobre el crecimiento. Es de notar, además, que la respuesta de las cepas a las dos formas de Hg fue en general diferente (Figura 2 y 3). Por ejemplo, el incremento de la latencia observado en la cepa LF20 frente a concentraciones crecientes de Hg(II) no se observa con MeHg. El crecimiento de la cepa LP29 en presencia de MeHg es un caso singular que debe ser verificado antes de sacar ninguna conclusión. Las diferencias observadas sugieren que Hg(II) y MeHg posiblemente actúan sobre moléculas o procesos fisiológicos diferentes.

El análisis del crecimiento en presencia de las dos formas de As también revela importantes diferencias entre las cepas y en su respuesta a ambos tóxicos (Figuras 4 y 5 y Tablas 5 y 6). En general, las cepas ensayadas mostraron mayor sensibilidad a As(V) que a As(III), tanto en velocidad de crecimiento como DO máxima alcanzada.

Ensayos de unión

Se estudió la capacidad de captación de Hg(II) en solución acuosa de varias cepas de *Lactobacillus* (Tabla 1). El ensayo se llevó a cabo con dos concentraciones

bacterianas distintas con el fin de estimar el efecto de la misma sobre la capacidad de captación. A la mayor DO ensayada, todas las cepas mostraron una alta capacidad de captación de Hg(II), con porcentajes de captación del metal que variaron del 75% al 100% (Figura 6a). Como era de esperar, los porcentajes de captación fueron menores en las suspensiones a DO 1,25 (Figura 6b) si bien se observan notables diferencias entre cepas. En la mayoría de los casos, las diferencias son relativamente pequeñas, aunque destacan algunas cepas como la ZL17-16 y LS35 en las que hay una gran diferencia de captación de Hg entre las dos DO ensayadas. La pequeña diferencia observada en la mayoría de las cepas puede deberse a que incluso a la concentración celular más baja ensayada se había llegado ya a una situación próxima a la saturación, de manera que la adición de más células tiene ya poco efecto sobre la captación de Hg(II). En resumen, los resultados obtenidos muestran en general una gran capacidad de captación de Hg(II) en solución acuosa por parte de todas las cepas analizadas. Entre ellas, destaca la cepa LF42, que ha demostrado tener una capacidad de retención de mercurio superior al 80% a la concentración celular más baja ensayada.

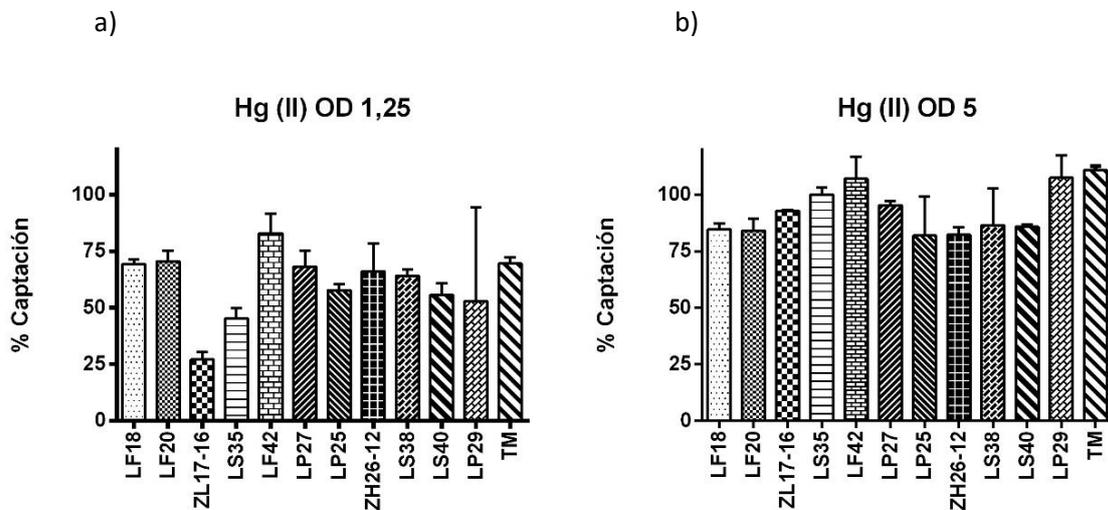


Figura 6.- Capacidad de captación de mercurio (Hg) de las cepas BAL a DO1,25 (a) y DO5 (b).

5. Discusión

La presencia de mercurio y arsénico en el agua y los alimentos es un problema de salud global. Las agencias internacionales y nacionales encargadas de la salud y la seguridad alimentaria en general han recomendado reducir el consumo de los productos que con más frecuencia presentan problemas de contaminación, como los grandes peces depredadores. Bien es cierto que estos productos son fuentes de nutrientes con un valor biológico alto por su contenido de ácidos grasos omega-3 entre otros nutrientes, por lo que no es recomendable eliminarlos de la dieta. El pescado, en concreto, es el mayor contribuidor de mercurio a la dieta. Algunas estrategias de mitigación de la exposición se han centrado en usar quelantes como el EDTA (Hajeb & Jinap, 2012), que está permitido en alimentos, pero no es recomendable para niños y mujeres embarazadas y en algunos países como Australia no están permitidos. Cocinar el pescado no reduce los niveles de mercurio presentes (Morgan, Berry & Graves, 1997). Viendo lo dificultoso que puede llegar a ser reducir la cantidad de metales pesados del alimento, se ha considerado la alternativa de reducir la exposición a estos, modificando su llegada a la circulación sistémica después de la ingesta. Esta es la base del uso para reducir la biodisponibilidad de metales con cepas de BAL, ya que muchas poseen características probióticas y se desarrollan en el tracto gastrointestinal (Monachese, Burton & Reid, 2012). En el presente estudio se ha determinado la resistencia que poseen estas cepas en una exposición a As y Hg y además la capacidad de captación de Hg(II), con el fin de determinar si pueden ser útiles para reducir la biodisponibilidad de Hg(II) en el tracto gastrointestinal. El proyecto original incluía determinar la capacidad de captación de MeHg, As(III) y As(V) también, pero dada la interrupción del trabajo experimental debido a la situación sanitaria no se pudo realizar.

Ensayos de resistencia

En estos ensayos se pretende determinar la capacidad de crecimiento de las cepas seleccionadas en presencia de Hg(II), MeHg, As(III) o As(V). Desafortunadamente, no se pudo realizar réplicas para verificar la reproducibilidad de los resultados por lo que necesitarán posterior comprobación. En general, se observó un efecto tóxico de todos los compuestos analizados dentro del rango de concentraciones del ensayo con la notable excepción de la cepa LP29 frente a MeHg (Figura 3). Sin embargo, es necesario confirmar este resultado.

En cuanto a los resultados de Hg, tanto en las cepas bacterianas enfrentadas a Hg(II) y a MeHg (Figuras 2 y 3), presentan un comportamiento similar para las concentraciones más bajas del ensayo. En general, las bacterias son más sensibles a

MeHg que a Hg(II), con la excepción de la cepa LP29 como se ha mencionado anteriormente. A la concentración de 2,5 ppm las cepas expuestas a Hg(II) se encuentran menos afectadas que en MeHg, pero es una concentración en la que cada cepa tiene un comportamiento parecido si enfrentamos las curvas. En la curva de crecimiento de la cepa LP27 expuesta a Hg(II) se aprecia una ligera subida en la concentración de 5 ppm mientras que en la curva de esta misma cepa expuesta a MeHg no se aprecia. De hecho, a esa misma concentración, no presenta crecimiento. Para poder determinar qué ha ocurrido aquí habría que prolongar el tiempo de estudio del ensayo. Si nos referimos a la tasa de crecimiento de esta cepa con exposición a Hg(II) y MeHg (Tablas 3 y 4), se confirma que la bacteria presenta mayor crecimiento expuesta a Hg(II) aunque la diferencia sea poco notable. Llega a alcanzar un valor de tasa de crecimiento de $0,0077 \text{ h}^{-1}$ expuesta a Hg, mientras que para MeHg en la misma concentración $0,0018 \text{ h}^{-1}$. Destacan las cepas LP25 y LF42 ya que tienen una curva muy similar para ambas exposiciones.

Por otra parte, en los resultados de las curvas de crecimiento de las cepas bacterianas enfrentadas a iAs (Figuras 4 y 5), aunque en general se muestra un efecto tóxico a las concentraciones más altas ensayadas, se demuestra que el As(V) es más tóxico que el As(III). Esto puede apreciarse por ejemplo en las cepas LF42 y LP25, que mostraron escaso efecto del As(III) sobre el crecimiento hasta 80 ppm, mientras que con As(V) se apreció una progresiva disminución de la velocidad máxima de crecimiento y DO máxima con As(V) (Figuras 4 y 5, y Tablas 5 y 6). En particular, destaca la cepa LF42 que mostró un crecimiento superior a las demás cepas frente a la concentración máxima ensayada de As(III) e incluso con As(V) fue capaz de crecer a la concentración máxima si bien la cepa LP25 alcanzó una DO máxima superior (Tabla 6). En las cepas enfrentadas a As(III) (Figura 4) se observa una disminución de la DO en las últimas horas registradas. Una posible hipótesis que explica este suceso puede ser que se esté dando una lisis celular, pero no se han estudiado las causas. La diferencia de toxicidad entre el As(V) y el As(III) sugieren que, como se ha propuesto para Hg(II) y MeHg, ambas formas de As tienen diferentes mecanismos de toxicidad. En el caso del As(V) su toxicidad puede residir en la similitud estructural entre el As(V) y el fosfato. Si bien algunas bacterias disponen de transportadores con una alta capacidad para discriminar arsenato y fosfato (Elias et al., 2012), las evidencias disponibles sugieren que los lactobacilos no poseen esta capacidad puesto que se observó que la presencia de fosfato inhibía la incorporación de As(V) (Clemente et al., 2020).

El principal aporte de estos resultados indica que las bacterias son capaces de crecer en un medio que contiene concentraciones relativamente altas de Hg o As. Este es un resultado relevante a la hora de su posible uso como estrategia para reducir la

toxicidad asociada a la exposición a As o Hg, ya que es anticipable que las bacterias deban estar viables para tener un efecto protector.

De acuerdo con la Comisión Técnica Científica de Contaminantes de la Cadena Alimentaria (Contam) y según el reglamento de la Unión Europea (EU) 2015/1006 en el que se modifica el Reglamento de la Comisión Europea (CE) nº 1881/2006, el 12 de octubre de 2009, establece que la ingesta máxima tolerable de arsénico por persona a la semana es de 15 µg/kg del peso corporal establecida por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos Aditivos Alimentarios (JECFA) no es apropiado. Esto es debido a que, como se ha mencionado anteriormente, el iAs puede causar cánceres de pulmón, piel y vejiga y que produce efectos nocivos sobre la persona. Es por esto que la Contam estableció un límite de confianza inferior de la dosis de referencia situado entre 0,3 y 8 µg/kg de peso corporal al día para los que padecen cánceres asociados a este metaloide.

En cuanto al Hg, en el Reglamento (CE) nº1881/2006 de la comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, La EFSA (EFSA, 2004) aprobó una ingesta semanal tolerable provisional de 1,6 µg/kg de peso corporal. En este dictamen se esclareció que el MeHg es el más alarmante ya que puede ser más del 90% del mercurio total que contienen el pescado y marisco. Los niveles de mercurio descubiertos en los alimentos que no son pescado ni marisco son menos preocupantes, ya que la forma de mercurio en ellos presente es distinta a MeHg por lo que están considerados de menor riesgo.

Por lo mencionado anteriormente cabe decir que los datos obtenidos de resistencia en el presente estudio indican que estas cepas bacterianas son capaces de crecer con exposiciones a estos tóxicos por encima de las concentraciones encontradas habitualmente en alimentos.

Un resultado llamativo es la similitud del comportamiento que siguen las cepas de la especie *L. plantarum* en los ensayos con Hg(II), As(III) y As(V) en menor medida. Así como el de la especie *L. fermentum*. Esto puede desvelar particularidades de las especies en particular. Sin embargo, nada parece indicar, a falta de la confirmación de los resultados sobre la resistencia a MeHg de la cepa LP29, que el origen peculiar de estas cepas (mujeres con altos niveles de metales pesados en su organismo) esté condicionando la resistencia de las cepas.

En estudios similares, como el de Alcántara et al. 2017, en el que modificaron las propiedades fisicoquímicas de la envoltura celular de *Lactobacillus casei*, utilizando cepas mutantes, se llegó a la conclusión de que las cepas mutantes que poseían una densidad superficial de carga negativa mayor aumentaron la sensibilidad al mercurio, a la vez que incrementaron su capacidad de captación de Hg. En este trabajo también se

determinó, al igual que se ha comprobado aquí, que la forma orgánica del Hg es más tóxica para las bacterias y los niveles de inhibición observados fueron similares a los obtenidos aquí.

Ensayos de unión

La evaluación *in vitro* de la capacidad de captación del mercurio en las BAL ha mostrado que todas las cepas poseen una gran capacidad de captación a DO 5 (Figura 6). Las pequeñas diferencias observadas en algunas cepas en la captación a DO 5 y DO 1,25 (la cepa LF42, por ejemplo) sugiere que en estas cepas se alcanzó un nivel de captación próximo a la saturación ya en la DO más baja ensayada. Estaba previsto en el estudio realizar el ensayo de unión a DO más bajas para analizar la relación dosis-respuesta y tener un resultado más aproximado sobre estas cepas.

Estos datos indican que, como era de esperar, a mayor DO el porcentaje de captación es superior en todas las cepas bacterianas. Bien es cierto que no todas las cepas presentan una capacidad de captación proporcional a las dos concentraciones de células. En este aspecto, destacan las cepas LF18, LF42 y LF20 pertenecientes a la especie *L. fermentum*. Estas tres cepas poseen una capacidad de captación elevada en las dos DO ensayadas, ya que el menor porcentaje de captación es en torno al 70% y en la DO mínima. Las cepas pertenecientes a esta especie pueden ser consideradas como aptas para un estudio con probióticos. En estudios previos, Kinoshita et al. (2013), determinaron la capacidad de quelación de las BAL, afirmando que pueden reducir la solubilidad de Hg(II). Además, también determinaron si las BAL son capaces de captar el mercurio en condiciones de digestión gastrointestinal. Lo que, unido al presente estudio, puede ser de gran utilidad para el aporte de esta colección de cepas como posibles candidatas para reducir la disponibilidad oral del mercurio.

En el estudio de Jadán-Piedra et al. (2017), se determinó que la capacidad de captar el Hg(II) y el CH₃Hg soluble en condiciones gastrointestinales para las BAL fue significativamente inferior a la observada en soluciones acuosas. Los investigadores de este estudio trataron de averiguar qué factores son los que determinaban que se produjera tal reducción de la capacidad de captación de mercurio en pescados como el marisco y propusieron que puede deberse al modo en el que el mercurio es liberado a la matriz alimentaria durante el proceso de digestión, o bien que el mercurio forma determinados complejos con otros componentes solubilizados durante el mismo proceso. En este mismo estudio también demostraron que los complejos de cisteína-mercurio reducen la interacción del mercurio con las bacterias.

Posteriormente, Jadán-Piedra et al. (2019), determinaron que las BAL presentan varias ventajas para disminuir la exposición a metales. Esto es así ya que son microorganismos que habitan de forma natural el tracto gastrointestinal y que son capaces de ejercer un efecto protector que también palía la toxicidad de los metales. Se vio una reducción de la biodisponibilidad de MeHg en ratones con las cepas BAL ensayadas. En otros estudios se ha observado una disminución de la respuesta prooxidante en animales de experimentación (Jiang et al., 2018; Majlesi et al., 2017; Tian et al., 2012; Zhai et al., 2015), es decir, se ha visto reducido el estrés oxidativo, por lo que no se forman especies reactivas y disminuyen los radicales libres. Así pues, determinaron la capacidad de las BAL de reducir el transporte de Hg a través del epitelio intestinal que ha sido expuesto a un alimento contaminado. Los mecanismos por los cuales se reducen los niveles de mercurio difieren para la solución acuosa y el pez espada. En estudios previos (Anderson & Van Itallie, 2009) se ha demostrado que las proteínas que forman las uniones intercelulares son las que dirigen la permeabilidad del epitelio. Algunas BAL tienen la capacidad de aumentar la función de la barrera generando un epitelio menos permeable incrementando la expresión de estas proteínas (Ulluwishewa et al., 2011). Alcántara et al (2017) determinaron que la adsorción del metal se da en la superficie bacteriana lo que supone que deje de estar disponible para el transporte a través de las monocapas celulares. Esto determinaría por qué se da un efecto distinto en las soluciones acuosas. Las capacidades de captación de Hg(II) pueden variar entre estudios *in vitro* o *in vivo* ya que las interacciones que tienen lugar entre el Hg y las BAL en el lumen, la presencia de microbiota intestinal y de la circulación enterohepática entre otros factores, pueden afectar a la capacidad de las bacterias para unirse al mercurio o favorecer la liberación de las ya unidas (Jadán-Piedra et al., 2019). Li et al. (2017) y Majlesi et al. (2017) sugieren que se han observado diferencias en los efectos protectores de las BAL respecto a la acumulación de metal. Insinúan que los modos de acción que son dependientes de la cepa, del modelo animal de experimentación, la dieta suministrada, las dosis de los metales y la exposición (si se trata de una exposición aguda, subcrónica o crónica) pueden afectar de forma decisiva la efectividad de las BAL como agente protector de los metales tóxicos y debe ser objeto de estudio.

En el estudio de Majlesi et al. (2017) afirman que las cepas de *L. plantarum* pueden ser útiles como estrategia para reducir la biodisponibilidad de metil mercurio según sus datos obtenidos, unos resultados que también se observan para esta especie en nuestro estudio. Así, las cepas LP25, LP27 y LP29 revelan unas capacidades de captación elevadas en la condición de DO máxima y aunque se observó una caída del

porcentaje de captación en la DO mínima del ensayo, éste fue superior al 50% en todos los casos.

Después de todo este análisis cabría estudiar qué relación tienen las cepas en ambos ensayos. Se destaca la cepa LF42 ya que es la que mayor porcentaje de captación de Hg presenta a la DO más baja ensayada, es decir a una DO 1,25 (Figura 6), porque cuanto más efecto presentan con menor dosis es mejor la respuesta. En cuanto a la curva de crecimiento de esta cepa frente a Hg(II) (Figura 2) se observa que no presenta crecimiento para las dos concentraciones de Hg más altas (10 y 5 ppm), pero sí que es capaz de crecer a las concentraciones de 1,25 y 0,625 ppm, llegando a alcanzar una DO 3 aproximadamente en la décima hora de exposición. La cepa LF20 también presenta una alta capacidad de unión a Hg (Figura 6) y en cuanto a la curva de crecimiento de esta cepa frente a Hg (Figura 2), se observa que presenta una fase de latencia prolongada y que cuanto más alta es la concentración más tiempo requiere para crecer. Sin embargo, esta cepa solo ve inhibido su crecimiento en la máxima concentración (10 ppm) y a concentración de 5 ppm es capaz de crecer, aunque a partir de las 10 horas.

La unión de Hg en una solución es una prueba orientativa y habría que realizar más pruebas para una correcta selección de cepas.

Con el fin de determinar su posible utilidad, habría que comprobar cuán de efectivas son estas cepas en capacidad de captación cuando el tóxico se encuentra en un alimento realizando una digestión simulada, haciendo pruebas en modelos celulares y llevarlo luego a una experimentación con modelos animales.

6. Conclusiones

1) Los resultados obtenidos permiten tener un conocimiento más completo de cepas bacterianas que podrían paliar la toxicidad asociada a la exposición a As o Hg. Se ha determinado que hay cierta resistencia a mercurio inorgánico, metil mercurio, arsenito y arsenato por parte de la colección de cepas BAL del estudio. Las concentraciones más altas de estos han provocado efectos tóxicos para las bacterias, es decir, los metales han influido en el crecimiento de estas, sobre todo a máximas concentraciones. De esta forma, se esclarece que el MeHg es más tóxico que el Hg y el As(V) es más tóxico que el As(III). Esto se ha demostrado en el ensayo de resistencia de las bacterias.

2) En lo referido al estudio de la capacidad de captación de mercurio inorgánico, esta colección de cepas BAL ha resultado tener, por lo general, una gran capacidad de captación de Hg(II). Si se tratase de una selección de cepas para ser implementadas como aplicación para una población, este estudio resultaría útil para hacer un primer cribado y descartar algunas cepas. Siendo así, se descartarían las cepas ZL17-16 y la cepa LS35. Las cepas con mejores características son aquellas que, a menor concentración bacteriana, tienen una mayor capacidad de unión al tóxico. Por lo que, las cepas LF42 y LF20 resultan interesantes. Dado esta característica que presentan de resistencia y captación, se considera que estas cepas son aptas para un estudio con probióticos.

7. Líneas futuras

Atendiendo al trabajo expuesto aquí, se pueden presentar algunas líneas de investigación que pueden ser objeto de interés. Se han despejado algunas incógnitas sobre esa colección de cepas, pero se pueden generar nuevas ideas o preguntas.

En relación con este experimento y la metodología llevada a cabo, en primer lugar, se debe continuar con el estudio y concluir con la correcta exposición de los resultados de los ensayos de crecimiento, exponiéndolos con sus correspondientes réplicas y aportando la confirmación de los resultados obtenidos. Por otra parte, es necesario continuar con los ensayos de unión, analizando todo el conjunto de cepas con las cuatro condiciones de tóxicos propuestas (mercurio inorgánico, metil mercurio, arsenito y arsenato), realizando la comparación y su correcta observación.

Puesto que la estrategia propuesta pretende demostrar o afirmar la capacidad que poseen estas cepas de eliminar/captar estos metales de forma beneficiosa para el organismo, un aspecto interesante sería realizar pruebas con cultivos celulares para comprobar si esta colección de cepas atenúa los efectos de los metales. Así, se podrían estudiar los efectos en las células epiteliales intestinales, tanto en el transporte a través de membranas epiteliales en cultivo, como en el efecto tóxico de los metales. En el caso de que en los cultivos celulares se viesen resultados positivos, es decir, si se han mitigado los efectos de los metales, la investigación se podría continuar mediante el uso de modelos animales (roedores). Aquí surgiría una posible vía de trabajo nueva que acomete la elaboración de probióticos en base a estas cepas. Se suministraría a los animales los probióticos y se estudiaría si tienen efecto protector. Para ver si estos reducen el daño observado tras la exposición, habría que analizar el estado de la mucosa intestinal, y observar si hay daños, y estudiar los efectos sobre la microbiota. Por otra parte, habría que constatar que estas cepas no tengan resistencia a antibióticos transmisibles y comprobar si en este aspecto son seguras. Si es así, se podría plantear el estudio a un grupo poblacional. Este grupo debe ser proveniente de una región que ya de por sí esté expuesta a metales, por ejemplo, por acción de la minería.

Con estos probióticos, se podría mejorar considerablemente la salud de la población más expuesta a estos metales (ya sea por acción antropogénica o natural) reduciendo así las enfermedades que pueden contraer a lo largo del tiempo de forma crónica. Por lo que diseñar estrategias basadas en probióticos que reduzcan el riesgo asociado a la exposición a Hg y As a través de los alimentos puede ser una buena manera de mitigar el daño producido por estos tóxicos.

También puede ser útil extender la investigación a otros metales pesados como el Cd o el Pb, ya que estos también están presentes en el medio ambiente y pueden resultar perjudiciales para la salud.

8. Bibliografía

Alcántara, C., Jadán-Piedra, C., Vélez, D., Devesa, V., Zúñiga, M., & Monedero, V. (2017). Characterization of the binding capacity of mercurial species in *Lactobacillus* strains. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 97(15), 5107-5113. doi: 10.1002/jsfa.8388

Anderson, J., & Van Itallie, C. (2009). Physiology and Function of the Tight Junction. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, 1(2), a002584-a002584. doi: 10.1101/cshperspect.a002584

Arrieta, M.C., Bistritz, L., and Meddings, J.B. (2006). Alterations in intestinal permeability. *Gut* 55, 1512-1520. 10.1136/gut.2005.085373

Arsenic. (2018). From <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>

Bisanz, J., Enos, M., Mwanga, J., Chagalucha, J., Burton, J., Gloor, G., & Reid, G. (2014). Randomized Open-Label Pilot Study of the Influence of Probiotics and the Gut Microbiome on Toxic Metal Levels in Tanzanian Pregnant Women and School Children. *Mbio*, 5(5). doi: 10.1128/mbio.01580-14

Breton, J., Massart, S., Vandamme, P., De Brandt, E., Pot, B., & Foligné, B. (2013). Ecotoxicology inside the gut: impact of heavy metals on the mouse microbiome. *BMC Pharmacology And Toxicology*, 14(1). doi: 10.1186/2050-6511-14-62

Calatayud, M., Devesa, V., & Vélez, D. (2013). Differential toxicity and gene expression in Caco-2 cells exposed to arsenic species. *Toxicology Letters*, 218(1), 70-80. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.01.013

Calatayud, M., Gimeno-Alcañiz, J., Devesa, V., & Vélez, D. (2015). Proinflammatory effect of trivalent arsenical species in a co-culture of Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells. *Archives Of Toxicology*, 89(4), 555-564. doi: 10.1007/s00204-014-1271-1

Calatayud, M., Gimeno-Alcañiz, J., Vélez, D., & Devesa, V. (2014). Trivalent arsenic species induce changes in expression and levels of proinflammatory cytokines in intestinal epithelial cells. *Toxicology Letters*, 224(1), 40-46. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.09.016

Chiocchetti, G., Domene, A., Kühn, A., Zúñiga, M., Vélez, D., Devesa, V., & Monedero, V. (2019). In vivo evaluation of the effect of arsenite on the intestinal epithelium and

associated microbiota in mice. *Archives Of Toxicology*, 93(8), 2127-2139. doi: 10.1007/s00204-019-02510-w

Chiocchetti, G., Vélez, D., & Devesa, V. (2019). Effect of chronic exposure to inorganic arsenic on intestinal cells. *Journal Of Applied Toxicology*, 39(6), 899-907. doi: 10.1002/jat.3778

Chiocchetti, G., Jadán-Piedra, C., Monedero, V., Zúñiga, M., Vélez, D., & Devesa, V. (2018). Use of lactic acid bacteria and yeasts to reduce exposure to chemical food contaminants and toxicity. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 59(10), 1534-1545. doi: 10.1080/10408398.2017.1421521

Cho, I., & Blaser, M. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 260-270. doi: 10.1038/nrg3182

Clemente, M., Vivó, M., Puig, S., Zúñiga, M., Monedero, V., Devesa, V., & Vélez, D. (2020). In vitro evaluation of the efficacy of lactobacilli and yeasts in reducing bioavailability of inorganic arsenic. *LWT*, 126, 109272. doi: 10.1016/j.lwt.2020.109272

Duffus, J. (2002). "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure And Applied Chemistry*, 74(5), 793-807. doi: 10.1351/pac200274050793

EFSA, 2012. Scientific opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA Journal* 10, 2985. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2985>.

Elias, M., Wellner, A., Goldin-Azulay, K., Chabriere, E., Vorholt, J., Erb, T., & Tawfik, D. (2012). The molecular basis of phosphate discrimination in arsenate-rich environments. *Nature*, 491(7422), 134-137. doi: 10.1038/nature11517

Elsanhoty, R., Al-Turki, I., & Ramadan, M. (2016). Application of lactic acid bacteria in removing heavy metals and aflatoxin B1 from contaminated water. *Water Science And Technology*, 74(3), 625-638. doi: 10.2166/wst.2016.255

Gagliardi, A., Totino, V., Cacciotti, F., Iebba, V., Neroni, B., & Bonfiglio, G. et al. (2018). Rebuilding the Gut Microbiota Ecosystem. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, 15(8), 1679. doi: 10.3390/ijerph15081679

Gerbino, E., Carasi, P., Araujo-Andrade, C., Tymczyszyn, E., & Gómez-Zavaglia, A. (2015). Role of S-layer proteins in the biosorption capacity of lead by *Lactobacillus*

kefir. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 31(4), 583-592. doi: 10.1007/s11274-015-1812-7

Grandjean, P., White, R., Weihe, P., & Jørgensen, P. (2003). Neurotoxic Risk Caused by Stable and Variable Exposure to Methylmercury From Seafood. *Ambulatory Pediatrics*, 3(1), 18-23. doi: 10.1367/1539-4409(2003)003<0018:nrcbsa>2.0.co;2

Hajeb, P., & Jinap, S. (2012). Reduction of Mercury from Mackerel Fillet Using Combined Solution of Cysteine, EDTA, and Sodium Chloride. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 60(23), 6069-6076. doi: 10.1021/jf300582j

Halttunen, T., Salminen, S., & Tahvonon, R. (2007). Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *International Journal Of Food Microbiology*, 114(1), 30-35. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.040

Hammes, W., & Hertel, C. (2006). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *The Prokaryotes*, 320-403. doi: 10.1007/0-387-30744-3_10

Hobman, J., & Crossman, L. (2015). Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *Journal Of Medical Microbiology*, 64(5), 471-497. doi: 10.1099/jmm.0.023036-0

Infante J, Cherlys, De Arco R, Deniles, & Angulo M, Edgardo. (2014). Removal of lead, mercury and nickel using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista MVZ Córdoba*, 19(2), 4141-4149

Jadán-Piedra, C., Crespo, Á., Monedero, V., Vélez, D., Devesa, V., & Zúñiga, M. (2019). Effect of lactic acid bacteria on mercury toxicokinetics. *Food And Chemical Toxicology*, 128, 147-153. doi: 10.1016/j.fct.2019.04.001

Jadán-Piedra, C., Alcántara, C., Monedero, V., Zúñiga, M., Vélez, D., & Devesa, V. (2017). The use of lactic acid bacteria to reduce mercury bioaccessibility. *Food Chemistry*, 228, 158-166. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.01.157

Jadán-Piedra, C., Baquedano, M., Puig, S., Vélez, D., & Devesa, V. (2017). Use of *Saccharomyces cerevisiae* To Reduce the Bioaccessibility of Mercury from Food. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 65(13), 2876-2882. doi: 10.1021/acs.jafc.7b00285

Jadán-Piedra, C., Clemente, M.J., Devesa, V., Vélez, D., 2016. Influence of physiological gastrointestinal parameters on the bioaccessibility of mercury and selenium from swordfish. *J. Agric. Food Chem.* 64, 690–698. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05046>.

Jiang, X., Gu, S., Liu, D., Zhao, L., Xia, S., & He, X. et al. (2018). Lactobacillus brevis 23017 Relieves Mercury Toxicity in the Colon by Modulation of Oxidative Stress and Inflammation Through the Interplay of MAPK and NF- κ B Signaling Cascades. *Frontiers In Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.02425

Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49:209-224

Kinoshita, H., Sohma, Y., Ohtake, F., Ishida, M., Kawai, Y., & Kitazawa, H. et al. (2013). Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. *Research In Microbiology*, 164(7), 701-709. doi: 10.1016/j.resmic.2013.04.004

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., & Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal Of Food Microbiology*, 41(2), 103-125. doi: 10.1016/s0168-1605(98)00049-x

Li, B., Jin, D., Yu, S., Etareri Evivie, S., Muhammad, Z., Huo, G., & Liu, F. (2017). In Vitro and In Vivo Evaluation of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus KLDS1.0207 for the Alleviative Effect on Lead Toxicity. *Nutrients*, 9(8), 845. doi: 10.3390/nu9080845

Majlesi, M., Shekarforoush, S., Ghaisari, H., Nazifi, S., Sajedianfard, J., & Eskandari, M. (2017). Effect of Probiotic Bacillus Coagulans and Lactobacillus Plantarum on Alleviation of Mercury Toxicity in Rat. *Probiotics And Antimicrobial Proteins*, 9(3), 300-309. doi: 10.1007/s12602-016-9250-x

Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., & Koonin, E. et al. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 103(42), 15611-15616. doi: 10.1073/pnas.0607117103

Monachese, M., Burton, J., & Reid, G. (2012). Bioremediation and Tolerance of Humans to Heavy Metals through Microbial Processes: a Potential Role for Probiotics?. *Applied And Environmental Microbiology*, 78(18), 6397-6404. doi: 10.1128/aem.01665-12

Morgan, J. N., Berry, M. R., & Graves, R. L. (1997). Effects of commonly used cooking practices on total mercury concentration in fish and their impact on exposure assessments. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 7, 119–133.

National Research Council. Arsenic in Drinking Water; National Academy Press: Washington, DC, USA, 2001

Ni, J., Wu, G., Albenberg, L., & Tomov, V. (2017). Gut microbiota and IBD: causation or correlation?. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(10), 573-584. doi: 10.1038/nrgastro.2017.88

Nurchi, V., Buha Djordjevic, A., Crisponi, G., Alexander, J., Bjørklund, G., & Aaseth, J. (2020). Arsenic Toxicity: Molecular Targets and Therapeutic Agents. *Biomolecules*, 10(2), 235. doi: 10.3390/biom10020235

Olivero-Verbel, J., Carranza-Lopez, L., Caballero-Gallardo, K., Ripoll-Arboleda, A., Muñoz-Sosa, D., 2016. Human exposure and risk assessment associated with mercury pollution in the Caqueta River, Colombian Amazon. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 20761–20771. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7255-3>.

Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to mercury and methylmercury in food. (2004). *EFSA Journal*, 2(3), 34. doi: 10.2903/j.efsa.2004.34

Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P., de Angelis, M., Gobbetti, M., & Kleerebezem, M. et al. (2016). Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 80(3), 837-890. doi: 10.1128/mnbr.00076-15

Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Foligne, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2015). Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Frontiers In Microbiology*, 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00058

Pourret, O. (2018). On the Necessity of Banning the Term “Heavy Metal” from the Scientific Literature. *Sustainability*, 10(8), 2879. doi: 10.3390/su10082879

Richardson, J., Dancy, B., Horton, C., Lee, Y., Madejczyk, M., & Xu, Z. et al. (2018). Exposure to toxic metals triggers unique responses from the rat gut microbiota. *Scientific Reports*, 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-24931-w

Sahuquillo, I., Lagarda, M., Silvestre, M., & Farré, R. (2007). Methylmercury determination in fish and seafood products and estimated daily intake for the Spanish population. *Food Additives And Contaminants*, 24(8), 869-876. doi: 10.1080/02652030701258760

Seki, H., Suzuki, A., & Maruyama, H. (2005). Biosorption of chromium(VI) and arsenic(V) onto methylated yeast biomass. *Journal Of Colloid And Interface Science*, 281(2), 261-266. doi: 10.1016/j.jcis.2004.08.167

Sommer, F., Anderson, J., Bharti, R., Raes, J., & Rosenstiel, P. (2017). The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 15(10), 630-638. doi: 10.1038/nrmicro.2017.58

Stellman, S. (2012). *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo* (p. Capítulo 33 Toxicología). Washington D.C.: D - INSHT (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo).

Stiles, M., & Holzapfel, W. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal Of Food Microbiology*, 36(1), 1-29. doi: 10.1016/s0168-1605(96)01233-0

Storelli, M., Stuffer, R., & Marcotrigiano, G. (2002). Total and methylmercury residues in tuna-fish from the Mediterranean sea. *Food Additives And Contaminants*, 19(8), 715-720. doi: 10.1080/02652030210153569

Tariba Lovaković, B. (2019). Cadmium, arsenic, and lead: elements affecting male reproductive health. *Current Opinion In Toxicology*, 19, 7-14. doi: 10.1016/j.cotox.2019.09.005

Taylor, V., Goodale, B., Raab, A., Schwerdtle, T., Reimer, K., & Conklin, S. et al. (2017). Human exposure to organic arsenic species from seafood. *Science Of The Total Environment*, 580, 266-282. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.12.113

Tian, F., Xiao, Y., Li, X., Zhai, Q., Wang, G., & Zhang, Q. et al. (2015). Protective Effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8246 against Copper Toxicity in Mice. *PLOS ONE*, 10(11), e0143318. doi: 10.1371/journal.pone.0143318

Tian, F., Zhai, Q., Zhao, J., Liu, X., Wang, G., & Zhang, H. et al. (2012). *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 Alleviates Lead Toxicity in Mice. *Biological Trace Element Research*, 150(1-3), 264-271. doi: 10.1007/s12011-012-9462-1

Tseng, H.-P.; Wang, Y.-H.; Wu, M.-M.; The, H.-W.; Chiou, H.-Y.; Chen, C.-J. Association between chronic exposure to arsenic and slow nerve conduction velocity among adolescents in Taiwan. *J. Health Popul. Nutr.* 2006, 24, 182–189

Ulluwishewa, D., Anderson, R., McNabb, W., Moughan, P., Wells, J., & Roy, N. (2011). Regulation of Tight Junction Permeability by Intestinal Bacteria and Dietary Components. *The Journal Of Nutrition*, 141(5), 769-776. doi: 10.3945/jn.110.135657

Unión Europea (UE). Reglamento (EU) 2015/1006 de la Comisión de 25 de junio de 2015 por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 1881/2006 en cuanto al contenido

máximo de arsénico inorgánico en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, L 161/14. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=CELEX:32015R1006&from=EN>

Unión Europea (UE). Reglamento (CE) nº 1881/2006 de la comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, L 364/5. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=CELEX:32006R1881&from=EN>

Vázquez, M., Vélez, D., & Devesa, V. (2014). In vitro evaluation of inorganic mercury and methylmercury effects on the intestinal epithelium permeability. *Food And Chemical Toxicology*, 74, 349-359. doi: 10.1016/j.fct.2014.10.022

Wang, L., Wang, Z., Yuan, Y., Cai, R., Niu, C., & Yue, T. (2015). Identification of Key Factors Involved in the Biosorption of Patulin by Inactivated Lactic Acid Bacteria (LAB) Cells. *PLOS ONE*, 10(11), e0143431. doi: 10.1371/journal.pone.0143431

Xue, F., Holzman, C., Rahbar, M., Trosko, K., & Fischer, L. (2007). Maternal Fish Consumption, Mercury Levels, and Risk of Preterm Delivery. *Environmental Health Perspectives*, 115(1), 42-47. doi: 10.1289/ehp.9329

Yin, R., Zhai, Q., Yu, L., Xiao, Y., Wang, G., & Yu, R. et al. (2016). The binding characters study of lead removal by *Lactobacillus plantarum* CCFM8661. *European Food Research And Technology*, 242(10), 1621-1629. doi: 10.1007/s00217-016-2661-9

Zhai, Q., Tian, F., Wang, G., Zhao, J., Liu, X., & Cross, K. et al. (2016). The cadmium binding characteristics of a lactic acid bacterium in aqueous solutions and its application for removal of cadmium from fruit and vegetable juices. *RSC Advances*, 6(8), 5990-5998. doi: 10.1039/c5ra24843d

Zhai, Q., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Narbad, A., & Chen, W. (2016). Oral Administration of Probiotics Inhibits Absorption of the Heavy Metal Cadmium by Protecting the Intestinal Barrier. *Applied And Environmental Microbiology*, 82(14), 4429-4440. doi: 10.1128/aem.00695-16

Zhai, Q., Xiao, Y., Tian, F., Wang, G., Zhao, J., & Liu, X. et al. (2015). Protective effects of lactic acid bacteria-fermented soymilk against chronic cadmium toxicity in mice. *RSC Advances*, 5(6), 4648-4658. doi: 10.1039/c4ra12865f

Zúñiga, M., & Aznar, R. (2011) ¿Qué son las bacterias lácticas?