

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Lactobacillus* spp. (LACTOBACILLACEAE) RESISTENTES A Cd(II) Y As(III) RECUPERADOS DE FERMENTO DE CACAO

Isolation and identification of *Lactobacillus* spp. (Lactobacillaceae) resistant to Cd(II) and As(III) from fermented cocoa

Claudia Milena RODRÍGUEZ-LÓPEZ¹^{*}, Ana María GUZMÁN-BELTRÁN¹^b, María Camila LARA-MORALES¹^b, Elianna CASTILLO¹^b, Pedro F. B. BRANDÃO¹^{*}

¹Grupo de Estudios para la Remediación y Mitigación de Impacto Negativos al Ambiente (G.E.R.M.I.N.A.), Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia – sede Bogotá, Carrera 30 #45-03, Bogotá 111321, Colombia.

*For correspondence: clmrodriguezlo@unal.edu.co; pfdeb@unal.edu.co

Received: 22nd November 2019, Returned for revision: 23th February 2020, Accepted: : 3th April 2020.

Associate Editor: Francisco José Martínez Pérez.

Citation/Citar este artículo como: Rodríguez-López CM, Guzmán-Beltrán AM, Lara-Morales MC, Castillo E, Brandão PFB. Aislamiento e identificación de *Lactobacillus* spp. (LACTOBACILLACEAE) resistentes a Cd(II) y As(III) recuperados de fermento de cacao. Acta Biol Colomb. 2021;26(1):19-29. Doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v26n1.83677>

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue aislar e identificar a partir de cacao fermentado en Caldas Colombia, bacterias con potencial de aplicación en procesos biotecnológicos, como la detoxificación de cadmio (Cd(II)) y arsénico (As(III)) en el organismo humano. En total se recuperaron 36 aislados de los cuales se recuperaron 11 en presencia de 1,0 mg/L de Cd(II) y 25 en presencia de 0,1 mg/L de As(III). Su identificación molecular determinó que la mayoría de los aislados son del género *Lactobacillus*. Los ensayos de crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de los elementos evaluados permitió determinar que gran parte de los aislamientos presentan resistencia a mayores concentraciones de As(III) (300 mg/L) que de Cd(II) (10 mg/L). En ensayos de tolerancia a la acidez (pH 2,5) se encontró que la cepa tipo *Lactobacillus plantarum* JCM 1055, junto con los aislamientos nativos *L. plantarum* A19, A26 y C16, mostraron la mayor tolerancia, por lo que se seleccionaron para evaluar su tolerancia a condiciones de salinidad. Las bacterias evaluadas mostraron crecimiento en concentraciones de hasta 4 g/L de sales biliares. Se concluye que los *L. plantarum* evaluados en este trabajo tienen un gran potencial para futuros ensayos en los que se busque demostrar la disminución de la bioaccesibilidad de Cd(II) y As(III) en condiciones *in vitro* del sistema digestivo humano debido a su resistencia a altas concentraciones de estos elementos y su tolerancia a condiciones de acidez y salinidad. Esto, junto con el reconocido potencial probiótico que tienen estos microorganismos, permitirá a futuro su uso en procesos biológicos de mitigación de Cd(II) y As(III).

Palabras clave: Elementos tóxicos, Fermentación, Lactobacilos, *Theobroma cacao*.

ABSTRACT

The aim of this study was to isolate and identify from fermented cocoa in Caldas Colombia, bacteria with potential application in biotechnological processes such as detoxification of cadmium (Cd(II)) and arsenic (As(III)) in the human organism. In total, 36 isolates were obtained, from which 11 were recovered in the presence of 1.0 mg/L of Cd(II) and 25 in presence of 0.1 mg/L of As(III). Molecular identification showed most isolates belong to the genera *Lactobacillus*. Minimum inhibitory concentration assays, in presence of different concentrations of the elements, allowed to determine that the majority of isolates have resistance to higher concentration of As(III) (300 mg/L) than Cd(II) (10 mg/L). Acidity tolerance assays at pH 2.5 showed that type strain *Lactobacillus plantarum* JCM 1055, and native isolates *L. plantarum* A19, A26, and C16, presented the highest tolerance, thus they were selected to evaluate their tolerance to salinity conditions. The evaluated bacteria could grow in bile salts up to 4 g/L. It is concluded that the evaluated *L. plantarum* have great potential to be used in assays in which bioaccessibility of Cd(II) and As(III) is diminished under *in vitro* conditions of the human digestive system, due to its resistance to high concentrations of the elements and tolerance to acidic and high bile salt conditions. These facts, together with the recognized probiotic potential of these microorganisms, may allow their future use in biological processes to mitigate Cd(II) and As(III).

Keywords: Fermentation, Lactobacilli, *Theobroma cacao*, Toxic elements.

INTRODUCCIÓN

En el proceso de fermentación de cacao participan microorganismos que son fundamentales para que se den los cambios en la composición química que originan las características organolépticas de la semilla. Entre estos están las bacterias ácido lácticas (BAL), dentro de las cuales predomina el género *Lactobacillus*, siendo las especies *L. fermentum* y *L. plantarum* las más sobresalientes (Saito *et al.*, 2014). Los *Lactobacillus* spp. son el principal grupo de BAL y se caracterizan por producir ácido láctico como producto del metabolismo de los carbohidratos. Este género tiene una morfología de bacilos o cocobacilos, Gram positivos y no formadores de esporas. Sus requerimientos nutricionales son complejos y se encuentran principalmente en plantas o frutos, en alimentos fermentados y en el organismo de los animales (Sun *et al.*, 2015). Se considera como el taxón de mayor potencial comercial debido a la capacidad de sus especies para realizar biotransformaciones de carbohidratos, y recientemente se ha estudiado su sistema basado en CRISPR-Cas, para explorar su potencial para edición genética (Sun *et al.*, 2015). Estas bacterias se reconocen como seguras por la FDA (Food and Drug Administration) y como presuntamente cualificadas como seguras por la EFS (European Food Safety) (Sun *et al.*, 2015).

De acuerdo a diversos autores (Ibrahim *et al.*, 2006; Halttunen *et al.*, 2007a; Halttunen *et al.*, 2007b; Singh y Sarma, 2010; Bhakta *et al.*, 2012; Monachese, 2012; Kinoshita *et al.*, 2013; Zhai *et al.*, 2013; Gerbino *et al.*, 2014), se ha confirmado que los *Lactobacillus* spp. tienen alto potencial para retener metales y metaloides tóxicos, como Cd(II) y As(III), respectivamente. Por ejemplo, se han reportado porcentajes de remoción de Cd(II) hasta del 100 % en medio acuoso por acción de *L. kefir* JCM 5818 (Gerbino *et al.*, 2014) y hasta del 60 % de As(III) por una cepa de *L. acidophilus* (obtenida del IMTECH, India) (Singh y Sarma, 2010). Por lo anterior, es importante la obtención de *Lactobacillus* spp. nativos con capacidad de tolerar elementos tóxicos que puedan aplicarse en procesos biotecnológicos de mitigación de estos elementos en sistemas biológicos.

La exposición a Cd(II) en los seres humanos genera estrés oxidativo y una respuesta inflamatoria, con daños en diferentes órganos del cuerpo, como el hígado, los riñones, el sistema cardiovascular y la piel (Das y Al-Naemi, 2019). La contaminación ambiental por Cd(II) está presente principalmente en China, Japón, Estados Unidos, Canadá, México, Bélgica, Alemania, Rusia y Australia (Das y Dash, 2017). En Colombia se han reportado concentraciones de Cd(II) en sangre superiores a los valores de referencia (entre 0,3 y 6,2 µg/L) en poblaciones cercanas al río Bogotá (Arias *et al.*, 2018).

El arsénico tiene dos formas químicas: arseniato (AsO_4^{3-} o As(V)) y arsenito (AsO_3^{3-} o As(III)), la cual es más tóxica (Spiro y Stigliani, 2007). En humanos, este elemento ocasiona lesiones cutáneas, neurotoxicidad, enfermedades

cardiovasculares, diabetes y problemas de desarrollo (Arias *et al.*, 2018). Se encuentra y representa una problemática en países como Argentina, Bangladesh, Chile, China, India, México y Estados Unidos; en Colombia, se han encontrado concentraciones considerables del metaloide en suelos, sedimentos, hortalizas y aguas de riego (Alonso *et al.*, 2014).

En este trabajo se aislaron bacterias a partir de fermento de cacao, particularmente *Lactobacillus* spp., y se evaluó su resistencia a Cd(II) y As(III) y su tolerancia a condiciones de acidez y a diferentes concentraciones de sales biliares. Esto se realizó con el fin de establecer el potencial futuro de aplicación de estos microorganismos en procesos biotecnológicos de mitigación de estos elementos tóxicos en el ambiente o para detoxificación al disminuir su biodisponibilidad en el organismo humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación de *Lactobacillus* spp. recuperados de fermento de cacao

Muestreo

El lugar de muestreo fue la finca Granja Luker, en el municipio de Palestina, departamento de Caldas, Colombia. Se tomaron muestras de grano de cacao (200 g) durante un proceso regular de fermentación en cajones de madera con una masa total de 200 kg. Las muestras se tomaron en tres tiempos diferentes del proceso de fermentación, cada una después de realizar un volteo (mezcla manual del grano y cambio de cajón): (i) 48 h, (ii) 72 h, y (iii) 120 h después del inicio del proceso. Las muestras se sumergieron en 300 mL de NaCl 0,85 % estéril y se almacenaron a 4 °C para su transporte al laboratorio donde se procesaron. Se autorizó la colecta de material biológico para el proyecto por la Resolución 0699 del 26 de abril de 2018, del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, previamente amparado por el otrosí No. 5 al Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados, para la ejecución de actividades de acceso a los recursos genéticos y sus productos derivados.

Aislamiento

Se realizó un enriquecimiento de los microorganismos aerotolerantes usando el sobrenadante de cada muestra como inóculo en medio MRS $\frac{1}{2}$ (Man-Rogosa-Sharpee broth, OXOID, diluido 1/2), de acuerdo con Gerbino *et al.* (2014), preparado para mantener condiciones de aerotolerancia. Se hirvió el medio de cultivo, se burbujeó 10 min con nitrógeno para enfriamiento y se pasó un volumen de 9 mL por tubo de cultivo, sellando con tapas de caucho. Posteriormente, el medio se purgó con nitrógeno, previo a ser inoculado con 1 mL de muestra, utilizando una jeringa previamente purgada

con nitrógeno. Los cultivos se incubaron por 48 h a 37 °C, sin agitación. Se prepararon diluciones seriadas de los cultivos hasta diez en NaCl 0,85 % y estas se sembraron en MRS½ agar (1,7 %) con presencia de indicador de pH (púrpura de bromocresol 0,017 %) (Bhakta *et al.*, 2012) y para cada metal se adicionó 1,0 mg/L de Cd(II) ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) o 0,1 mg/L de As(III) (NaAsO_2). Después de 48 h de incubación a 37 °C, se seleccionaron las colonias que mostraron la aparición de un halo amarillo característico que indica un cambio de pH en el medio de color púrpura.

Selección por morfología

Se realizó tinción de Gram y observación por microscopía óptica de las colonias aisladas. Las que presentaron morfología de bacilos Gram positivos se seleccionaron para posteriores ensayos.

Pruebas de catalasa y oxidasa

Para confirmar la presencia de actividad catalasa se colocó una colonia de cada aislado, crecido por 48 h en MRS½, en contacto con una gota de peróxido de hidrógeno comercial (4 % v/v). El peróxido de hidrógeno en presencia de catalasa reacciona produciendo agua y oxígeno, el cual se evidencia mediante la formación de burbujas (Reiner, 2010). La ausencia de esta reacción indicó microorganismos sin actividad catalasa, característica de *Lactobacillus* spp. Se utilizaron, respectivamente, como controles positivo y negativo, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Lactobacillus plantarum* JCM1055 (Bhakta *et al.*, 2012). Para detectar actividad oxidasa, se utilizaron tiras Bactident® Oxidase (OXOID), que tienen 1-naftol y dimetilparafenileno amina, la cual, en presencia de citocromo oxidasa, reacciona para formar azul de indofenol (Nachlas *et al.*, 1958). Se emplearon como controles positivo y negativo las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Escherichia coli* ATCC 8739, respectivamente. La ausencia de un cambio de coloración en la cinta permitió identificar microorganismos sin actividad oxidasa, entre los cuales se encuentra el grupo *Lactobacillus* spp. (Bratcher, 2018).

Preservación

Los aislados catalasa y oxidasa negativos se preservaron a -80 °C en crioviales con MRS½ suplementado con 20 % (v/v) de glicerol. Después de seis meses y un año de preservación se revisó su viabilidad siguiendo protocolos establecidos (Stephen, 1995).

Microorganismos de referencia

Se utilizaron las cepas *Lactobacillus plantarum* JCM 1055, *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136 y *Lactobacillus kefir* JCM 5818, de la Colección Japonesa de Microorganismos (JCM),

como referencia en los ensayos de tolerancia a la acidez y la salinidad.

Identificación molecular

Se realizó la extracción y purificación de ADN genómico de los aislados seleccionados mediante un método enzimático previamente establecido (Montaño-Salazar *et al.*, 2018). Una vez rectificada la pureza del ADN genómico extraído (NanoDrop 2000c, ThermoScientific), se amplificó la región V4-V5 del gen 16S rRNA con los iniciadores Com1 y 909R (Dohrmann *et al.*, 2004) para realizar un análisis por *Single-Stranded Conformational Polymorphism* (SSCP), para lo cual se emplearon los procedimientos establecidos previamente (Montaño-Salazar *et al.*, 2018). El desplazamiento de las bandas permitió establecer el perfil característico de cada cepa de acuerdo a la secuencia de dicha región; los aislados que presentaron perfiles electroforéticos idénticos se agruparon (Tabla 2). Se seleccionó un aislado de cada grupo y se identificó por técnicas moleculares. Para esto, se realizó la amplificación del gen 16S rRNA completo con los iniciadores 27F y 1492R (Weisburg *et al.*, 1991); esta región se secuenció mediante el servicio comercial suministrado por MacroGen® (Corea del Sur). Posteriormente, las secuencias se analizaron en el programa GENEIOUS (versión 11.1) y se compararon con el programa BLASTn en la base de datos GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los aislados seleccionados en los ensayos descritos a continuación se depositaron en la Colección de Microorganismos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia - sede Bogotá (IBUN) con los códigos IBUN-090-03775 a IBUN-090-03813.

Ensayos de resistencia a Cd(II) y As(III)

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de Cd(II) y As(III) de los aislados criopreservados. Para esto, a partir de crioviales se cultivaron y se ajustaron los inóculos para el ensayo a 0,5 unidades de absorbancia 600 nm (OD_{600}). Posteriormente, se cultivaron en MRS½ suplementado con Cd(II) ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) o As(III) (NaAsO_2) en 8 concentraciones diferentes dentro del rango de 0 a 300 mg/L, en placas de 96 pozos, con un pH inicial de 5,6 y se incubaron por 48 h, a 37 °C y 180 rpm. Se determinó la OD_{600} con un lector espectrofotométrico de placas de Elisa (Bio-Rad/ ELISA iMark™) (Bhakta *et al.*, 2012). Los aislados que presentaron el mayor crecimiento a las concentraciones más altas de los elementos evaluados se consideraron los más tolerantes y se seleccionaron para ensayos posteriores.

Ensayos de tolerancia a acidez

Con el fin de evaluar la capacidad de tolerar las condiciones ácidas de los aislados más resistentes a Cd(II) y As(III), se evaluó su viabilidad antes y después de

permanecer en contacto con un medio sintético que simula las condiciones ácidas del sistema digestivo humano. Para esto, se centrifugó (13 000 g, cinco min) un cultivo líquido de 48 h a 37 °C en MRS½ de cada aislado, con una OD₆₀₀ de 0,5 para obtener un pellet de biomasa que se resuspendió en 1 mL de buffer fosfato salino (PBS), ajustado a pH 2,5 con HCl 5 M. Se incubó a 37 °C por dos h y se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL); para esto se prepararon diluciones seriadas de los cultivos hasta 10⁻⁷ y se sembraron en medio agar MRS½, a 37 °C por 48 h. Se realizó el conteo de colonias para cada dilución y se determinó la relación de UFC/mL antes y después del tratamiento con condiciones ácidas. Se determinó la relación de viabilidad, antes y después de colocar las células en contacto con el buffer en condiciones ácidas, de acuerdo a la Ecuación 1. Se seleccionaron los aislamientos que presentaron un valor mayor de esta relación (Bhakta *et al.*, 2012).

$$\text{Relación de viabilidad} = \frac{\text{UFC / mL finales}}{\text{UFC / mL iniciales}} \quad (\text{Ec.1})$$

Ensayos de tolerancia a sales biliares

Los aislados que mostraron mayor tolerancia a la acidez se cultivaron 48 h a 37 °C en MRS½ hasta OD₆₀₀ de 0,5. A partir del cultivo se prepararon diluciones seriadas hasta 10⁻⁷, se sembraron en agar MRS½ sin y con sales biliares en concentraciones de 1, 2 y 4 g/L y se incubaron por 48 h a 37 °C. Los aislados que al final del ensayo mostraron un número de UFC/mL más alto a una mayor concentración de sales biliares se seleccionaron como los más tolerantes a condiciones de salinidad (Bhakta *et al.*, 2012).

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de *Lactobacillus* spp. aislados a partir de fermento de cacao

La Tabla 1 resume el número de aislados recuperados a partir de las muestras de grano de cacao con diferentes tiempos de fermentación, seleccionados en MRS½ suplementado con Cd(II) o As(III) y con purpura de bromocresol. El halo presente alrededor de las colonias generado por el cambio de pH producido por la fermentación de los azúcares presentes, permitió seleccionar 175 colonias que presentaron este metabolismo. Se eligieron el 52 %, el 31 % y el 17 % de muestras colectadas en los tiempos 48, 72 y 120 h, respectivamente (Tabla 1). El número de aislados se redujo a 49 por selección morfológica, restringiendo la selección a bacilos Gram-positivos. Posteriormente, los ensayos con resultado negativo para actividades catalasa

Tabla 1. Número de colonias resistentes a Cd(II) o As(III) recuperadas de fermento de cacao, con diferentes tiempos de fermentación, de acuerdo a cambio de color en medio agar MRS½.

Características de resistencia	Número de aislados recuperados			Total
	Tiempo de fermentación (h)			
	48	72	120	
Bacterias resistentes a As(III) (0,1 ppm)	56	19	17	92
Bacterias resistentes a Cd(II) (1,0 ppm)	36	33	14	83

y oxidasa permitieron escoger los aislados para uso en las siguientes pruebas, los cuales se criopreservaron a -80 °C y se reactivaron para verificar su viabilidad. En esta etapa no se tomaron en cuenta los aislados con baja viabilidad después de la criopreservación.

De acuerdo con los criterios de morfología, de actividades catalasa y oxidasa y de viabilidad después de su criopreservación, se seleccionaron finalmente 36 aislados, los cuales se identificaron molecularmente. El análisis de perfiles electroforéticos con la técnica SSCP dio como resultado la amplificación, secuenciación y análisis bioinformático de 22 microorganismos, a los cuales se les asignó la clasificación taxonómica asociada a dichos perfiles electroforéticos (Tabla 2). Los resultados indican que, con la metodología de aislamiento y selección utilizada, el 97,5 % de las bacterias aisladas correspondieron al género *Lactobacillus*. Entre las especies más predominantes se encontraron *L. plantarum* y *L. brevis*. El análisis filogenético de las secuencias obtenidas, junto con secuencias reportadas para microorganismos de referencia reportados en las bases de datos, mostró una gran cercanía evolutiva entre las mismas (Fig. 1).

Ensayos de resistencia a Cd(II) y As(III)

Como se observa en la Figura 2, las bacterias evaluadas se clasificaron en grupos de acuerdo a su crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de Cd(II) y As(III). La mayoría presentaron una CMI entre 10 y 50 mg/L para Cd(II) y de más de 300 mg/L para As(III) (Fig. 2). Todos los microorganismos toleraron concentraciones de As(III) superiores a 100 mg/L, mientras que para Cd(II) toleraron concentraciones inferiores a 50 mg/L. De acuerdo con la resistencia a los elementos tóxicos, se seleccionaron las cepas *L. plantarum* JCM 1055, A15, A19, A23, A26, A29, C9, C16, *L. kefir* JCM 5818, *L. rhamnosus* JCM 1136 y *L. paracasei* A17 para los siguientes ensayos.

Ensayos de tolerancia a la acidez

Los microorganismos más resistentes a Cd(II) y As(III) que presentaron mayor viabilidad después del tratamiento ácido (pH 2,5) fueron *L. plantarum* JCM 1055, *L. plantarum*

Tabla 2. Identificación molecular de bacterias aisladas de fermento de cacao.

Código aislado	Nombre del microorganismo con secuencia de mayor % similaridad	% Similaridad*	Código de acceso GenBank	Código del perfil SSCP	Aislados con perfil SSCP similar	Tiempo de fermentación
A4	<i>Lactobacillus brevis</i>	99%	MN704576	M	A4	48 h
A5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	MN704577	N	A5	48 h
A6	<i>Lactobacillus fermentum</i>	100%	MN704578	L	A6	48 h
A10	<i>Lactobacillus brevis</i>	100%	MN704579	P	A10	48 h
A11	<i>Lactobacillus brevis</i>	100%	MN704580	H	A11	48 h
					A18	48 h
					C3	48 h
A12	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99%	MN704581	K	A12	48 h
A13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	MN704582	Q	A13	48 h
A16	<i>Lactobacillus fermentum</i>	100%	MN704583	J	A16	48 h
A17	<i>Lactobacillus paracasei</i>	100%	MN704584	I	A17	48 h
A19	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	MN704585	G	A15	48 h
					A19	48 h
					A20	72 h
					A21	48 h
					A24	72 h
					A26	72 h
					A3	48 h
					A23	72 h
					A25	72 h
					A27	72 h
					A28	72 h
A29	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	MN704586	B	A29	72 h
					A30	72 h
					A31	72 h
					C9	48 h
					C12	72 h
					C14	72 h
C1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	MN704587	R	C1	48 h
C8	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100%	MN704588	S	C8	48 h
C11	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98%	MN704589	T	C11	72 h
C16	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	MN704590	X	C15	72 h
					C16	72 h
C18	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	99%	MN704591	U	C18	120 h
C20	<i>Lactobacillus brevis</i>	100%	MN704592	W	C20	48 h

Los códigos de acceso de GenBank para el gen 16S rRNA y el código del perfil SSCP se muestra para cada aislado, el cual se determinó de acuerdo a la metodología descrita. Las bacterias aisladas en medios suplementados con As(III) se identifican con letra A mientras que los aislados en medios suplementados con Cd(II) se identifican con la letra C, en su código.

*Los porcentajes de similaridad para secuencias desconocidas fueron determinados por BLASTn en comparación con secuencias presentes en GenBank.

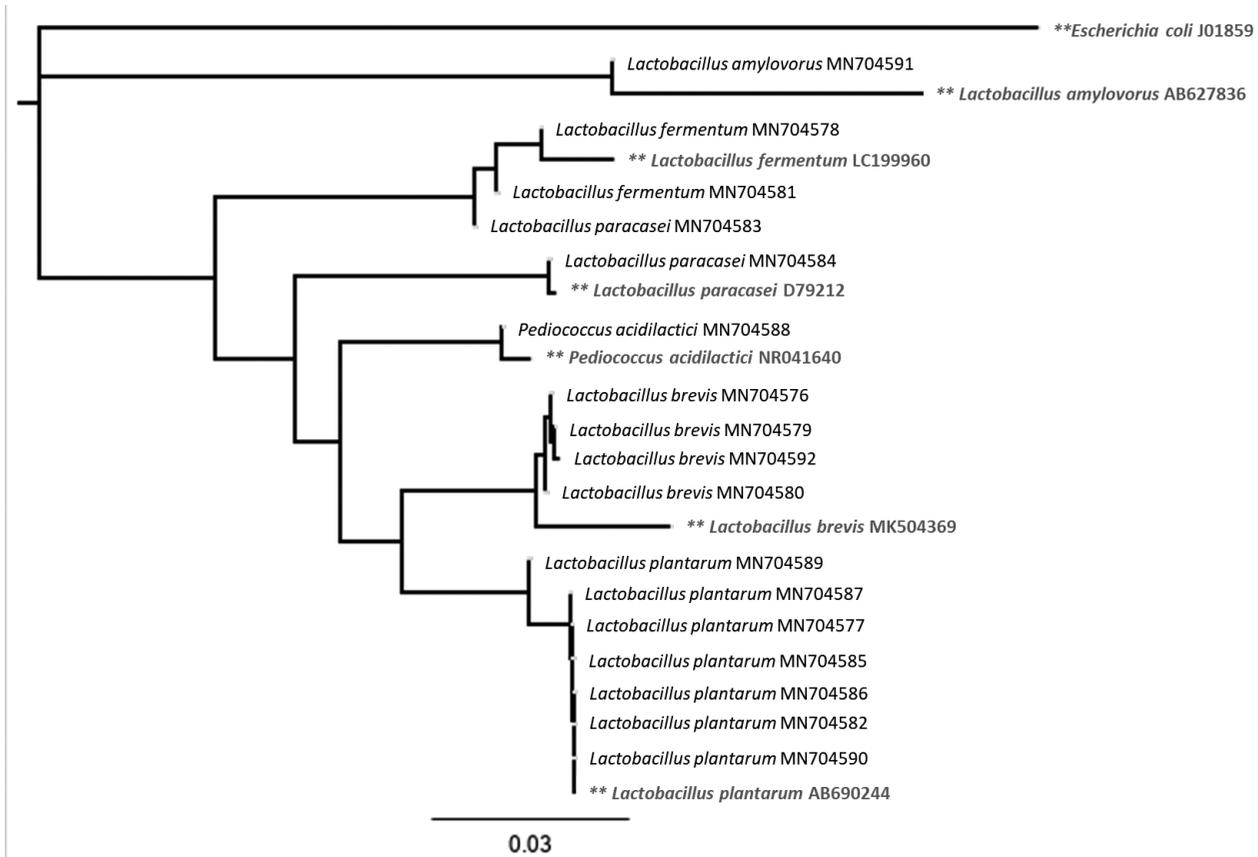


Figura 1. Análisis filogenético basado en las secuencias del gen 16S rDNA de 17 bacterias ácido lácticas aisladas a partir de fermento de cacao, representantes de los perfiles SSCP electroforéticos identificados. Las cepas están identificadas con los respectivos códigos de acceso de GenBank mostrados en la Tabla 2. Los nombres marcados con ** representan las secuencias de las cepas referencia reportadas en GenBank. La secuencia de la cepa *E. coli* J01859 fue usada como outgroup para el análisis. El árbol fue construido usando el método Neighbor-Joining method y las distancias fueron estimadas usando el modelo Kimura 2-parameter, en el programa GENEIOUS.

A19, *L. plantarum* A26 y *L. plantarum* C16 (Fig. 3). Estos se evaluaron en los ensayos de tolerancia a sales biliares.

Ensayos de tolerancia a sales biliares

Los ensayos de tolerancia a diferentes concentraciones de sales biliares mostraron que todos los microorganismos evaluados presentaron crecimiento hasta 4 g/L (Fig. 4).

DISCUSIÓN

En esta investigación se aislaron y caracterizaron BAL, principalmente *Lactobacillus* spp., a partir de fermento de cacao. El uso de un medio del cultivo con presencia del indicador púrpura de bromocresol permitió seleccionar los aislados con capacidad de producir metabolitos ácidos, provenientes de la fermentación de azúcares sencillos presentes en el medio de cultivo, entre los cuales se encuentran los lactobacilos (De Vuyst *et al.*, 2010). La presencia de BAL durante las primeras horas del proceso de fermentación de cacao se debe a la mayor producción de azúcares sencillos, que son su principal fuente de carbono

(De Vuyst *et al.*, 2010); de esta manera, crecen en paralelo con las levaduras y asimilan ácido cítrico de la pulpa fresca (De Vuyst y Weckx, 2016). Se ha reportado la presencia de BAL heterofermentativas, las cuales producen ácido láctico, etanol, ácido acético y CO₂, además de la producción de manitol, que es el causante de los sabores dulces en el grano seco (Papalexandratou *et al.*, 2019). Adicionalmente, a las BAL también se les atribuye la prevención del crecimiento de microorganismos patógenos en el fermento, lo que incrementa la higiene del proceso debido a la producción de metabolitos ácidos que juegan el papel de agente inhibidor (Fahrurrozi *et al.*, 2019).

Dentro del grupo de las BAL se encuentra la familia *Lactobacillaceae*, conformada por los géneros *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* y *Pediococcus*, los cuales se consideran citocromo oxidasa-negativos, y en algunos casos catalasa-negativos. Recientemente se ha publicado la capacidad de algunas cepas de BAL para descomponer el peróxido mediante el uso de catalasas o pseudocatalasas (De Vos *et al.*, 2009). A pesar de esto, en este estudio se seleccionaron solamente las bacterias catalasa-negativas, con el fin de aumentar la probabilidad de aislar *Lactobacillus* spp.

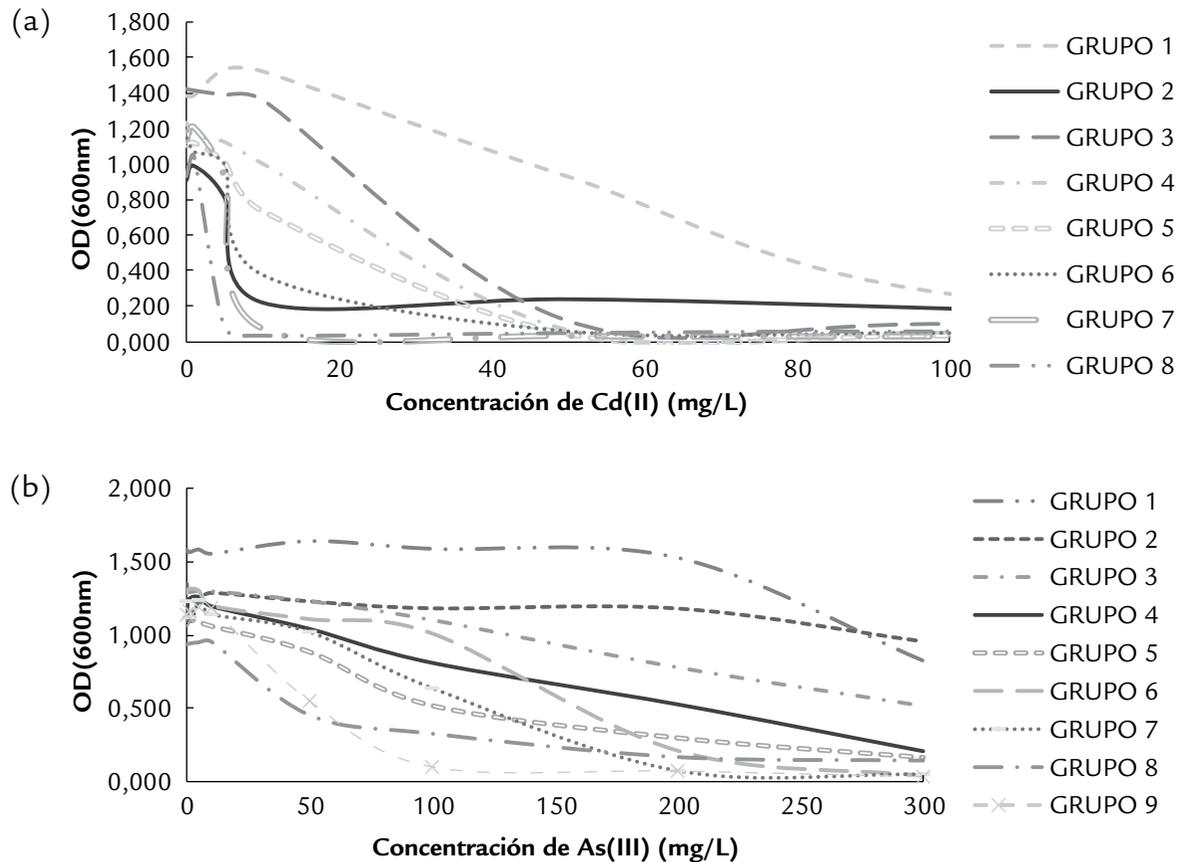


Figura 2. Crecimiento de cepas de trabajo en los medios de cultivo MRS_{1/2} suplementados con diferentes concentraciones de (a) Cd(II) (0 a 100 mg/L) o (b) As(III) (0 a 300 mg/L). Las bacterias fueron agrupadas de acuerdo a la similitud de comportamiento de las curvas de OD(595nm) vs concentración de metal(oide) en los siguientes grupos: (a) para Cd(II): G1: JCM 1136; G2: JCM 1055, JCM 5818, C16, A15, A23, A29; G3: C3, C9, C11, C14, C15, C18, A5, A13, A19, A20; G4: A4, A10, A21, A24, A26, A30; G5: A11, A25, A27, A28; G6: C1, C12, A3, A6, A12, A17, A18, A31; G8: C20, A1, A14; (b) para As(III): G1: JCM 1055, JCM 5818; G2: A17; G3: C9, A15, A19, A20, A26, A29; G4: C1, C18, A3, A5, A23, A25; G5: C16, A1, A6, A11, A18, A27, A28, A30, A31; G6: JCM 1136, A13, A24; G7: C11, C15, A12, A14, A21; G8: C12, C14, C20, A10; G9: C3, A4.

Durante el desarrollo de la investigación se encontró que parte de los microorganismos seleccionados perdieron viabilidad posterior a la criopreservación, lo que sugiere que no todos presentan resistencia a las condiciones de almacenamiento de -80 °C utilizando glicerol como criopreservante. Resultados similares fueron registrados por Chou y Weimer (1999), quienes consideran la tolerancia a condiciones de preservación fundamental para la selección de posibles probióticos. Un procedimiento recomendado por otros autores es la liofilización (Kocha *et al.*, 2008).

El análisis SSCP permite distinguir variaciones genéticas características entre especies (Brandão *et al.*, 2002). De acuerdo a esta diferenciación se pueden seleccionar los perfiles electroforéticos únicos y así realizar la identificación de aislados con el mismo perfil mediante la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA de un microorganismo con un perfil específico. Se asocia la identidad de las cepas analizadas con otras cepas caracterizadas con el mismo perfil y de esta manera se asigna la clasificación taxonómica para la totalidad de los aislados (Dohrmann *et al.*, 2004).

Como se evidencia en los resultados (Tabla 2; Fig. 1), la mayor parte de las cepas aisladas del fermento de cacao se asoció con la especie *Lactobacillus plantarum*. Esta especie se ha reportado como una de las más dominantes del género *Lactobacillus* en procesos de fermentación de Brasil, Nigeria, Ghana, República Dominicana y Bolivia (Serra *et al.*, 2019). Otros microorganismos recuperados de esta matriz fueron *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. amylovorus*, *L. paracasei* y *Pediococcus acidilactici*, cuya presencia en procesos de fermentación ya se había reportado en Brasil y República Dominicana (Grumezescu y Holban, 2019).

En un estudio de metagenómica publicado recientemente por Serra *et al.* (2019), se evaluaron muestras de grano de cacao durante el proceso de fermentación colectadas en la amazonia brasilera (estados de Pará y Bahía), donde se encontró que los consorcios presentes a lo largo de este proceso se componen principalmente de levaduras (*Pichia* y *Candida*), hongos filamentosos (*Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*), bacterias ácido lácticas (*Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*), bacterias ácido acéticas (*Acetobacter* y

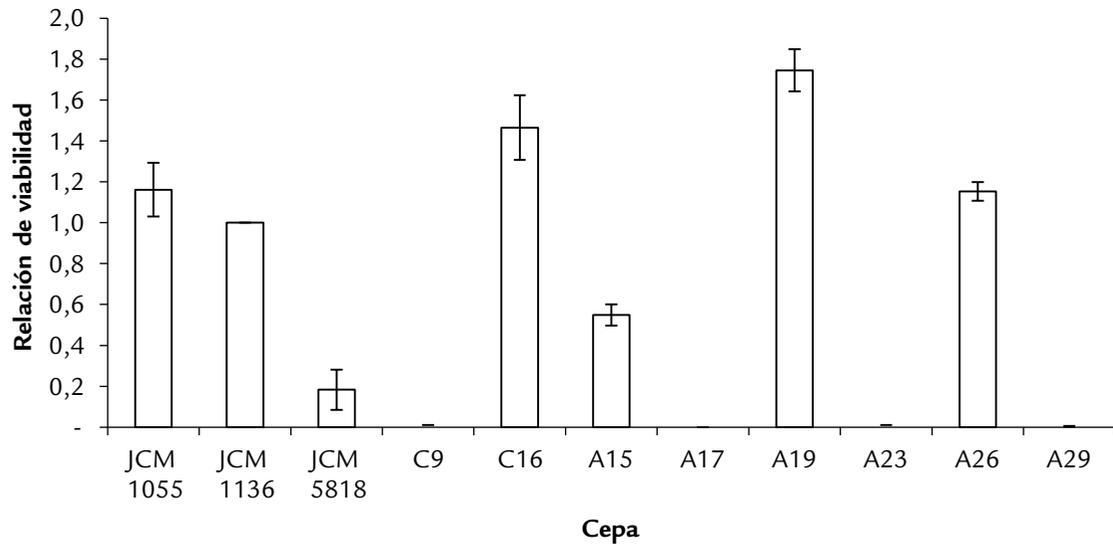


Figura 3. Relación de viabilidad de bacterias antes y después del contacto por 2 h con buffer PBS ácido (pH 2,5) en ensayo de tolerancia a condiciones de acidez de *Lactobacillus* spp. aislados de fermento de cacao y cepas de referencia. Desviación estándar (n=3). Las siglas del eje X corresponden a los códigos establecidos en la Tabla 2.

Gluconobacter), enterobacterias y bacilos. Aunque la mayor parte de los géneros presentes en los granos de cacao fermentado son reportados en el mismo tipo de matriz de diferentes continentes, algunas especies sólo están presentes en las muestras regionales y se cree que pueden ser responsables de las características sensoriales específicas para el cacao de cada zona (Serra *et al.*, 2019). En una publicación de Papalexandratou *et al.* (2019), se concluyó que las distintas características sensoriales se deben, además, a la diferencia en la genética de las variedades de cacao y al manejo post cosecha (condiciones ambientales). Papalexandratou *et al.* (2019) indican que la presencia de algunos taxones específicos favorece la presencia de características organolépticas particulares.

No se conocen reportes del aislamiento de *Lactobacillus* spp. resistentes a Cd o As a partir de fermento de cacao. Se ha reportado previamente la presencia de Cd en cacao y su dinámica en el proceso de fermentación del grano, el cual está relacionada con la presencia de microorganismos (Vanderschueren *et al.*, 2020). Por otro lado, no hay estudios sobre concentraciones altas de As en muestras de cacao, aunque se conoce que los microorganismos que hacen parte del proceso de fermentación provienen de fuentes ambientales (Serra *et al.*, 2019), las cuales pueden contener genes de resistencia a Cd(II) y/o As(III). Por ejemplo, Evanovich *et al.* (2019) hallaron la presencia de los genes *arsC* y *arsR* en el genoma de una cepa de *Lactobacillus plantarum*. Se han encontrado también genes de resistencia a Cd y As en plásmidos extraídos a partir de la *Lactobacillus* spp. (van Kranenburg *et al.*, 2005).

Al evaluar la capacidad de tolerar Cd(II) y As(III) de los aislados de fermento de cacao, se obtuvieron resultados similares a los descritos por Monachese (2012). Se observó

la disminución del crecimiento de los *Lactobacillus* spp. en contacto con Cd(II) o As(III), con un comportamiento diferente entre las cepas (Fig. 2). Se encontró que para todos los aislados la CMI con Cd(II) fue menor que con As(III), lo cual se debe a que el comportamiento de Cd y As con el pH es diferente. El Cd(II) se presenta como un catión que puede interactuar con las cargas negativas de la membrana celular de las bacterias (Halttunen *et al.*, 2007a), mientras que el As(III) ocurre en su forma de H_3AsO_3 con carga neutra, por lo que su interacción es menor (Halttunen *et al.*, 2007b). Los mecanismos de resistencia de estas bacterias en presencia de Cd(II) son, por ejemplo, la activación de mecanismos de conservación de energía (los cuales consisten en la alteración de las rutas metabólicas) y la producción de moléculas que aumentan la hidrofobicidad de la pared celular y de proteínas de membrana (Zhai *et al.*, 2017) o proteínas de superficie (capa S) (Gerbinio *et al.*, 2011) capaces de capturar el Cd(II). En cuanto al As en su forma trivalente (As(III)), puede ser transformado químicamente mediante reacciones de metilación, e incluso puede cambiar su estado de oxidación. El As(III) interacciona con las proteínas (con grupos tiol) cambiando su estructura e inhibiendo su función (Shen *et al.*, 2013). El As(III) puede ingresar a las bacterias mediante proteínas transportadoras de membrana llamadas acuagliceroporinas (Shen *et al.*, 2013), las cuales se encuentran presentes en el género *Lactobacillus* spp. (Bienert *et al.*, 2013).

Finalmente, la evaluación de la capacidad de los microorganismos con mayor CMI de Cd(II) y As(III) para tolerar condiciones de acidez, permitió seleccionar la cepa tipo *L. plantarum* JCM 1055 y los aislados *L. plantarum* A19, A26 y C16, que presentaron mayor valor de relación de viabilidad después de estar expuestos a un pH ácido (Fig. 3), lo cual

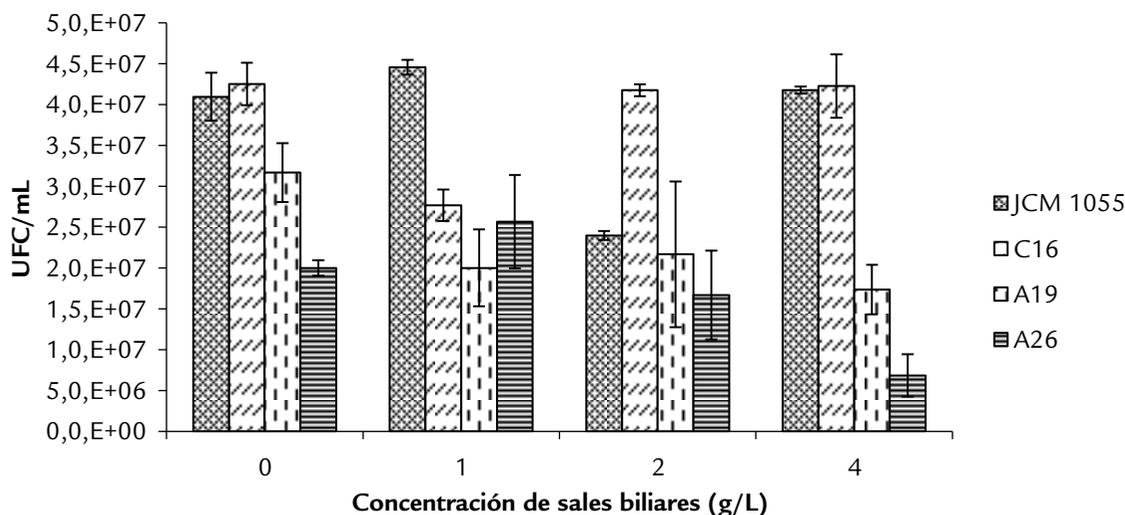


Figura 4. Crecimiento (UFC/mL) de *Lactobacillus* spp. aislados de fermento de cacao y cepa de referencia, en medio MRS_{1/2} suplementado con diferentes concentraciones de sales biliares en ensayo de tolerancia a condiciones de salinidad, por 48 h a 37 °C. Desviación estándar (n=3). Las siglas de las etiquetas internas corresponden a los códigos establecidos en la Tabla 2.

se debe a mecanismos de tolerancia característicos de estas bacterias. Previamente se reportó que estos mecanismos están relacionados con la producción de metabolitos para mantener condiciones estables a nivel celular y con la protección y reparación macromolecular, entre otros (De Angelis *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2015). Las cepas de *L. plantarum* seleccionadas por su tolerancia a condiciones de acidez también fueron tolerantes a concentraciones hasta de 4 g/L de sales biliares (Fig. 4). Las condiciones de acidez en el estómago y la presencia de componentes del intestino, como las sales biliares, tienen influencia en la selección de los probióticos que permanecen en el sistema gastrointestinal de los animales. La habilidad de las cepas de *L. plantarum* seleccionadas para tolerar estas condiciones de acidez y de altas concentraciones de sales biliares, dan indicios de su potencial para uso futuro como probióticos. Además, debido a su resistencia a Cd(II) y As(III), se puede evaluar su capacidad de absorber estos elementos tóxicos para una futura aplicación en la detoxificación del sistema digestivo humano. Es decir, es posible que al ser consumidas disminuyan la biodisponibilidad de los elementos tóxicos y eviten su acumulación (Kumar *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES

Mediante la metodología utilizada fue posible aislar y caracterizar 36 BAL del género *Lactobacillus* a partir de cacao fermentado en el departamento de Caldas, Colombia. Se seleccionaron bacterias productoras de metabolitos ácidos y resistentes a Cd(II) o As(III) en medios de cultivo selectivos MRS_{1/2}, con morfología de bacilos Gram-positivo y actividad catalasa y oxidasa negativa. Se confirmó su identidad mediante la secuenciación del gen 16S rRNA y

se encontró predominantemente las especies *L. plantarum* y *L. brevis*. Estos *Lactobacillus* spp. podrían tener potencial de detoxificación de Cd(II) y As(III), ya que la CMI para estos elementos fue de 10 mg/L y >300 mg/L, respectivamente. Las cepas *Lactobacillus plantarum* JCM 1055, A19, A26 y C16, las cuales presentaron las más altas CMI para Cd(II) y As(III), también toleraron condiciones de acidez (pH 2,5) y alta concentración de sales biliares (4 g/L), similares a las del sistema digestivo humano. Estos microorganismos presentan gran potencial para aplicaciones biotecnológicas relacionadas con la mitigación de Cd(II) y As(III).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia, especialmente a la División de Investigación Sede Bogotá (DIB), por el soporte financiero con el proyecto código 37643 de la Convocatoria Nacional de Proyectos para el Fortalecimiento de la Investigación, Creación e Innovación de la Universidad Nacional de Colombia 2016-2018 – Modalidad Única. Al Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia por permitir la recolección de las muestras relacionadas en el Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 121 del 22 de enero de 2016 – Otrosí No. 5, de acuerdo con la resolución no. 0699 del 26 de abril del 2018. A Casa Luker por permitir el acceso a las muestras de fermento de cacao utilizadas para los aislamientos. A Edison Rodríguez por su apoyo durante los aislamientos. Al Grupo de Investigación en Tecnología de Productos Naturales – TECPRONA del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, por el acceso a las cepas de referencia utilizadas en los ensayos de catalasa y oxidasa.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Alonso DL, Latorre S, Castillo E, Brandão PFB. Environmental occurrence of arsenic in Colombia: A review. *Environ Pollut*. 2014;186(1):272-281. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.12.009>
- Arias VA, Rodríguez AR, Bardos P, Naidu R. Contaminated land in Colombia: A critical review of current status and future approach for the management of contaminated sites. *Sci Total Environ*. 2018;618(1):199-209. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.245>
- Bienert GP, Desguin B, Chaumont F, Hols P. Channel-mediated lactic acid transport: a novel function for aquaglyceroporins in bacteria. *Biochem J*. 2013;454(3):559-570. Doi: <https://doi.org/10.1042/BJ20130388>
- Bratcher DF. Other Gram-Positive Bacilli. Long SS, Prober CG, Fischer M. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. Elsevier. 2018;5(1):786-790. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00133-X>
- Bhakta JN, Ohnishi K, Munekage Y, Iwasaki K. Isolation and probiotic characterization of arsenic-resistant lactic acid bacteria for uptaking arsenic. *Int J Bioeng Life Sci*. 2010;4(11):831-838. Doi: <http://doi.org/10.5281/zenodo.1083023>
- Bhakta JN, Ohnishi K, Munekage Y, Iwasaki K, Wei MQ. Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. *J Appl Microbiol*. 2012;112(6):1193-1206. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05284.x>
- Brandão PFB, Torimura M, Kurane R, Bull AT. Dereplication for biotechnology screening: PyMS analysis and PCR-RFLP-SSCP (PRS) profiling of 16S rRNA genes of marine and terrestrial actinomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002;58(1):778. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0855-x>
- Chou LS, Weimer B. Isolation and characterization of acid and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci*. 1999;82(1):23-31. Doi: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75204-5](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75204-5)
- Das S, Dash HR. Handbook of metal-microbe interactions and bioremediation. Boca Raton: Taylor & Francis; 2017. 837 p. Doi: <https://doi.org/10.1201/9781315153353>
- Das SC, Al-Naemi HA. Cadmium toxicity: oxidative stress, inflammation and tissue injury. *ODEM*. 2019;7(4):144-163. Doi: <https://doi.org/10.4236/odem.2019.74012>
- De Angelis M, Bini L, Pallini V, Cocconcelli P, Gobbetti G. The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Microbiol*. 2001;147(1):1863-1873. Doi: <https://doi.org/10.1099/00221287-147-7-1863>
- De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey F, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 3. The Firmicutes. New Delhi: Springer-Verlag; 2009. p. 465-466. Doi: <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5>
- De Vuyst L, Lefeber T, Papalexandratou Z, Camu N. The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. En: *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*. United Kingdom: Wiley-Blackwell; 2010. p. 301-325. Doi: <https://doi.org/10.1002/9780813820866.ch17>
- De Vuyst L, Weckx S. The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *J Appl Microbiol*. 2016;121(1):5-17. Doi: <https://doi.org/10.1111/jam.13045>
- Dohrmann AB, Tebbe CC, Kowalchuk GA, De Bruijn FJ, Head IM, Akkermans ADL, et al. Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). En: *Molecular Microbial Ecology Manual*. Volumes 1 and 2. Netherlands: Springer; 2004. p 809-838. Doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2177-0_316
- Evanovich E, Mattos PJSM, Guerreiro JF. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus plantarum*: an overview. *Int J Genomics*. 2019;1(1):1-11. Doi: <https://doi.org/10.1155/2019/4973214>
- Fahrurrozi, Rahayu EP, Nugroho IB, Lisdiyanti P. Lactic acid bacteria (LAB) isolated from fermented cocoa beans prevent the growth of model food-contaminating bacteria. *AIP Conf Proc*. 2019; 2099(1):1-6. Doi: <https://doi.org/10.1063/1.5098410>
- Gerbino E, Carasi P, Tymczyszyn EE, Gómez-Zavaglia A. Removal of cadmium by *Lactobacillus kefir* as a protective tool against toxicity. *J Dairy Res*. 2014;81(3):280-287. Doi: <https://doi.org/10.1017/S0022029914000314>
- Gerbino E, Mobili P, Tymczyszyn E, Fausto R, Gómez-Zavaglia A. FTIR spectroscopy structural analysis of the interaction between *Lactobacillus kefir* S-layers and metal ions. *J Mol Struct*. 2011;987(1-3):186-192. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2010.12.012>
- Grumezescu A, Holban AM. Caffeinated and cocoa based beverages. 1st Edition. En: *The Science of Beverages*. India: Woodhead publishing; 2019. p. 423-446.
- Halttunen T, Salminen S, Tahvonen R. Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2007a;14(1):30-35. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.040>
- Halttunen T, Finell M, Salminen S. Arsenic removal by native and chemically modified lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2007b;120(1-2):173-178. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.002>
- Ibrahim F, Halttunen T, Tahvonen R, Salminen S. Probiotic bacteria as potential detoxification tools: assessing their heavy metal binding isotherms. *Can J Microbiol*. 2006;52(9):877-885. Doi: <https://doi.org/10.1139/W06-043>
- Kinoshita H, Sohma Y, Ohtake F, Ishida M, Kawai Y, Kitazawa H, et al. Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. *Res Microbiol*. 2013;164(7):701-709. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.04.004>

- Koch S, Eugster-Meier E, Oberson G, Meile L, Lacroix C. Effects of strains and growth conditions on autolytic activity and survival to freezing and lyophilization of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. lactis isolated from cheese Int Dairy J. 2008;18(2):187-196. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.07.009>
- Kumar N, Kumar V, Panwar R, Ram C. Efficacy of indigenous probiotic *Lactobacillus* strains to reduce cadmium bioaccessibility: An *in vitro* digestion model. Environ Sci Pollut Res. 2017;24(2):1241-1250. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7779-6>
- Liu Y, Tang H, Lin Z, Xu P. Mechanisms of acid tolerance in bacteria and prospects in biotechnology and bioremediation. Biotechnol Adv. 2015;33(7):1484-1492. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.06.001>
- Monachese MA. Sequestration of lead, cadmium and arsenic by *Lactobacillus* species and detoxication potential (Tesis de Maestría). Ontario: The School of Graduate and Postdoctoral Studies, 2012. p. 1-729.
- Montañó-Salazar SM, Lizarazo-Marriaga J, Brandão PFB. Isolation and potential biocementation of calcite precipitation inducing bacteria from Colombian buildings. Curr Microbiol. 2018;75(3):256-265. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1373-0>
- Nachlas MM, Crawford DT, Goldstein TP, Seligman AM. The histochemical demonstration of cytochrome oxidase with a new reagent for the NaDi reaction. J Histochem Cytochem. 1958;6(6):445-456. Doi: <https://doi.org/10.1177/6.6.445>
- Papalexandratou Z, Kaasik K, Villagra Kauffmann L, Skorstengaard A, Bouillon G, Leth Espensen J, *et al.* Linking cocoa varieties and microbial diversity of Nicaraguan fine cocoa bean fermentations and their impact on final cocoa quality appreciation. Int J Food Microbiol. 2019;304(1):106-118. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.012>
- Reiner K. Catalase test protocol. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 2010. p. 9.
- Saito VST, Dos Santos TF, Vinderola CG, Romano C, Nicoli JR, Araújo LS, *et al.* Viability and resistance of lactobacilli isolated from cocoa fermentation to simulated gastrointestinal digestive steps in soy yogurt. J Food Sci. 2014;79(2):208-213. Doi: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12326>
- Serra JL, Moura FG, Pereira GVM, Socol CR, Rogez H, Darnet S. Determination of the microbial community in Amazonian cocoa bean fermentation by Illumina-based metagenomic sequencing. LWT. 2019;106(1):229-239. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.038>
- Shen S, Li X, Cullen W, Weinfeld M, Le X. Arsenic Binding to Proteins. Chem Rev. 2013;113(10):7769-7792. Doi: <https://doi.org/10.1021/cr300015c>
- Singh AL, Sarma PN. Removal of arsenic(III) from waste water using *Lactobacillus acidophilus*. Bioremediat J. 2010;14(2):92-97. Doi: <https://doi.org/10.1080/10889861003767050>
- Spiro T, Stigliani W. Química Medioambiental. Segunda edición. Madrid: Pearson; 2007. 500 p.
- Stephen F. Freeze-Drying and Cryopreservation of Bacteria. En: Day JG, Pennington MW, editores. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology. Totowa, New York: Humana Press; 1995. p.
- Sun Z, Harris HMB, McCann A, Guo C, Argimón S, Yang X, *et al.* Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. Nat Commun. 2015;6(1):8322. Doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms9322>
- van Kranenburg K, Golic N, Bongers R, Leer RJ, De Vos WM, Siezen RJ, *et al.* Functional Analysis of Three Plasmids from *Lactobacillus plantarum*. Appl Environ Microbiol. 2005;71(3):1223-1230. Doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1223-1230.2005>
- Vanderschueren R, De Mesmaeker V, Mounicou S, Isaure MP, Doelsch E, Montalvo D, *et al.* The impact of fermentation on the distribution of cadmium in cacao beans. Food Res Int. 2020;127:108743. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108743>
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. J Bacteriol. 1991;173(2):697-703. Doi: <http://dx.doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Zhai Q, Wang G, Zhao J, Liu X, Tian F, Zhang, H, Chen W. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* ccfm8610 against acute cadmium toxicity in mice. Appl Environ Microbiol. 2013;79(5):1508-1515. Doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.03417-12>
- Zhai Q, Xiao Y, Zhao J, Tian F, Zhang H, Narbad A, Chen W. Identification of key proteins and pathways in cadmium tolerance of *Lactobacillus plantarum* strains by proteomic analysis. Sci Rep. 2017;7(1):1182. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01180-x>