



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Laboratorio Nacional en Salud: Diagnóstico Molecular y Efecto
Ambiental en Enfermedades Crónico-Degenerativas

Área de Espectrometría de Masas

Determinación de la inactivación de tricotecenos in
vitro mediante bacterias Gram positivas

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

P R E S E N T A

Josué Cruz Nonato



Asesor: Dr. Cesar Mateo Flores Ortíz

FES IZTACALA, UNAM.

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México, 2025



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi asesor el Dr. Cesar Flores por su paciencia, aportaciones y apoyo en guiar puntualmente este proyecto realizado en este par de años y por brindarme un panorama general de las actividades a realizar en el tema de micotoxinas.

Además, también quiero agradecer a mi comité revisor por sus observaciones y comentarios que en base a su conocimiento y experiencia del área en particular que conocen, contribuyeron en conjunto a la mejora de dicho trabajo y por la entera disposición de brindarme trabajar con cada uno de ustedes.

De igual forma, gracias a mis amigos y personas que conocí en el camino por las experiencias brindadas y recordar que no todo el tiempo es trabajo sino también un par de risas y pláticas también son importantes.

Finalmente, un enorme agradecimiento al ahora ya Dr. Fernando Garcia por su gran ayuda y asistencia en cada una de las fases de la elaboración del proyecto y las nuevas experiencias fuera del ámbito académico. Las risas no faltaron.

“Trabaja siempre, el cansancio es temporal, pero la satisfacción es para siempre”.

CONTENIDO

I.	Resumen	4
II.	Introducción	5
III.	Marco teórico	9
	Generalidades de micotoxinas	9
	Aspectos generales de tricotecenos	12
	Alternativas de manejo	15
	Generalidades de las bacterias ácido-lácticas	16
	Uso de bacterias ácido-lácticas para remoción de micotoxinas	21
	Género <i>Enterococcus</i>	23
	Género <i>Lactobacillus</i>	26
	Género <i>Bacillus</i>	29
IV.	Antecedentes	32
	Uso de BAL para disminución de micotoxinas	32
	Género <i>Enterococcus</i>	32
	Género <i>Lactobacillus</i>	33
	Género <i>Bacillus</i>	34
	Uso de microorganismos para disminución de tricotecenos	35
	Toxina T-2	35
	Neosolaniol (NEO)	36
	Toxina HT-2	37
V.	Justificación	39
VI.	Hipótesis	40
VII.	Objetivos	40
	Objetivo General	40
	Objetivos Particulares	40
VIII.	Material Y Métodos	41
IX.	Fase microbiológica	42
	Preparación de medios de cultivo (medio líquido y sólido)	42
	Obtención de bacterias	42
	Aislamiento y purificación de la cepa del género <i>Enterococcus</i>	43
	Conservación de cepas bacterianas	43
	Ubicación taxonómica de las cepas bacterianas	44
	Identificación morfológica	44
	Identificación bioquímica	46

Identificación molecular	46
X. Fase de tricotecenos.....	47
Cuantificación de tricotecenos	47
Ensayo de inactivación de tricotecenos.....	47
Extracción de tricotecenos del cultivo de bacterias	49
Análisis residual de tricotecenos	49
XI. Resultados	51
Fase microbiológica	51
Aislamiento, purificación e identificación de <i>Enterococcus</i>	51
Análisis morfológico mediante el uso microscopía electrónica de barrido.....	57
XII. Fase de tricotecenos.....	58
Identificación de los tricotecenos y cuantificación.....	58
Ensayo de disminución de tricotecenos	60
Baño a 37 °C.....	60
Estufa a 40 °C.....	60
Con agitación 24 h	61
Sin agitación 24 h.....	62
Medio 24 h.....	63
PBS 24 h	64
XIII. Discusión	67
Aislamiento e identificación de microorganismos.....	67
a) Género <i>Enterococcus</i>	67
b) Género <i>Bacillus</i>	69
c) Género <i>Lactobacillus</i>	70
Cuantificación de tricotecenos	70
Disminución de micotoxinas por bacterias (BAL)	71
Experimento 1 (37°C) y 2 (40°C):	71
Experimento 3 (agitación) y 4 (sin agitación):	72
Experimento 5 (medio de cultivo) y 6 (PBS):	73
XIV. Conclusión	80
XV. Referencias bibliográficas.....	81

I. Resumen

En el metabolismo secundario de los hongos se sintetizan las micotoxinas, existiendo múltiples tipos, entre las cuales destacan los tricotecenos como Neosolaniol (NEO), Toxina T2 (T-2) y Toxina HT2 (HT-2), la ingesta de estas causan daños a los seres vivos. Es por ello, que se buscan alternativas de manejo de materias primas contaminadas y se dividen en físicas, químicas y biológicas. Estas últimas destacan el uso de bacterias Gram-positivas, tanto del género *Bacillus* como las ácido lácticas (BAL), para mitigar la intoxicación por micotoxinas. Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la capacidad de inactivación de tricotecenos por bacterias Gram-positivas. El estudio se llevó a cabo en dos fases. Inicialmente, se aisló una cepa de la muestra “Biopro” y 2 cepas donadas por CCBIZTA, las cuales se identificaron mediante el análisis morfológico, pruebas bioquímicas y moleculares. En la segunda fase, se realizaron los ensayos de inactivación por la interacción de los tricotecenos con cada una de las bacterias a una concentración de $1\mu\text{g mL}^{-1}$. Las bacterias utilizadas en este trabajo corresponden a *Enterococcus faecium*, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Bacillus subtilis*. En los ensayos de inactivación por el consorcio bacteriano a 37°C con agitación, se observó una disminución a 18 h de NEO 68%, HT-2 45% y T-2 50%, en comparación con los ensayos a 1 h donde los resultados fueron NEO 58%, HT-2 35% y T-2 32 %. Adicionalmente, a 40°C sin agitación, se observó una inactivación a 1 h de NEO 63%, HT-2 58% y T-2 54% y a 18 h fueron para NEO 62%, HT-2 32% y T-2 37 %. Por otro lado, el ensayo de inactivación por *E. faecium* a 40°C a 24 h, la disminución con agitación fue de NEO 0%, HT-2 13% Y T-2 14%, en comparación al tratamiento sin agitación se registró una disminución de NEO 32%, HT-2 12% y T-2 9%. Con la cepa de *B. subtilis*, solo se determinó una disminución de NEO 0%, HT-2 12% y T-2 9% sin agitación. Mientras que la cepa de *E. faecium* mostró una disminución similar de NEO 0%, HT-2 7% y T-2 78%; en los estudios realizados con PBS fueron NEO 0%, HT-2 29% y 79%. Para la cepa de *B. subtilis*, en medio de cultivo fue de NEO 0%, HT-2 0% y T-2 74% comparándolo con los de PBS de NEO 0%, HT-2 21% y T-2 78%. Finalmente, para la cepa de *L. plantarum*, se obtuvieron los valores de NEO 0%, HT-2 30% y T-2 84% en medio de cultivo y en contraste con PBS fueron NEO 0%, HT-2 19% y T-2 77%. Finalmente, se concluye que las cepas de *E. faecium*, *B. subtilis* y *L. plantarum* son eficientes en la inactivación de T-2 y en menor medida HT-2 y solo el consorcio, presentó inactivación de NEO.

II. Introducción

Los hongos se clasifican en el reino Fungí, uno de los 7 reinos propuestos en la clasificación de Ruggiero *et al.*, (2015). Debido a que, tanto su morfología, sus ciclos de vida considerados complejos, su alta y amplia diversidad se dificulta dar una diagnosis característica precisa de los hongos. Sin embargo, de forma generalizada comparten características, tales como poseer estructura filamentosa, la quitina y celulosa componen su pared celular y carecen de clorofila (Aguirre *et al.*, 2014). Así mismo, en el reino fungí se incluyen las levaduras (células que se reproducen por gemación), los macromicetos (poseen cuerpo fructífero visible) y los micromicetos (poseen estructuras productoras de esporas) (Cepero de García *et al.*, 2012).

Los micromicetos presentan metabolitos secundarios que se caracterizan por poseer pesos moleculares bajos denominados micotoxinas (Solis, 2019). Éstas se generan cuando existen condiciones ambientales particulares y a pesar de que propiamente no son indispensables para el crecimiento del hongo, se sugiere que les ofrece ventajas ecológicas en algunos ambientes (Alassane *et al.*, 2017).

Se calcula que alrededor de 400 compuestos están catalogados como micotoxinas y se han reconocido como un riesgo debido a la frecuencia con la que se les encuentra como contaminante en alimentos (siendo estos la principal causa de intoxicación), por ejemplo, en productos alimenticios de origen vegetal (cereales como trigo, maíz, arroz, centeno, cebada, avena, entre otros) y sus afectaciones en la salud que pueden generar, las cuales pueden llegar a ser dañinas tanto para humanos como para animales cuando se exponen en leves dosis por amplios periodos de tiempo (dichos padecimientos son conocidos como micotoxicosis). No obstante, también es posible que existan intoxicaciones debido a productos derivados de origen animal (carne, leche y huevos), que parten del consumo de alimentos y forrajes igualmente contaminados por los animales (Gimeno y Ligia, 2011; Piotrowska, 2021; Wu *et al.*, 2023).

Los estudios que se han realizado en torno a las micotoxinas se han enfocado principalmente a un pequeño grupo, que debido a su capacidad toxigénica, destacan aflatoxinas (AF), ocratoxina A (OTA), micotoxinas del género *Fusarium* integradas por fumonisinas (FUM), tricotecenos como el deoxinivalenol (DON) y sus derivados, la toxina T-2, HT-2 y las zearalenonas (ZEN) (Darwish *et al.*, 2014). Adicionalmente, también resaltan la patulina (PAT), citrinina (CIT), toxinas del género *Alternaria*, como alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), ácido tenuazónico (TeA) y alcaloides del cornezuelo de centeno (alcaloides ergóticos) del género *Claviceps* (Piotrowska, 2021).

Dentro de la amplia variedad de micotoxinas, destaca el grupo de los tricotecenos, ya que se localizan con frecuencia en cereales que son consumidos por humanos o son destinados para especies animales utilizadas en la industria pecuaria generando así efectos perjudiciales gracias a su elevada citotoxicidad produciendo afectaciones gastrointestinales, dermatológicas, inmunológicas, etc. (Hussein y Brasel, 2001). Son producidos principalmente por el género *Fusarium* y debido a su estructura química se clasifican en 4 grandes grupos (A,B,C y D), no obstante los grupos que destacan son el A y B, ya que aquí se encuentran los tricotecenos de mayor ocurrencia y toxicidad en granos y semillas, entre las cuales se encuentran la toxina T-2, la toxina HT-2 y el neosolaniol (NEO) por parte del primero grupo (A) y el deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) y la fusarenona X por parte del grupo B (Krska *et al.*, 2007).

Para mitigar los problemas causados por las micotoxinas, se han propuesto distintas estrategias para su control en la contaminación de alimentos, que generalmente se dividen en 2 grandes grupos: estrategias de prevención (enfocadas al momento de la pre-cosecha) y estrategias de descontaminación (enfocadas al momento de la post-cosecha). **Figura 1.** Las estrategias de prevención son las estrategias comunes que incluyen las “buenas” prácticas de agricultura, por ejemplo, el uso de variedades de plantas resistentes a plagas e infecciones fúngicas (Piotrowska, 2021). También la exposición mínima a

condiciones de estrés (sequías), uso correcto de algunos insecticidas y herbicidas, rotación de cultivos y un buen mantenimiento del suelo (Xue *et al.*, 2023).

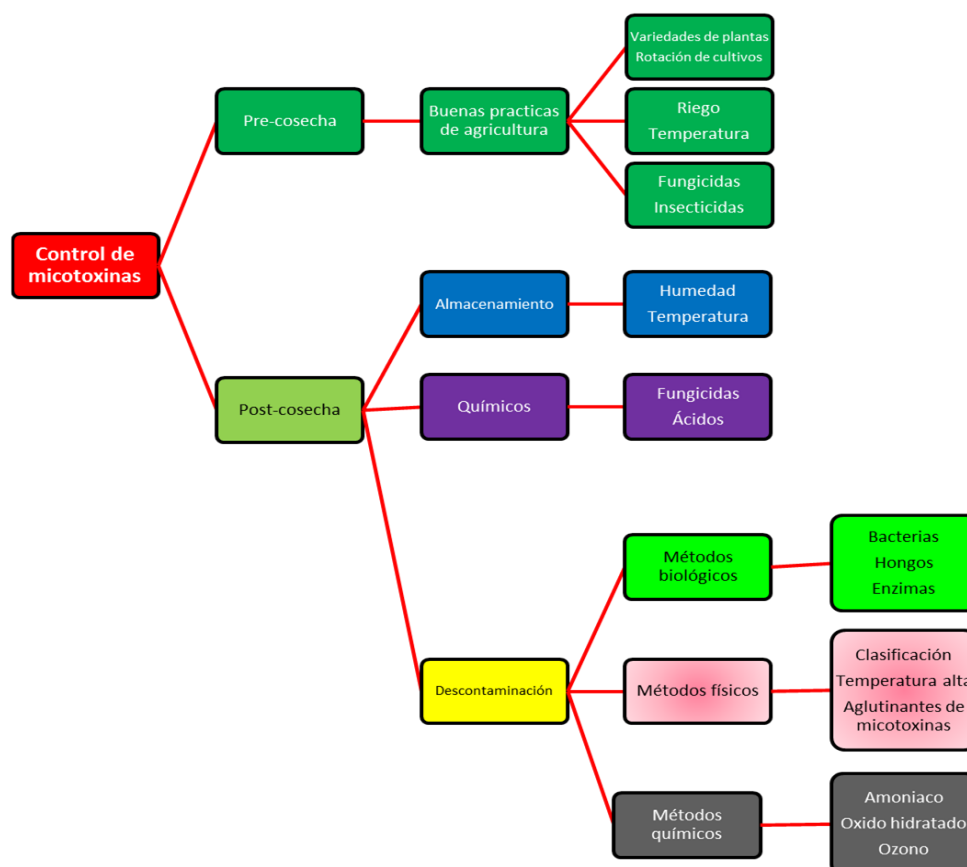


Figura 1. Clasificación de las estrategias de control de las micotoxinas (Piotrowska, 2021).

Por otro lado, en las estrategias de post-cosecha, se recomienda el control de la temperatura y humedad, así como la utilización de algunos fungicidas químicos para prevenir la aparición de hongos micotoxigénicos en condiciones de almacenamiento (Nunes *et al.*, 2021). Para el tratamiento de alimentos contaminados, existen tradicionalmente 3 estrategias: físicas, químicas y biológicas (Lara, 2003). Dentro de las cuales destacan las biológicas por poseer gran potencial para el tratamiento de diferentes micotoxinas (Piotrowska, 2021). Algunos métodos biológicos que se han utilizado son el uso de enzimas y microorganismos, tales como levaduras y bacterias (Haque *et al.*, 2020).

Dentro del grupo de bacterias, destaca el uso de bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias del género *Bacillus*, las cuales son bacterias Gram positivas como principal característica (Mozzi, 2016). En el caso de las BAL, recientemente se ha estado investigando su uso en la descontaminación de diferentes micotoxinas. Se ha reportado la adsorción y la biodegradación como los mecanismos desintoxicantes que llevan a cabo en la interacción con distintas micotoxinas (Mahmood *et al.*, 2018; Gonçalves *et al.*, 2020). Además, de las múltiples aplicaciones como probióticos (efectos fisiológicos positivos) y conservadores de alimentos (Masood *et al.*, 2011). Asimismo, las bacterias del género *Bacillus* se han utilizado para prevenir la intoxicación por contaminación aplicada a distintas micotoxinas (Ju *et al.*, 2019; El Nabarawy *et al.*, 2020; Hassan *et al.*, 2021).

Por consiguiente, el presente estudio plantea como objetivo determinar la capacidad de inactivación de bacterias Gram positivas sobre tricotecenos tipo A (toxina T-2, HT-2 y neosolaniol).

III. Marco teórico

Generalidades de micotoxinas

Los integrantes del reino Fungí utilizan 2 tipos de metabolitos, los primarios y los secundarios. Mientras que los primarios, se requieren para su fase de crecimiento rápido (lípidos, carbohidratos y proteínas) y la ausencia de estos, provocaría su muerte (Soriano, 2007) y los metabolitos secundarios, que son un conjunto de compuestos de naturaleza química diversa que no están involucrados de manera directa en el crecimiento, desarrollo o reproducción de dichos organismos (Lustre, 2022). Los hongos utilizan dichos metabolitos para su crecimiento vegetativo en un cultivo, aunque no son necesarios o esenciales (Avalos y Limón, 2021). Dentro del grupo de metabolitos secundarios se incluyen a los antibióticos y a las micotoxinas, ésta última deriva de los vocablos griegos “mikes” que significa hongo y “toxina”, veneno (Soriano, 2007).

Las micotoxinas son toxinas naturales resultado del metabolismo secundario de algunas especies de hongos, entre los géneros que destacan son: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Claviceps* (Smith y Moss, 1985). Las micotoxinas son sintetizadas en un rango de temperatura óptima que varía entre 20 a 30°C, así como un pH de 4 a 8, con una humedad relativa alta, entre 80 a 90%, además, se producen cuando la fase de crecimiento llega a su periodo final y durante la fase estacionaria. **Figura 2** (Soriano, 2007). Las micotoxinas se caracterizan por poseer un bajo peso molecular (PM) <700, con una gran estabilidad, provocando que sean sumamente difíciles de eliminar en los productos contaminados y causan efectos tóxicos, tanto en seres humanos como en animales (Haque *et al.*, 2020).

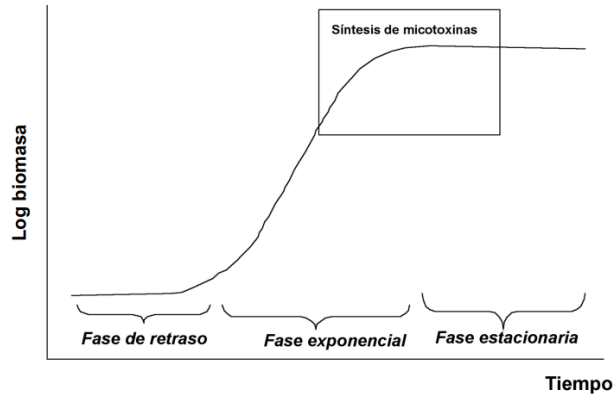


Figura 2. Fases de crecimiento fúngico y la localización de la síntesis de micotoxinas (Soriano, 2007).

Cuando hay niveles excesivos de micotoxinas en la dieta, pueden causar efectos adversos de tipo agudo o crónico sobre la salud humana, además de una amplia variedad de especies pecuarias, dañando a diversos órganos, aparatos o sistemas, principalmente órganos como el hígado, riñón o sistemas como el nervioso, endocrino e inmunitario. **Figura 3.** También generan efectos teratogénicos, cancerígenos e inmunosupresores (Murray *et al.*, 2009). En el caso de las afectaciones en animales, incluyen la disminución del consumo de granos, decremento del peso corporal, incremento de la frecuencia de enfermedades ocasionando la reducción en la productividad animal (Nesic *et al.*, 2013).

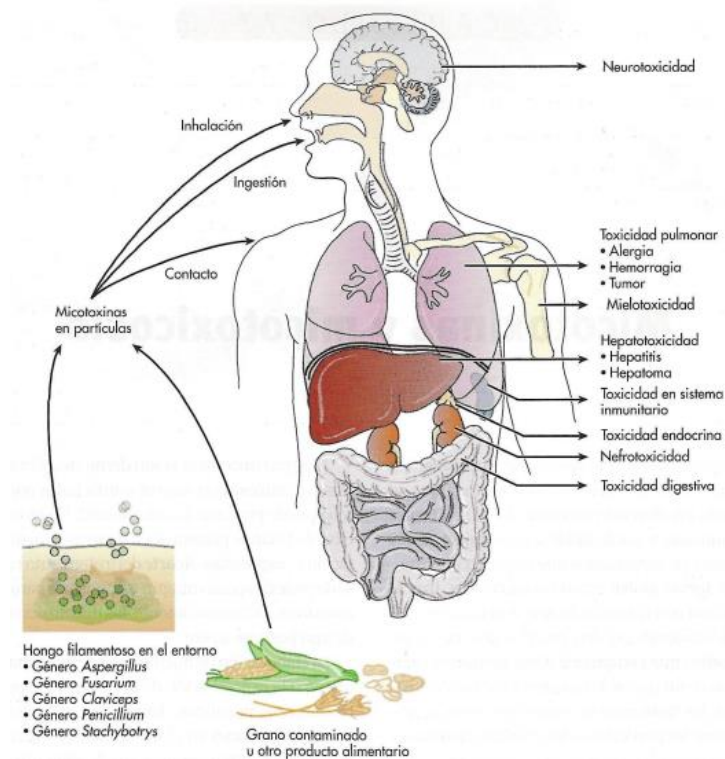


Figura 3. Exposición e influencias de las micotoxinas en humanos (Murray *et al.*, 2009).

La gravedad del daño depende de numerosos factores como la toxicidad de la micotoxina en cuestión, número de micotoxinas presentes, edad y estado nutricional del afectado, por mencionar algunos (Castillo y Durán, 2005). Por otro lado, la existencia de estas toxinas en alimentos y forrajes puede ser de forma individual o simultánea con otras micotoxinas, en donde, de manera conjunta producen efectos sinérgicos en el daño sobre el organismo y, por lo tanto, aumentando su nivel de toxicidad (Arroyo *et al.*, 2014).

Adicionalmente a los daños a la salud, con base en datos proporcionados por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación), se estima que existen afectaciones de hasta una cuarta parte de los cultivos mundiales y hay un valor de hasta 1.000 millones de toneladas de merma de alimentos, donde se incluyen desde alimentos básicos hasta cultivos de gran valor: piensos, cereales, leguminosas y productos de origen animal (Reyes *et al.*, 2021). A su vez, esto provoca una importante pérdida económica, debido a sus efectos negativos, tanto

en la salud de la población, la productividad animal y en el comercio nacional e internacional (Tola y Kebede, 2016).

Se han identificado más o menos unas 100 especies de hongos micotoxigénicos, de los cuales, se estima que existen entre 300 y 400 micotoxinas que tienen un potencial tóxico importante (Ukwuru *et al.*, 2017; Haque *et al.*, 2020). No obstante, las micotoxinas que destacan por su toxicidad y frecuencia en la industria pecuaria son las aflatoxinas (AF), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA), citrininas (CIT) y los tricotecenos (TCT), **figura 4** (Flores *et al.*, 2006).

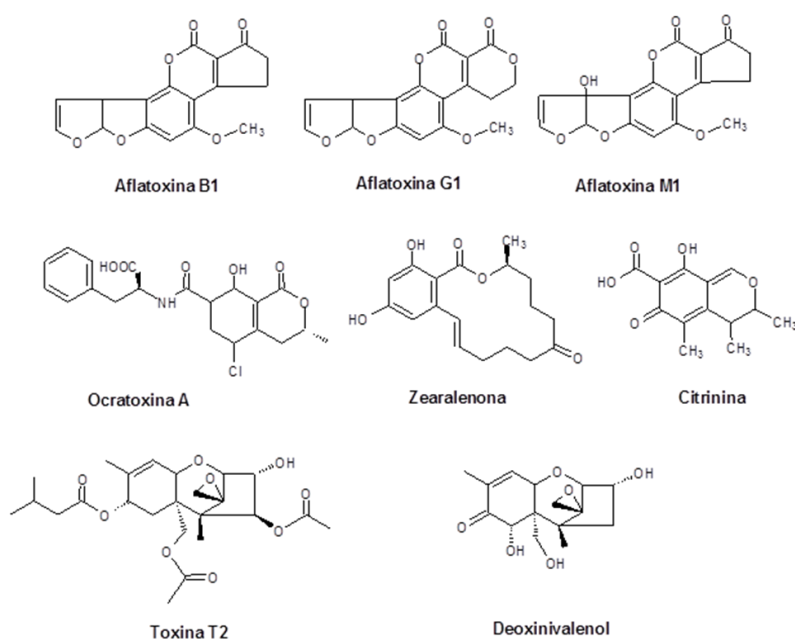


Figura 4. Diferentes tipos de micotoxinas (Juárez, 2017; Santillán *et al.*, 2017; Magdaleno, 2017; Arroyo *et al.*, 2014).

Aspectos generales de tricotecenos

Se puede definir de forma general a los tricotecenos como “ésteres de alcoholes sesquiterpenoides (molécula con 15 átomos de carbón) posicionados alrededor de un anillo tetracíclico que se caracteriza por un doble enlace entre el carbono 9 y 10 y un epóxido en el carbono 12 y 13”, **figura 5** (Santillán *et al.*, 2017). Por otro lado, los tricotecenos son comúnmente encontrados en cereales, por lo cual pueden

intoxicar a humanos como especies de explotación pecuaria (Serrano y Cardona, 2015).

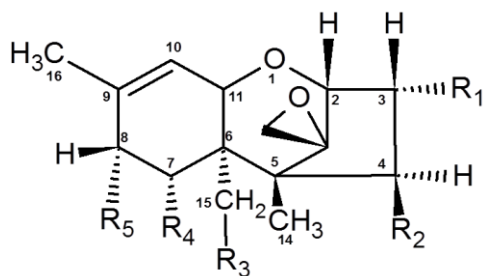


Figura 5. Estructura química base de los tricotecenos (Wu *et al.*, 2013)

Algunos autores dividen estas micotoxinas en 2 grupos: Grupo A (donde destacan las toxinas diacetoxiscirpenol (DAS), T-2 y HT-2) y el Grupo B (siendo las más importantes la deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) y fusarenona) (Gimeno y Ligia, 2011; Serrano y Cardona, 2015). Sin embargo, otros consideran que hay 4 grupos con base en su estructura: A (tiene un grupo hidroxilo, un grupo éster o ninguna cadena lateral en el C8), B (poseen un grupo ceto), C (contiene un segundo anillo epóxido) y el D (presenta un anillo macrocíclico), **figura 6** (Foroud y Eudes, 2009; Bin – Umer *et al.*, 2011).

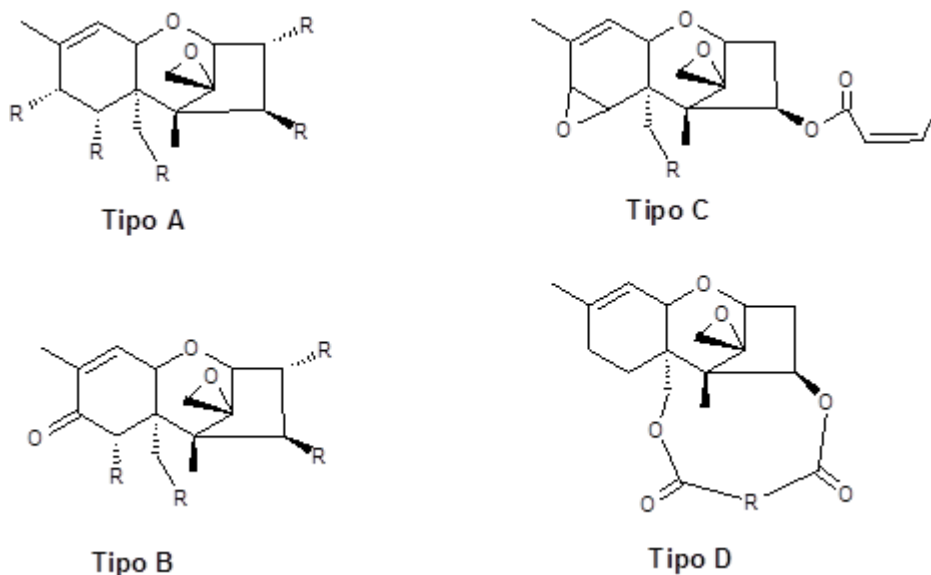


Figura 6. Estructura química base de los tricotecenos tipo A, B, C y D (McCormick *et al.*, 2011).

Los tricotecenos son producidos por algunas especies de los géneros *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Cephalosporium* por mencionar algunos, pero principalmente por el género *Fusarium* y se reporta que existen 40 diferentes tipos (Solé *et al.*, 1992; Foroud *et al.*, 2019). Los tricotecenos que son considerados como los más tóxicos son la toxina T-2, el DAS, el deoxinivalenol (también conocido como vomitoxina) y el fusarenon X, pero los más estudiados son la toxina T-2, DAS y DON, **figura 7** (Wu *et al.* 2013).

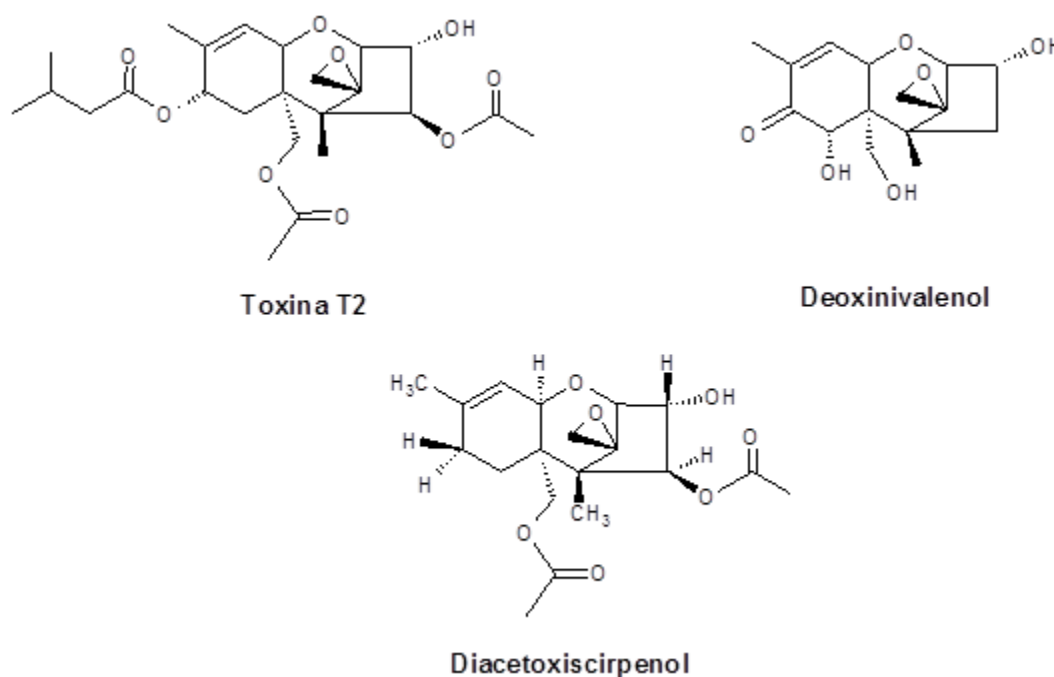


Figura 7. Estructura química de los tricotecenos más estudiados (Desjardins *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2011; Santillán *et al.*, 2017).

Estas micotoxinas interactúan con la unidad ribosomal 60S, lo que provoca una separación de la subunidad rARN 28s, también los procesos de elongación y la activación de RIPS (proteínas inactivadoras de ribosomas) quedan bloqueados, generando un estrés ribotóxico y daños al rARN (Suzuki y Iwahashi, 2014). Como consecuencia de lo anterior, producirá la inhibición del proceso de traducción y síntesis de proteínas, lo que a su vez causa toxicidad, inhibición de la síntesis, tanto de ARN como de ADN, alteraciones en la división celular y en la estructura de la membrana, además compromete la función y la integridad de las mitocondrias (Bin – Umer *et al.*, 2011).

Así mismo, se ha estudiado que la ingesta de tricotecenos causa hemorragias intestinales y vómitos, además de dermatitis en contacto directo. Otros síntomas incluyen la necrosis de tejidos con mitosis activa, pérdida de peso y coagulopatía (Ülger *et al.*, 2020). Específicamente, la toxina T-2 (su principal daño es al hígado) y el DAS se relacionan con la enfermedad aleukia tóxica alimentaria (ATA), además de que originan una amplia sintomatología digestiva, dermatológica y neurológica, de igual forma, genera una disminución de la resistencia del organismo intoxicado a infecciones provocadas por microorganismos adversos (ejerciendo una actividad inmunosupresora) ya que afecta tanto al timo como al bazo (Murray *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2020).

Alternativas de manejo

Las micotoxinas son una problemática que afecta de forma silenciosa a la salud pública en países en desarrollo y la mejor manera de evitar los problemas anteriores es la prevención (Lara, 2003). Sin embargo, como se estima que la mayoría de los alimentos se encuentran ya contaminados con micotoxinas, se ha desarrollado la necesidad de buscar y proponer diferentes estrategias y/o métodos para tratar el alimento contaminado (Hamad *et al.*, 2023). Dichas estrategias deben de contar con características tales como uso sencillo, un bajo costo y a su vez, evitar la generación de metabolitos de igual o mayor toxicidad (Bryden, 2011). Además, es importante que la interacción entre la alternativa de manejo y los alimentos para uso pecuario no afecte el contenido nutricional ni la palatabilidad (Lara, 2003).

Previamente, se había mencionado las estrategias de manejo se dividen en 3 grupos. Algunos ejemplos de métodos físicos son la separación mecánica, ya sea por color o la eliminación de granos quebrados, irradiación por haz de electrones (EBI), plasma atmosférico frío (CAP), radiación UV, etc. (Pankaj *et al.*, 2018; Nunes *et al.*, 2021). También se incluyen los materiales absorbentes, por ejemplo aluminosilicatos y absorbentes con principio orgánico (Arroyo *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018). Por otro lado, en los métodos químicos se utilizan gran variedad de

sustancias químicas como por ejemplo el amoníaco, formol, hidróxido de calcio, bisulfito de sodio, ozono, cloro, etc. (Adebo *et al.*, 2020; Marshall *et al.*, 2020; Hamad *et al.*, 2023).

Y finalmente, en el caso de los métodos biológicos, se han estudiado algunos productos con base en hierbas (extractos de plantas y aceites aromáticos), como por ejemplo *Passiflora alata*, *Psidium cattleianum*, *Rosmarinus officinalis* y *Origanum vulgare*, los cuales muestran una degradación de micotoxinas *in vitro* (Ponzilacqua *et al.*, 2019). De igual forma se ha estudiado el uso de enzimas (oxidases, peroxidases, lactasas, reductasas) y microorganismos (Taheur *et al.*, 2019). En el caso del uso de microorganismos, se incluyen una amplia variedad de organismos tales como los hongos (mohos), levaduras, microalgas e incluso bacterias como lo son el grupo de las bacterias ácido-lácticas y bacterias del género *Bacillus* (Haque *et al.*, 2020).

Generalidades de las bacterias ácido-lácticas

De forma simplificada, las bacterias ácido-lácticas (BAL) son un grupo de bacterias que se caracterizan por la producción de ácido láctico como principal metabolito o como único producto del metabolismo fermentativo del azúcar (Duboc y Mollet, 2001; Devlieghere *et al.*, 2004; Doyle *et al.*, 2019). Su taxonomía se remonta a 1919 por Orla Jensen (quien considero aspectos morfológicos, metabólicos y fisiológicos), el cual las describe como organismos Gram-positivos que presentan formas esféricas (cocos) y de bastoncillos (bacilos), además de no presentar movimiento, no producir esporas y no presentan reacción en presencia de catalasa; es decir, son catalasa negativos (Savadogo *et al.*, 2006).

Asimismo, se caracterizan por poseer metabolismo fermentador obligado (fermentación de carbohidratos), ser ácido-tolerantes, usualmente no son aerobios sin embargo pueden llegar a ser aerotolerantes y con poco contenido en citosina y guanidina (Mozzi, 2016). Las BAL son exigentes a una nutrición completa, por lo que únicamente crecen en medios complejos. Entre los nutrientes que necesitan para su crecimiento incluyen: aminoácidos, péptidos, bases de nucleótidos,

vitaminas (especialmente las del grupo B, como por ejemplo lactoflavina, tiamina, biotina, por mencionar algunas) minerales, carbohidratos (azúcares como hexosas y pentosas) y ácidos grasos (Parra, 2010; Mozzi, 2016).

Debido a sus requerimientos complejos, se les ha localizado en ambientes que son ricos en nutrientes, que abarcan desde el suelo, agua, plantas y/o alimentos fermentados cuya procedencia son lácteos, cereales o carne (Mozzi, 2016). Así mismo, se les puede encontrar formando parte de la microbiota de los sistemas digestivos (tracto gastrointestinal), urinarios y genitales (tracto urogenital) tanto de animales como seres humanos (Doyle *et al.*, 2019).

Con respecto a su taxonomía, las BAL pertenecen al filo *Bacilota* (*Firmicutes*), clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* (Aguilera, 2020). Algunas familias son: *Aerococcaceae* (géneros *Aerococcus*, *Globicatella*), *Carnobacteriaceae* (géneros *Carnobacterium*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*), *Enterococcaceae* (géneros *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*), *Lactobacillaceae* (géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*), *Leuconostocaceae* (géneros *Leuconostoc*, *Fructobacillus*, *Oenococcus*, *Weissella*) y *Streptococcaceae* (géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*) (Parra, 2010; Vinderola *et al.*, 2019; Aguilera, 2020). Cabe destacar que algunos de estos géneros se agregaron gracias a la secuenciación de la subunidad 16s del ARN ribosomal (Mozzi, 2016).

Ahora bien, las BAL generalmente se pueden clasificar con base en 2 aspectos: la temperatura a la que se desarrollan y los productos resultantes de su metabolismo fermentativo. De acuerdo con el primer aspecto, la temperatura, se clasifican en 2 grupos: mesófilas y termófilas, **tabla 1** (Parra 2010; Mozzi, 2016).

Tabla 1. Principales características diferenciales entre los grupos de clasificación de las BAL con base a su temperatura.

Grupo / Característica	Mesófilas	Termófilas
Temperatura	20 - 25 °C	40 - 45 °C
Tiempo de incubación	18 - 20 hrs	2 - 4 hrs
Especie	• <i>Lactococcus lactis</i> (subs <i>lactis</i>, <i>cremoris</i>)	• <i>Lactobacillus lactis</i> • <i>Lb. plantarum</i> • <i>Lb. acidophilus</i>

Para el segundo aspecto, los productos resultantes de su metabolismo, igualmente se dividen en 2 grupos: heterofermentativas y homofermentativas, **tabla 2** (Parra 2010; Mozzi, 2016).

Tabla 2. Principales características diferenciales entre los grupos de clasificación de las BAL con base a su metabolismo.

Grupo/Característica	Homofermentativas	Heterofermentativas
Ruta bioquímica	Glucolisis	Vía de la fosfocetolasa
Productos finales (1 mol de glucosa)	2 mol ATP 2 mol Ácido láctico	1 mol ATP 1 mol ácido láctico 1 mol etanol 1 mol CO ₂
Enzimas principales	Aldolasa Hexosa isomerasa	Fosfocetolasa
Especies	• <i>Lb. acidophilus</i> • <i>Lb. helveticus</i>	• <i>Lb. fermentum</i> • <i>Lb. reuteri</i>

Adicionalmente, las BAL al obtener su energía necesaria por parte de oxidaciones de compuestos orgánicos (como la glucosa) son considerados como organismos quimiorganotrofos, lo que las divide en homofermentativas y heterofermentativas (Parra, 2010; Moreno *et al.*, 2012). En el caso de las homofermentativas, se caracterizan por utilizar la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas (glucólisis) para

degradar las hexosas a ácido láctico principalmente, es decir, aproximadamente más del 85% (Parra, 2010). La glucólisis inicia con la enzima fructosa 1-6 difosfato aldolasa catalizando la transformación de dihidroxiacetona fosfato en gliceraldehído 3 fosfato en un intermediario llamado 1-3 bisfosfoglicerato para después formar piruvato, posteriormente la enzima lactato deshidrogenasa convierte este piruvato en ácido láctico, **figura 8** (Aguilera, 2020). Dentro de este grupo se incluye al género *Enterococcus* (Doyle et al., 2019).

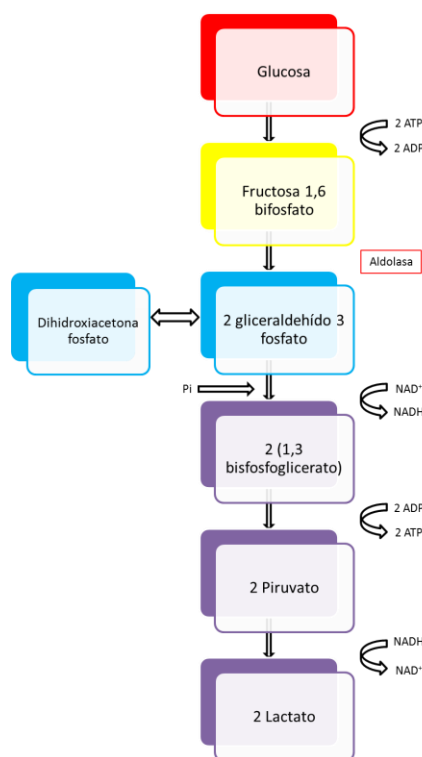


Figura 8. Ruta de la fermentación homoláctica (Aguilera, 2020).

Ahora bien, para el caso de las heterofermentativas, utilizan la vía de las hexosas monofosfato para además de producir ácido láctico (aproximadamente un 50%), también productos adicionales como por ejemplo dióxido de carbono (CO_2) y etanol (Parra, 2010). La ruta metabólica inicia con la vía de las pentosas fosfato, donde se comienza con una fosforilación de la glucosa convirtiéndose en glucosa-6-fosfato, ésta se oxida para formar 6-fosfogluconato, luego este se transforma en ribulosa 5 fosfato (aquí mismo se genera el dióxido de carbono en la transformación de hexosas a pentosas), después esta se convierte en xilulosa-5-

fosfato y con ayuda de la enzima fosfocetolasa, cataliza la conversión de este último a gliceraldehído-3-fosfato y acetil fosfato. **Figura 9.** Posteriormente cada uno se convertirá en diferentes intermediarios para finalmente obtener el ácido láctico y el etanol (Aguilera, 2020). Aquí se encuentra el género *Lactobacillus* (Doyle *et al.*, 2019).

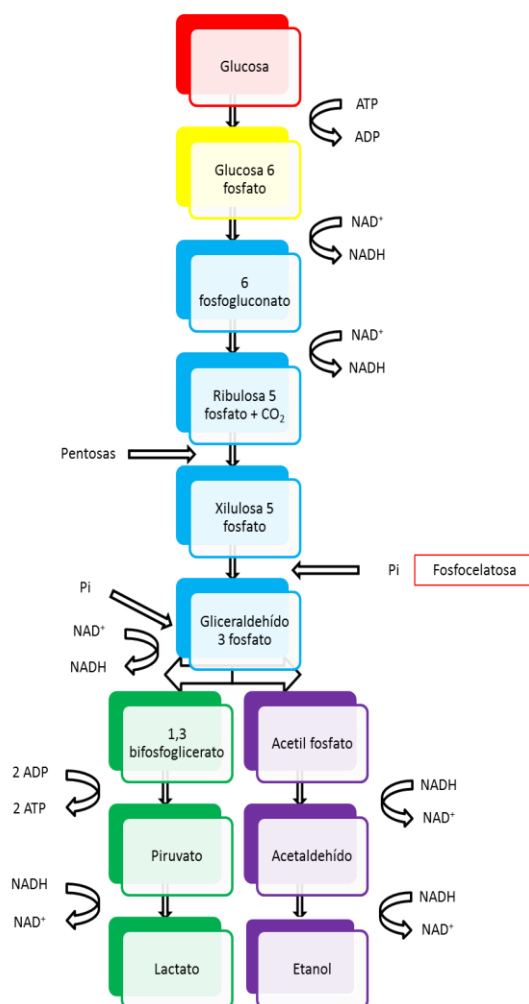


Figura 9. Ruta de la fermentación heteroláctica (Aguilera, 2020).

No obstante, cabe destacar que algunos autores consideran un grupo extra, el cual es el de los heterofermentativos facultativos (Mozzi, 2016). Este último grupo se caracteriza por utilizar la glucólisis para fermentar hexosas (homofermentativas) y también pueden utilizar la vía de la fosfocetolasa para fermentar pentosas (heterofermentativas). Con base en sus rutas fermentativas se clasifican en 3 grupos, **tabla 3** (Vinderola *et al.*, 2019).

Tabla 3. Características que diferencian a los grupos de BAL.

Nombre	Homofermentativas obligadas	Heterofermentativas facultativas	Heterofermentativas obligadas
Azúcares	Hexosas	Hexosas Pentosas	Hexosas
Ruta metabólica	Glucolisis	Glucólisis Vía de la fosfocetolasa	Vía de la fosfocetolasa
Géneros	• <i>Lactococcus</i> • <i>Pediococcus</i> • <i>Streptococcus</i> • <i>Lactobacillus</i> (Grupo 1)	• <i>Lactobacillus</i> (Grupo 2) • <i>Enterococcus</i>	• <i>Leuconostoc</i> • <i>Oenococcus</i> • <i>Weissella</i> • <i>Fructobacillus</i>

Además de la producción de ácido láctico, las BAL también pueden producir otro tipo de metabolitos que han sido reportados con diferentes aplicaciones como inhibidores de esporas (ácido láctico), sistemas antimicrobianos (peróxido de hidrógeno), bacteriocinas (lacticina) y sustancias antimicrobianas (acetaldehído, diacetilo) (Jagnow y Wolfgang, 1991; Devlieghere *et al*, 2004; Savadogo *et al*, 2006). Del mismo modo, estos metabolitos les confieren algunas características organolépticas distintivas (como lo pueden ser la textura, el sabor, el olor) a los alimentos fermentados (queso, yogurt, vino), lo que a su vez les originan efectos antioxidantes y probióticos, además de agregarle valor nutricional al alimento en cuestión (García *et al.*, 2019). De igual forma, las BAL han sido utilizadas como cultivos iniciadores de diversos productos alimenticios como lácteos, carnes y alimentos vegetales, lo que les proporciona el grado “Generalmente Reconocido Como Seguro” (GRAS por sus siglas en inglés), y han sido usadas como aditivos para alimentos de acuerdo con la Administración de drogas y alimentos (FDA por sus siglas en inglés) (Doyle *et al.*, 2019).

Uso de bacterias ácido-lácticas para remoción de micotoxinas

Gracias a su categoría GRAS, las BAL son consideradas como conservadores naturales de alimentos a la hora de controlar el crecimiento fúngico y por consecuencia, la producción de micotoxinas (Ahlberg *et al.*, 2015). Debido a que

se ha reportado la producción de diversos metabolitos (como por ejemplo ácidos grasos, péptidos, ácidos carboxílicos, bacteriocinas, etc.), el potencial futuro de las BAL no solo se limita a funciones antifúngicas, sino que además algunas cepas tienen capacidad de interacción con las propias micotoxinas (Sadiq *et al.*, 2019). Se han reportado diversos mecanismos de dichas interacciones entre las BAL y las micotoxinas, las principales son:

- **Impacto en el crecimiento fúngico:** Las BAL pueden competir por los recursos y espacio del medio en donde crecen creando una inhibición o un retardo para el desarrollo (y posterior producción de micotoxinas) de los hongos (Sadiq *et al.*, 2019). Aquí se pueden encontrar 2 posibles situaciones:

1. **Modificación del pH:** Algunos de los ácidos orgánicos generados por las BAL, pueden cambiar el valor de pH del medio, afectando así la estabilidad de las micotoxinas (Oliveira *et al.*, 2015).

2. **Estrés inducido:** Se conoce poco sobre cómo se relacionan las BAL y el estrés que pueden inducir en los hongos desencadenando en la producción de micotoxinas. Por lo que no se sabe con certeza si existe relación del aumento de micotoxinas en respuesta a un estrés causado por la presencia de dichas bacterias (Dalie *et al.*, 2012).

- **Eliminación por adsorción:** Este mecanismo es el más típico que utilizan las BAL para la remoción de micotoxinas. La adsorción está relacionada con la estructura y/o morfología de sus paredes celulares (Gram-positivas), en específico con los peptidoglucanos y polisacáridos, **figura 10** (Chapot y Kulakauskas, 2014; Encima y Stiglich, 2021). No obstante, existen diversos factores que pueden afectar su capacidad de unión, tales como estado fisiológico de las paredes celulares, el medio de cultivo, el pH, concentración inicial de micotoxina, número de bacterias y tiempo de incubación, por mencionar algunos (Sadiq *et al.*, 2019).

- **Degradación:** Está relacionada con las propiedades proteolíticas de este grupo, las cuales implican reacciones químicas y/o enzimáticas (utilizando la hidrólisis) transformando las micotoxinas en compuestos menos tóxicos (McCornick, 2013).

- **Protección contra efectos tóxicos:** Se han informado varias especies de BAL que presentan propiedades antioxidantes, las cuales son suplementos idóneos para aliviar los efectos tóxicos (Guo *et al.*, 2014).

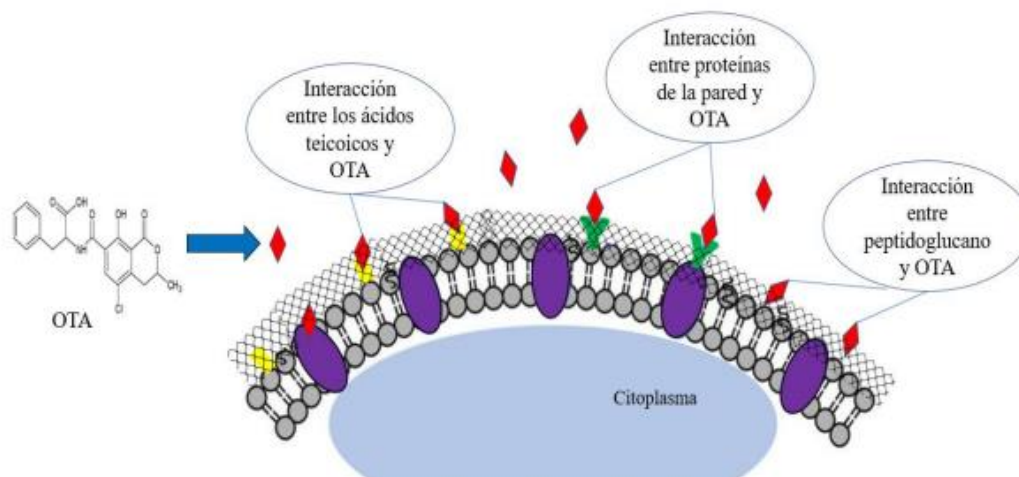


Figura 10. Interacciones de una micotoxina en específico (Ocratoxina A) con los componentes estructurales de la pared celular de las bacterias ácido-lácticas (Encima y Stiglich, 2021).

Género *Enterococcus*

Es un género de bacterias que pertenecen a la familia *Enterococcaceae* dentro del filo *Firmicutes*, las cuales presentan características morfológicas tales como formas esféricas y/o ovoides (propriadamente como su nombre lo dice, de “cocos”) que pueden estar solitarios, en pares y también en cadenas pequeñas. Asimismo, no están encapsulados ni forman esporas y su movilidad es variable, ya que algunas especies pueden presentar escasos flagelos. Por otro lado, se caracteriza bioquímicamente por poseer un rango amplio de temperatura de crecimiento, el cual va desde los 10°C hasta los 45°C (inclusive sobreviviendo a 60°C) pero su temperatura óptima es de 37°C. De igual forma, en base a la tinción Gram, son positivos. En las pruebas de catalasa, reductasa y oxidasa son negativos, y cabe destacar que algunas especies pueden producir una pseudocatalasa, lo que genera una efervescencia débil, pero de manera general son considerados como

negativos. Sin embargo, todos son insolubles en bilis y son PYR positivos (MacFaddin, 2003; Díaz *et al.*, 2010; Olvera, 2018; Mayoral, 2024).

Así mismo, son considerados como BAL heterofermentativas facultativas debido a que se comportan como heterofermentativos cuando metabolizan pentosas y homofermentativos cuando están en presencia de hexosas. Por otro lado, es polémico su uso, ya que algunas especies pueden ser patógenas gracias a sus factores de virulencia que presentan (por ejemplo, la adherencia de proteínas), cabe destacar que estos factores sólo están presentes en muestras clínicas, mientras que muestras aisladas de alimentos, no lo están. Sin embargo, en ambos aislamientos, se han encontrado con especies que son resistentes a variedad de antibióticos como penicilina y vancomicina. Sin embargo, debido a que en este género cuentan con variedad de enzimas que presentan actividad proteolítica, lipolítica y heterolítica, tienen aplicaciones en la industria de los alimentos produciendo compuestos aromáticos y de sabor (Bravo, 2017).

Las especies de este género se pueden localizar formando parte de la diversidad microbiana del suelo, el agua, plantas o también en el aparato digestivo de los animales como los rumiantes (más en específico en el rumen) y humanos. No obstante, también se les ha relacionado con contaminaciones de procedencia vegetal o animal en alimentos. Al igual que los lactobacilos, se les vincula con variedad de alimentos fermentados. Cabe destacar que gracias a su resistencia y persistencia a los factores que pueden impedir su desarrollo (como lo pueden ser pH, salinidad, desinfectantes químicos, etc.) se explica su extensa localización en diversos hábitats comparándolos con otros géneros de las BAL (Vinderola *et al.*, 2019).

Por otro lado, este género lo han dividido con base a estudios moleculares (similitud del gen 16s del ARN ribosomal) en 7 grandes grupos, los cuales se muestran en la **figura 11**.

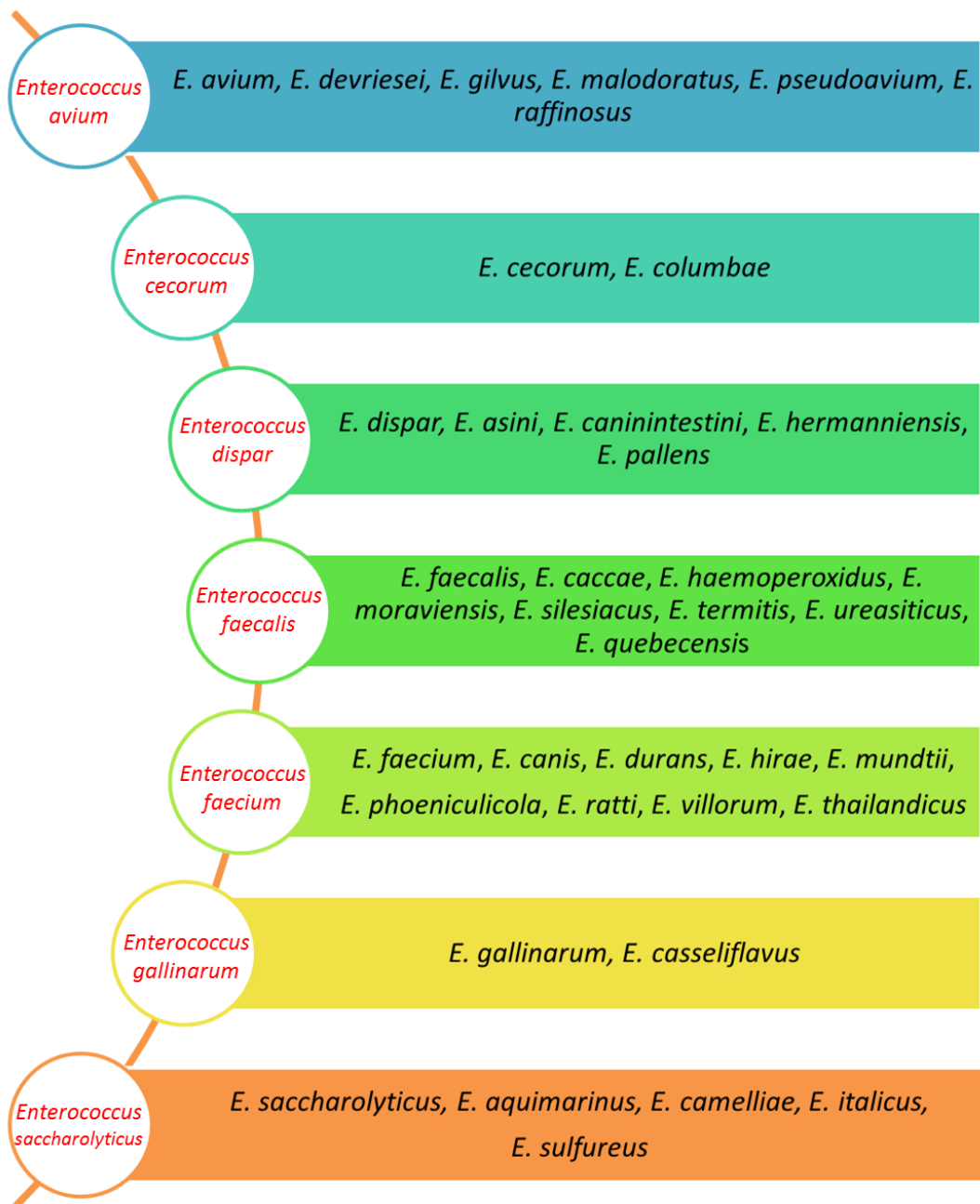


Figura 11. Clasificación del género *Enterococcus* (Sistek et al., 2012).

Alternativamente, otros investigadores (Holzapfel y Wood, 2014) proponen una clasificación sustentada en filogenias robustas e investigaciones anteriores, quedando así la clasificación en 6 grandes grupos (o ramas):

- **Enterococcus faecium:** *E. faecium*, *E. mundtii*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. ratti*, *E. villorum*, *E. thailandicus* y *E. phoeniculicola*.
- **Enterococcus faecalis:** *E. faecalis*, *E. termitis*, *E. quebecensis*, *E. moraviensis*, *E. caccae*, *E. haemoperoxidus* y *E. silesiacus*.
- **Enterococcus dispar:** *E. dispar*, *E. caninintestini* y *E. asini*.
- **Enterococcus casseliflavus:** *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. aquimarinus*, *E. saccharolyticus*, *E. italicus*, *E. sulfureus*, *E. cecorum* y *E. columbae*.
- **Enterococcus pallens:** *E. pallens*, *E. hermanniensis*, *E. devriesei*, *E. gilvus*, *E. malodoratus*, *E. avium* y *E. raffinosus*.
- **Enterococcus canis:** *E. canis*.

Género *Lactobacillus*

Género de bacterias pertenecientes a la familia *Lactobacillaceae* del mismo filo que la anterior, *Firmicutes*. Se caracterizan morfológicamente por presentar formas bacilares diversas, desde bacilos esbeltos largos hasta cocobacilos pequeños y/o cocobacilos corineformes (bacilos cortos y curvos). Además, en algunas cepas se caracterizan por presentar gránulos internos y cuerpos bipolares (lo que les confieren apariencias similares a las “cuentas de un collar”). De igual manera, se pueden mostrar en cadenas chicas o solitarias. A diferencia del género *Bacillus*, no poseen la capacidad de formar esporas y a pesar de que su movilidad es infrecuente, algunas cepas tienen flagelos peritricos. En cuanto a sus características bioquímicas incluyen intervalos de temperatura que comprenden desde 30 a 40 °C. Con base en la tinción de Gram, son positivos. Igualmente son organismos anaerobios facultativos o inclusive obligados (ciertos son microaerófilos) que justo por lo mismo, presentan un crecimiento deficiente en condiciones con aire (MacFaddin, 2003; Aguilera, 2020)

Al ser microorganismos con requerimientos nutricionales complejos, estos se localizan generalmente en hábitats con una gran cantidad de nutrientes como por ejemplo en ambientes lechosos (productos lácteos, en especial los fermentados), que justo de ahí es donde procede su nombre. Así mismo también es posible

encontrarlos en lugares con una alta diversidad microbiana, formando parte de la microbiota de mucosidades tanto de mamíferos como de seres humanos (al igual que en el aparato digestivo de insectos, como por ejemplo, abejas) o incluso en entornos medioambientales como pueden ser desde materia vegetal en descomposición hasta el suelo (Vinderola *et al.*, 2019).

En cuanto a la clasificación del grupo, se puede volver a tomar el criterio de tipo de fermentación que presentan, quedando así dividida en 3 grupos (Moya, 2018; Vinderola *et al.*, 2019):

- ★ **Grupo 1:** Aquí se encuentran los homofermentativos obligados. Estas bacterias fermentan los carbohidratos utilizando la glucólisis para generar ácido láctico como único producto. Algunas especies son: *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*, *Lb. salivarius*.
- ★ **Grupo 2:** Aquí se comprenden los heterofermentativos facultativos. Al fermentar los carbohidratos, producen ácido láctico como producto principal, no obstante también producir otros metabolitos como etanol o dióxido de carbono. Algunas especies son: *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* y *Lb. sakei*.
- ★ **Grupo 3:** Aquí se localizan los heterofermentativos obligados, los cuales pueden utilizar ambas rutas de fermentación, la glucólisis o la vía de las pentosas fosfato. Algunas especies son: *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri* y *Lb. pontis*.

Adicionalmente, con base en análisis moleculares como secuenciación del ARN 16s ribosomal y al uso de nuevas herramientas bioinformáticas, se ha propuesto que especies pertenecientes a este género hayan sido desplazadas a otros géneros como *Carnobacterium* o *Fructobacillus*, provocando así un cambio drástico en la filogenia del grupo, quedando restringida su división en especies tipos del género las cuales están indicadas en la **figura 12** (Holzapfel *et al.*, 2014):

<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	• 27 especies • <i>Lb. delbrueckii</i> • <i>Lb. Kefiranofaciens</i> • <i>Lb. acidophilus</i>
<i>Lactobacillus salivarius</i> y <i>Lactobacillus algidus</i>	• 25 especies • <i>Lb. murinus</i> • <i>Lb. acidipiscis</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	• 14 especies • <i>Lb. reuteri</i> • <i>Lb. Fermentum</i>
<i>Lactobacillus rossiae</i> y <i>Lactobacillus siliginis</i>	• <i>Lb. siliginis</i>
<i>Lactobacillus vaccinostrercus</i>	• 4 especies • <i>Lb. suebicus</i> • <i>Lb. oligofermentans</i>
<i>Lactobacillus sakei</i>	• <i>Lb. curvatus</i> • <i>Lb. fuchuensis</i> • <i>Lb. graminis</i>
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	• 11 especies • <i>Lb. crustorum</i> • <i>Lb. futsaii</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	• 6 especies • <i>Lb. fabifermentans</i> • <i>Lb. xiangfangensis</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	• 10 especies • <i>Lb. hammesii</i> • <i>Lb. namurensis</i>
<i>Lactobacillus collinoides</i>	• 6 especies • <i>Lb. malefermentans</i> • <i>Lb. paracollinoides</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	• 11 especies • <i>Lb. zeae</i> • <i>Lb. Paracasei</i>

Figura 12. Clasificación del género *lactobacillus* (Holzapfel et al., 2014).

Sin embargo, cabe destacar que, en el año 2020, en un estudio reclasificaron a todo el género *Lactobacillus*, por lo que unieron a las familias *Lactobacillaceae* y *Leuconostocaceae* (utilizando criterios fisiológicos, ecológicos y moleculares) creando así 23 nuevos géneros, en los cuales se han agrupado a las especies en ramas o clados robustos que reflejan sus características ecológicas y de metabolismo que tienen en común. En nuestro caso, el nuevo género tiene por nombre “*Lactiplantibacillus*” con descripción de bastones (bacilar), tinción Gram

positiva, no forman esporas, metabolismo de tipo homofermentativo y sin movilidad. Dichas especies metabolizan fermentativamente una diversidad de carbohidratos además de ácidos fenólicos a través de enzimas esterasas, descarboxilasas y reductasas. Generalmente no reducen nitritos ni presentan catalasa positiva, aunque pueden presentar una pseudocatalasa (Zheng *et al.*, 2020).

Género *Bacillus*

Es un género de bacterias que pertenecen a la familia *Bacillaceae* dentro del filo *Firmicutes* (*Bacillota*), las cuales presentan características morfológicas tales como células con apariencia de bastón (como su nombre lo indica, bacilos y/o bacilar) que pueden estar rectas o casi rectas, tamaño cambiante que va desde 0.5 a 10 μm , sus bordes pueden ser de forma redondeada o cuadrada, algunas pueden formar cadenas o estar en pares. Además, son productoras de endosporas (las cuales son resistentes al calor y a variadas condiciones adversas), estas varían en su forma donde van desde ovales, redondas o hasta cilíndricas, pero solo se produce una por célula. Generalmente presentan movilidad (algunas presentan flagelos peritricos) con excepción a algunas especies (por ejemplo *B. mycoides*). Sin embargo, la movilidad dependerá del medio de crecimiento. Por otra parte, sus características bioquímicas incluyen rangos de temperatura que comprenden desde 30 hasta 45°C, teniendo su temperatura óptima a los 35 °C (no obstante, algunas especies como *B. stearothermophilus* crece a 65°C). Así mismo, de acuerdo a la tinción Gram, la mayoría son positivas y cabe destacar que, en algunas especies, la etapa joven es positiva y mientras crecen, se vuelven negativas. De igual manera, incluye tanto organismos aerobios como anaerobios facultativos, e incluso tienen especies que son aerobios estrictos. Son catalasa variable (comúnmente positiva, sin embargo, unas cuantas son negativas) y oxidasa variable (MacFaddin, 2003; Villareal *et al.*, 2018; Montoya, 2023).

Es importante resaltar su ciclo de vida, ya que en una parte de este es donde se generan las endosporas (característica distintiva del género). Este ciclo se divide

en dos grandes fases: el crecimiento vegetativo y la esporulación. De forma general, en la primera fase ocurre el común crecimiento bacteriano, el cual es de tipo exponencial y se presenta cuando son positivas las condiciones del ambiente en donde se encuentre creciendo. Y en la segunda fase, como su nombre lo indica, las bacterias generan esporas debido a situaciones o cambios negativos en el ambiente (altas o bajas temperaturas, pH ácidos o alcalinos, salinidad, por mencionar algunos). Como se mencionó anteriormente, dichas esporas son resistentes a condiciones adversas y pueden permanecer viables hasta que las condiciones sean aceptables para nuevamente empezar el crecimiento vegetativo (Tejera *et al.*, 2011).

Por tal razón, este género es considerado como bacterias ubicuas, es decir, bacterias que pueden llegar a estar presentes en cualquier ambiente; los cuales engloban hábitats terrestres, entre ellos el suelo (más en específico formando parte de la microbiota de la rizosfera) y hábitats acuáticos, incluidos tanto los marinos como los de agua dulce. Asimismo, se han encontrado especies en agua, polvo, aire, sedimentos, animales y alimentos. En este último se han identificado algunas especies que pueden ser patógenas al encontrarse como contaminante de insumos para uso alimenticio (Tejera *et al.*, 2011; Holzapfel *et al.*, 2014).

En cuanto a su taxonomía, debido a que presentan una gran heterogeneidad genética no ha sido fácil delimitar las características que diferencian entre sí a los grupos. Para ello se necesitan numerosas pruebas fenotípicas para distinguir, sin embargo, en algunos casos no se pueden diferenciar especies que están muy emparentadas o por el contrario, con un solo carácter se diferencia una especie particular complicando más su clasificación. Es por ello por lo que diversos autores han propuesto diferentes subdivisiones, como la mencionada por Tejera *et al.*, en 2011 (**Figura 13**), en donde se proponen 4 grandes grupos, dichos grupos son:

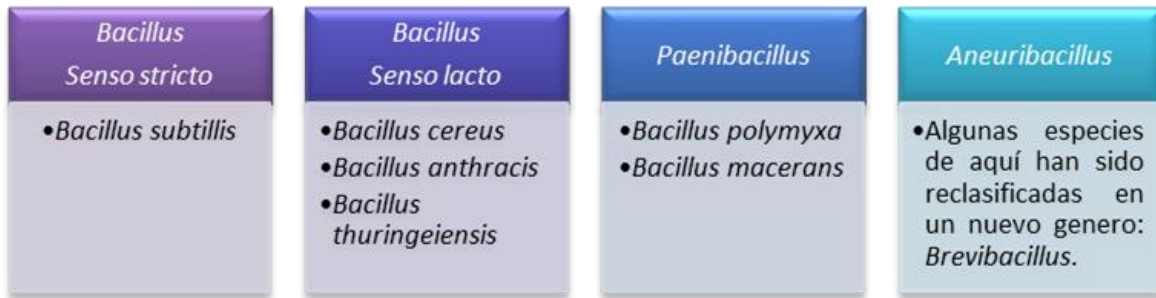


Figura 13: Clasificación del género *Bacillus* (Tejera et al., 2011).

Así mismo, se creó un nuevo género llamado *Virgibacillus*, donde se ubica a la especie *Bacillus pantothenicus* (Tejera et al., 2011). Por otro lado, otra clasificación es la de Alcaraz et al., (2010), en donde destacan los grupos de *B. cereus* (aquí se localizan las especies de importancia médica), *B. subtilis* (especies medioambientales), *B. clausii-halodurans* y *Bacillus spp* (el resto en general).

IV. Antecedentes

Los antecedentes se presentarán en 2 partes. La primera parte, acerca del uso de las BAL y especies del género *Bacillus* sobre la inactivación de micotoxinas, en específico sobre estudios donde han utilizado las cepas bacterianas utilizadas para este trabajo. Y en la segunda parte, sobre el uso de microorganismos en la remoción sobre tricotecenos.

Uso de BAL para disminución de micotoxinas

Género *Enterococcus*

Topcu Ali *et al.*, (2010) realizaron un estudio utilizando dos cepas de *Enterococcus faecium*, *E. faecium* M74 y cultivo comercial de *E. faecium* EF031, para ver su efecto desintoxicante sobre aflatoxina B1 (1000 µg/mL) y patulina (40 µg/mL), encontrando que ambas cepas tienen rangos de eliminación para cada micotoxina, para el caso del cultivo M74 fue de 19.3 - 30.5 % de AFB1 y 15.8 - 41.6 % de patulina mientras que EF031 fue de 23.4 al 37.5 % de AFB1 y de 19.5 - 45.3 % de patulina (ambas en un periodo de 48 horas). Encontrando así que *Enterococcus* puede disminuir tanto aflatoxina como patulina.

Así mismo, se emplearon 2 cepas de *E. faecium* (GJ40 y MF4) aisladas de heces de perros saludables para evaluar la capacidad de unión entre la pared celular de dicha bacteria y aflatoxina B1 a 50 y 100 ppb. Se utilizaron células viables y no viables (previamente esterilizadas), encontrando que levemente las primeras tienen mayor porcentaje de remoción. Por otro lado, la cepa GJ40 removió entre 24 y 27 % de 50 ppb y 17 - 24 % a concentración 100 ppb. Mientras que la cepa MF4 removió entre 36% - 42 % y entre 27 - 32 % para las mismas concentraciones respectivamente, concluyendo que ambas cepas presentan la propiedad de eliminar la AFB1 en diferentes condiciones *in vitro*. Indicando que el factor de viabilidad de las células bacterianas puede influir en la inactivación (Fernández *et al.*, 2015).

En un experimento realizado por Álvarez *et al.*, (2020) utilizaron 6 cepas de *E. faecium* para ver el efecto antifúngico y en la producción de ocratoxina A de 2 especies del género *Penicillium* (*P. nordicum* y *P. verrucosum*), descubriendo que a pesar de que no tuvieron diferencias significativas en el crecimiento fúngico (en especial con la primera especie de hongo), existió una reducción de la producción de ocratoxina A (OTA) por parte de ambas especies de hongo cuando se inocularon con las diferentes cepas bacterianas de *Enterococcus*, por ejemplo la cepa *E. faecium* SE920 redujo significativamente la producción de OTA de *P. nordicum* aunque no afectó a *P. verrucosum*, no obstante la cepa *E. faecium* SE45 sí redujo la producción de OTA en *P. Verrucosum*.

Dong *et al.*, (2023) utilizaron 2 especies de *Enterococcus faecium* (M) y *E. faecalis* (E). Se hicieron los ensayos de eliminación utilizando medio Man-Rogosa-Sharpe (MRS) para AFB1, deoxinivalenol (DON) y zearalenona (ZEN) con concentraciones finales de 0.5, 500 y 100 mg L⁻¹ para cada micotoxina respectivamente. Resultando que ambas especies poseen propiedades de eliminación de todas las micotoxinas, en el caso de *E. faecium* obtuvo un mayor porcentaje, ya que fue de 48.3 % de eliminación de AFB1 y *E. faecalis* 25.7 %. Y para ZEN, pasó lo contrario, *E. faecalis* tuvo mayor porcentaje (40.1 %) con respecto a *E. faecium* (25.2 %). Finalmente, para DON la cepa *E. faecium* presentó un 31.9 % de eliminación frente a 33.3 % para *E. faecalis*.

Género *Lactobacillus*

En el estudio realizado por Peltonen *et al.*, (2001) encontraron que, de una solución con 12 cepas de *Lactobacillus*, 5 de *Bifidobacterium* y 3 de *Lactococcus*, 2 especies de *Lactobacillus* (*L. amylovorus* y *L. rhamnosus*) fueron capaces de eliminar hasta en un 50 % de AFB1 (2 µg/ml) en un periodo de 72 horas.

De igual manera, Piotrowska (2014) demostró en su estudio que las BAL, en específico cepas del género *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. brevis* y *L. sanfranciscensis*) se pueden unir con OTA (1 µg/ml), pero depende de la cepa bacteriana, la densidad de biomasa y el estado (vivas o inactivadas térmicamente), encontrando que de las 3 cepas, *L. plantarum* y *L. sanfranciscensis*

mostraron un porcentaje de adsorción significativamente favorable (30%). Para el caso de la biomasa, concluyen que para lograr un porcentaje de remoción del 50% mínimo, tiene que ser igual o superior a 10^9 UFC/mL y para su estado, las que fueron inactivadas térmicamente tuvieron porcentajes mayores de adsorción de la micotoxina con respecto a las vivas.

Otro trabajo reportado por Luz *et al.*, (2018) describieron que algunas cepas de *Lactobacillus* mostraron actividad de adsorción de OTA (0.6 µg/mL) dependiendo del valor de pH en el que se encontraban. *L. plantarum* fue la que mostró mayor afinidad de unión.

Género *Bacillus*

Farzaneh *et al.*, (2012) utilizaron la cepa de *Bacillus subtilis* UTB SP1, la cual fue aislada de frutos maduros de pistache, para ver su capacidad de degradación de AFB1 sobre caldo nutritivo (2.5 ppm), entre otros sustratos. Encontrando que según sea el tiempo del ensayo fue el porcentaje de reducción, por ejemplo después de 24 horas, el porcentaje fue de 52.67 % y después de 48 horas fue de hasta 80.53 %.

En el caso de Ju *et al.*, (2019) utilizaron las especies *B. subtilis* y *B. natto* para degradar zearalenona (0.02 µg/mL) en alimentos líquidos (cerveza) y sólidos (harina de maíz y harina de soya), donde en el caso de los líquidos, *B. natto* tuvo un porcentaje mayor de degradación (73%) con respecto a *B. subtilis* (65%). Caso contrario con las harinas donde *B. subtilis* mostró un porcentaje mayor de degradación (75%) en comparación con la otra especie (70%).

Así mismo, *B. velezensis* fue utilizada por Guo *et al.*, (2020) para degradar zearalenona (ZEA) (200 mg mL⁻¹) tanto de medio Luria Bertani (LB) como de muestras de maíz infectado con moho. Encontrando que la cepa de *Bacillus* es capaz de degradar eficientemente ZEA tanto del medio como del maíz. En LB se degradó aproximadamente un 95 % después de 48 horas y en las muestras de maíz se disminuyó de una concentración de 0.69 a 0.17 mg mL⁻¹ después de 48 horas.

En un estudio realizado en 2021 por Hassan *et al.*, utilizaron una colección de bacterias del género *Bacillus* para analizar la biodegradación de una o múltiples toxinas producidas por el género *Fusarium* a través de diferentes sustratos, indicando que la especie *B. megaterium* y *B. pumilus* degradaron zearalenona (0.75 µg/mL), mientras que las especies *B. cereus*, *B. simplex* y *Paenibacillus favisporus* degradaron significativamente la toxina T2 (0.6 µg/mL).

Los investigadores Tsiouris *et al.*, (2021) determinaron la eficacia de un nuevo agente desintoxicante, MMDA por sus siglas en inglés, en pollos intoxicados por una dieta contaminada por aflatoxina B1 (0.1 µg/mg) y ocratoxina A (1 µg/mg). Dicho suplemento contiene zeolita modificada (clinoptilolita), *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* y silimarina (antioxidante) concluyendo que la suplementación dietética de MMDA mejoró parcialmente los efectos adversos de AFB₁ y OTA.

Uso de microorganismos para disminución de tricotecenos

Toxina T-2

Magdaleno (2021) determinó la capacidad de degradación en zearalenona y tricotecenos (toxina T-2) utilizando una esterasa, levadura y extracto de levadura del género *Saccharomyces*. En el caso de la zearalenona (1 µg/mL), la levadura mostró un porcentaje mayor de degradación (86.58%) en comparación con la enzima (60.54%). Para el caso de la toxina T2 (0.1, 0.3 y 3 µg/mL), la esterasa obtuvo un porcentaje mayor (17.99%) que *Saccharomyces* (10.66%), concluyendo que efectivamente ambos tratamientos presentan actividad biodegradante de fusariotoxinas.

Zhou *et al.*, (2017) utilizaron sistemas fermentativos creados por 3 cepas de BAL, las cuales incluye a *Enterococcus durans* cepa ZH-54, *Lactococcus lactis* cepa CAMT22361 y *Lactobacillus pentosus* cepa YM-49 para determinar cuál cepa es la más eficiente para eliminar a la toxina T-2 (50 ng/ml). Cabe destacar que extrajeron varios componentes de dichos sistemas para su análisis. Hallaron que,

para todas las cepas, la tasa de eliminación fue mejor durante la fase logarítmica y luego alcanzó una estabilidad en la fase estacionaria. *Lactococcus lacti* presentó una disminución mayor de T-2 con respecto a las demás (30.62 %) y su componente con mayor efectividad fue la fracción no proteica de la célula con un porcentaje de 54.08 %.

En el estudio realizado por Ondiek *et al.*, (2022) probaron el efecto de remoción de aflatoxina B1 y toxina T-2 (concentraciones de 20, 50, 100, 200, y 250 µg/L) mediante 2 especies de BAL (*Lactobacillus casei* cepa *shirota* y *L. acidophilus*) y una mezcla de 3 más (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*). Averiguando que todas las bacterias poseen capacidad de eliminación, en el caso de la toxina T-2, las 2 cepas aisladas obtuvieron rangos de porcentajes de entre 19 y el 38 % y el 15 a 45 % respectivamente. Y en el caso de la mezcla entre 15 - 45 %.

Neosolaniol (NEO)

Hay escasos trabajos que evalúan la disminución en la concentración de NEO, tal es el caso de Young *et al.*, (2007) en el cual utilizaron cultivos mixtos de microorganismos del intestino de pollo para ver su efecto sobre distintos tricotecenos, entre los cuales fue el neosolaniol (200 ug). Encontraron que existe una degradación de tricotecenos a compuestos menos tóxicos a través de 2 reacciones principales: la desacetilación y la de epoxidación. En el caso del neosolaniol, solo fue reportada una degradación por desacetilación.

Sin embargo, su estructura química se asemeja a la estructura de DON, del cual se encuentran diversos trabajos como el de Zou *et al.*, (2012) utilizaron diferentes cepas de BAL: *Lactococcus lactis* 6020 (LL6020), *Lactobacillus brevis* 1.12 (LB1.12), *Lactobacillus casei* 6103 (LC6103) y *Lactobacillus plantarum* 102 (LP102) para probar la capacidad de eliminación de DON (1 ug/ml) y T-2 en caldo MRS. Ellos encontraron que las cepas tienen diferente capacidad para eliminar los tricotecenos, siendo que 2 cepas de *L. plantarum* fueron las que tuvieron mayor efectividad en comparación con las demás cepas. En el caso de la cepa LP102 el porcentaje fue de 20.20 ± 1.60 % de remoción de DON.

Por otro lado, He *et al.*, (2015) informaron que la bacteria *Devosia mutans* es capaz de transformar/degradar el deoxinivalenol (0.0100 - 5 ug/mL) en 2 compuestos: 3-epi-DON (1.00 - 1000 ug/mL) y 3-ceto-DON (0.0100 - 10.0 µg/mL), los cuales mostraron que son sustancialmente menos tóxicos (evaluando la viabilidad celular y la síntesis de ADN) en comparación con el compuesto original.

Gao *et al.*, (2018) reportaron que una nueva especie de bacteria llamada *Eggerthella spp.*, la cual fue aislada del intestino del pollo, mostró una eliminación de 4 tipos de tricotecenos. El principal tricoteceno inactivado fue deoxinivalenol (100 µg/mL).

Toxina HT-2

En el estudio llevado a cabo por El Nezami *et al.*, (2002), utilizaron 3 cepas diferentes de los géneros *Lactobacillus* (*Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* LC705) y *Propionibacterium* (*Propionibacterium freudenreichii ssp. Shermanii* JS (PJS) para examinar la capacidad de eliminación de micotoxinas producidas por el género *Fusarium*, entre ellas HT-2 (20 mg ml⁻¹) en medio líquido. Ellos reportaron que la cepa LGG y PJS fueron capaces de eliminar hasta 4 toxinas de las 7 en total mientras que LC705 solo 2. En el caso de HT-2, los valores de concentración restante entre las 3 cepas variaron desde 13.3 hasta los 20 mg/ml⁻¹.

En un estudio realizado por Hlaváčková *et al.*, (2012) ocuparon 3 microorganismos (*Rhodotorula spp.*, *Leuconostoc spp.* y *Pantoea agglomerans*) para examinar el efecto sobre la producción de T-2 y HT-2 (4783 mg kg⁻¹) por parte de *Fusarium poae* y *F. sporotrichioides* bajo diferentes condiciones experimentales tales como el medio de cultivo: agar extracto de malta, agar nutritivo. El método de inoculación: superposición o extensión y el tiempo: 48 o 120 hrs. Se observó de manera general que a pesar de las diferentes condiciones en las que fue realizado el estudio, existe una reducción en la producción de ambas micotoxinas en las diferentes condiciones, sin embargo, la cepa de *Pantoea agglomerans* tuvo el mayor efecto de disminución. Además de que se mostró una mayor reducción de

la toxina T-2 en comparación con la HT-2. No obstante, los autores también indican que tiene influencia sobre la disminución de micotoxinas las condiciones y el medio de cultivo utilizado.

Juodeikiene *et al.*, (2018) realizaron un estudio para reducir la concentración de deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEN), T-2 y HT-2 (258–819 µg/kg) presentes en granos de trigo para maltear, utilizando una suspensión de bacterias vivas conformadas por cepas diferentes de *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus*. Ellos encontraron que para el caso de la toxina HT-2 en promedio obtuvo un intervalo de porcentaje de reducción de entre 73 a 79 %, concluyendo que efectivamente las BAL tienen influencia sobre las micotoxinas, además de propiedades antifúngicas con especies de *Fusarium*.

V. Justificación

A pesar de que los hongos son fundamentales dentro de la ecología y cuentan con múltiples beneficios en diferentes ámbitos, al tener especies que son productores de micotoxinas también son considerados como fuentes contaminantes en diferentes productos alimenticios que son importantes tanto en el consumo animal como humano. Afectando así el bienestar y/o contribuyendo a pérdidas económicas mundiales gracias a los efectos negativos que causan la exposición e ingesta de alimentos contaminados.

Dentro de los diversos tipos de micotoxinas, destacan el grupo de los tricotecenos, los cuales, debido a su ocurrencia en diferentes granos o alimentos fabricados a base de cereales, y los efectos perjudiciales en la salud por su consumo directo o indirecto, es necesario el investigar nuevas estrategias que permitan la eliminación de dichas toxinas teniendo en cuenta que sean eficientes, accesibles e inocuas. Debido a los inconvenientes de las estrategias de tipo físicas y químicas (posibilidad de crear residuos más tóxicos y/o alterar las propiedades nutricionales y organolépticas de los alimentos), las estrategias biológicas tienen potencial para su aplicación (son efectivas contra diversas micotoxinas, amigables con el ambiente, elude el uso de químicos).

Es por ello que una estrategia biológica novedosa es el uso de microorganismos, entre los que destacan las bacterias ácido-lácticas (BAL) y algunas bacterias del género *Bacillus*, debido a que cuentan con certificación de uso seguro (GRAS) para su utilización como aditivos para la conservación de alimentos, propiedades antifúngicas y capacidad de adsorción y/o degradación de micotoxinas, son consideradas para su utilización en el manejo de contaminaciones con tricotecenos, además de que, al existir pocos estudios enfocados a este grupo específico de micotoxinas, se contribuye al conocimiento de cepas desintoxicantes de tricotecenos para su posible aplicación comercial en productos como aditivos para alimento de ganado.

VI. Hipótesis

Al ser reportada en la literatura diferentes mecanismos de desintoxicación de micotoxinas por parte de BAL, como lo son la adsorción y degradación, la estructura química de los tricotecenos podría ser susceptible a dichos procesos de desintoxicación y por lo tanto, las cepas de *Bacillus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* pueden tener capacidad de disminuir la concentración de tricotecenos.

VII. Objetivos

Objetivo General

- Caracterizar la capacidad de las bacterias Gram-positivas para inactivar tricotecenos *in vitro*.

Objetivos Particulares

- Aislar y purificar la cepa del género *Enterococcus* de una muestra de un producto comercial llamado “biopro”.
- Identificar la cepa purificada de la muestra “biopro” mediante pruebas bioquímicas y moleculares.
- Verificar la taxonomía de las cepas donadas por CCBIZTA de los géneros *Bacillus* y *Lactobacillus* mediante pruebas moleculares.
- Determinar la capacidad de disminución de la concentración de tricotecenos tipo A (T-2, HT-2 y NEO) por las cepas de los géneros *Enterococcus*, *Bacillus* y *Lactobacillus*.

VIII. Material Y Métodos

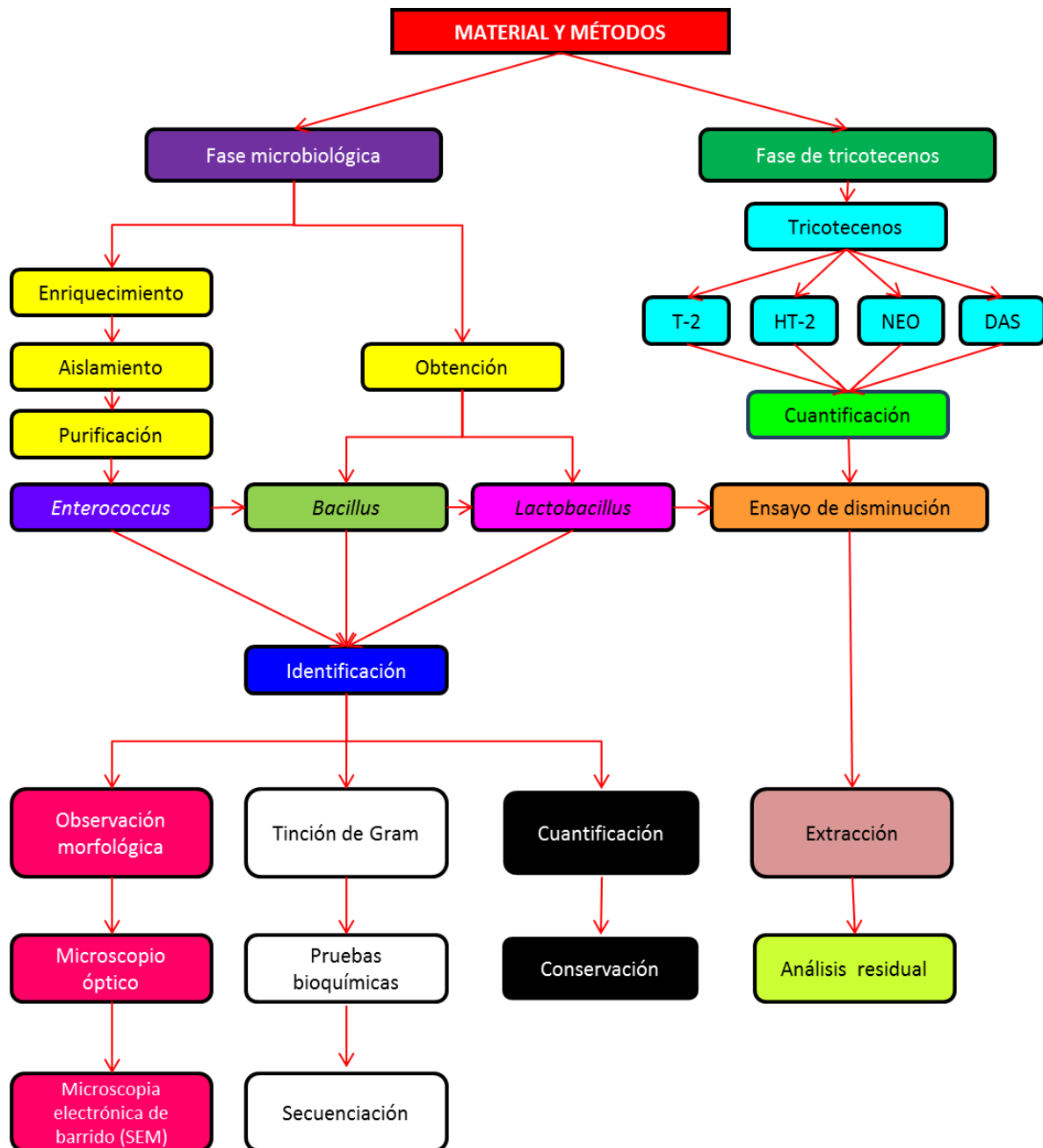


Figura 14. Diagrama de los materiales y métodos que se utilizaron en este trabajo.

IX. Fase microbiológica

Preparación de medios de cultivo (medio líquido y sólido)

Se prepararon 250 mL de medio de cultivo TSB (Soy Trypticase Broth por sus siglas en inglés), MRS (Man-Rogosa-Sharpe por sus siglas en inglés) y BHI (Brain Heart Infusion por sus siglas en inglés), los cuáles se esterilizaron en una autoclave a 115 Lb por 15 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y una vez enfriados (tolerable al tacto), los medios de cultivo se vaciaron en cajas petri (60 mm x 20 mm).

Cabe destacar que al momento de vaciar el agar BHI, este fue adicionado con 25 µL de amikacina. También, se prepararon tubos con 4.5 mL de caldo MRS, BHI y STB y se realizó la prueba de esterilidad, colocando los medios de cultivo (tanto cajas como tubos) en una incubadora a $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

Obtención de bacterias

Se gestionó la donación de una muestra de “Biopro” por el Laboratorio Productor del inóculo DAEHO (Helm de México S.A.), la cual está reportada que presenta 3 cepas bacterianas pertenecientes a los géneros: *Enterococcus*, *Bacillus* y *Lactobacillus*, además de una cepa de levadura correspondiente al género *Saccharomyces*. Obtenida la muestra, se pesaron 5 g y se vaciaron en 2 matraces con 50 mL de caldo nutritivo (1:10). Posteriormente, se colocaron los dos medios inoculados en un sonicador ultrasonico LC30H durante 5 min.

Por otro lado, se solicitó la donación de cepas puras de “*Lactobacillus plantarum*” y “*Bacillus subtilis*” a la colección de cultivos bacterianos de la FES - Iztacala (CCBIZTA), que fueron inoculados e incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 h en tubos con 10 mL de medio MRS (para *L. plantarum*) y TSB (para *B. subtilis*), además, de tubos Eppendorf con 900 µL de los mismos medios mencionados anteriormente para ambas bacterias respectivamente.

Aislamiento y purificación de la cepa del género *Enterococcus*

Una vez terminada la prueba de esterilidad de los medios de cultivo, con un asa bacteriológica, se tomó un inóculo de cada matraz y se descargó en una caja Petri con agar BHI adicionado con amikacina (1%) para posteriormente realizar la técnica de siembra por estría. Una vez terminado, se dejó incubar por 24 horas a $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Posteriormente, con un contador de colonias, se observaron y seleccionaron las colonias que presentaban morfologías coloniales que correspondían a las características reportadas por Casillas *et al.* (2020) pequeñas, lisas, de contorno uniforme, color crema o blanco.

Las colonias que presentaron las características anteriores se sembraron en cajas con medio BHI adicionada con amikacina (1%) y se dejaron incubar por 24 h a $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Este paso se repitió hasta la obtención de colonias de una sola morfología.

Después con base a dicha morfología colonial, se tomaron esas colonias y se sembraron en medio de cultivo BHI. Se dejó incubar los cultivos por un lapso de 24 horas a $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, para observar la morfología bacteriana se ocuparon 10 μL de medio, se vaciaron en un portaobjetos y se observó en un microscopio de contraste de fase (Labophot-2) a 400X con fase 3.

Al mismo tiempo se sembró en cajas Petri con el mismo medio, pero ahora en agar manteniendo las mismas condiciones de incubación. A continuación, se hizo un frotis en un portaobjetos de las colonias desarrolladas con 10 μL de agua destilada estéril y se observaron al microscopio para corroborar su morfología bacteriana.

Este mismo proceso se repitió hasta la obtención de colonias puras.

Conservación de cepas bacterianas

Para la conservación de las cepas donadas se mantuvieron en los mismos medios, en los cuales fueron entregadas las bacterias, es decir, en medio MRS

para *L. plantarum* y TSB para *B. subtilis*. En el caso de *Enterococcus*, se utilizó medio BHI. Se utilizaron colonias de cada cepa bacteriana y se agregaron en tubos eppendorf con 900 μ L de glicerol al 10 % y se almacenaron a $-70^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para su conservación.

Se prepararon 6 tubos con aproximadamente 3 mL de agar de cada medio y se dejaron solidificar en forma inclinada (aproximadamente en un ángulo de 45°) a temperatura ambiente y luego se colocaron en una incubadora a $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para la prueba de esterilidad. De los cultivos de cada bacteria en caja petri de 24 horas, se utilizó una colonia y se sembraron en dichos tubos repitiendo las mismas condiciones de incubación. Después se comprobó su morfología bacteriana y se les agregó glicerol (10%) para mantenerlos a $-20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso.

Ubicación taxonómica de las cepas bacterianas

Para ubicar taxonómicamente a los organismos utilizados en este trabajo, se llevó a cabo la caracterización fenotípica para determinar la morfología colonial y bacteriana. Para establecer algunas características metabólicas, se realizaron pruebas bioquímicas y por último se hizo el aislamiento y amplificación del gen 16s ARN para la identificación molecular.

Identificación morfológica

Para la identificación morfológica, se realizaron observaciones en microscopía óptica y electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) (Porte *et al.*, 2007).

Para determinar la morfología bacteriana, se tomó una muestra de un cultivo de 12 horas en MRS Broth, para *Lactobacillus* y *Enterococcus* y TSB para *Bacillus*, se cultivó en cajas petri con MRS Agar y TSB Agar, respectivamente. Se incubaron a $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 horas; al concluir el tiempo se observaron en un microscopio Nikon Labophot-2 utilizando la fase 3.

Posteriormente, para determinar la capa de peptidoglicano, se llevó a cabo la tinción de Gram. Para la tinción de Gram, se tomó una muestra proveniente de un

cultivo incubado por 18 horas. En campo estéril se destinaron 10 µL de la muestra sobre un portaobjetos, después, con ayuda de unas pinzas se pasó sobre la flama de un mechero Fisher para acelerar el proceso de fijación. Una vez fijada la muestra, se le añadió cristal violeta y se dejó actuar por 1 min, luego se enjuago el exceso con agua destilada. Después, se le agregó Lugol y se dejó durante 1 minuto para nuevamente enjuagar con agua destilada. Luego se le incorporó alcohol: acetona (1:1) para decolorar e inmediatamente se enjuago con agua destilada. A continuación, se le agregó safranina y se dejó por 1 minuto para finalmente volver a enjuagar. Se dejó secar al aire en la campana de extracción y se observó en un microscopio óptico Labophot-2 (Nikon) con objetivos de 40x y 100x (Gonzáles *et al.*, 2020).

Para evaluar las estructuras bacterianas, las muestras se analizaron con SEM. El análisis se realizó utilizando un microscopio JEOL JSM-6380LV modelo 7582. Para la fijación de las muestras, se basó en el trabajo de Ho *et al.*, (2019). El procedimiento fue el siguiente: las bacterias del género *Enterococcus* y *Lactobacillus* se dejaron incubar en medio de cultivo MRS por un lapso de 12 horas a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ en agitación. Una vez finalizado el periodo, se le adicionó 1.5 mL de esta muestra a tubos Eppendorf de 2 mL para después centrifugar en una centrifugadora refrigerada por un periodo de 5 min a 4000 rpm a una temperatura de 4°C . A continuación, la muestra se separó en dos partes, el sobrenadante simplemente se decantó y la pastilla se reconstituyó en un volumen de 1.5 mL de PBS (buffer fosfato salino). Posteriormente, se homogeneizó con ayuda de un vortex y se efectuaron 3 lavados en PBS. Luego se retomó la pastilla, se le agregó 1.5 mL de una solución de glutaraldehído al 2.5% (w/v) y se agitó durante 2 h a 120 rpm en un agitador orbital. Después se hicieron 3 lavados con PBS y la pastilla se reconstituyó en PBS en una proporción 1:10, se agitó durante un periodo de 12 h a $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Finalmente, cuando terminó dicho tiempo, se centrifugó a 4°C , 4000 rpm a lo largo de 5 minutos, con la pastilla recuperada se le efectuaron lavados consecutivos utilizando soluciones de 20, 50, 70 y 100 % de etanol absoluto. Finalmente, se evaporó el alcohol a temperatura ambiente.

Posteriormente, se fijó la muestra con oro y se realizaron las observaciones correspondientes.

Identificación bioquímica

Para la prueba de la catalasa se realizó siguiendo la metodología utilizada por Rodríguez (2009), para lo que se tomó una alícuota de una colonia sobre un portaobjetos (sin añadir agua). Después, se le agregó 10 µL de una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 10% y se observó la existencia de efervescencia. Finalmente, si presenta efervescencia el resultado es positivo y la ausencia se interpreta como un resultado negativo.

Posteriormente, para completar las pruebas bioquímicas se utilizó el kit “Sistema de Identificación BBL Crystal ID” (BBL Crystal GP ID), en el cual se siguieron las instrucciones del fabricante, posterior a las 24 horas, con base en una tabla adjunta de identificación de microorganismos se compararon los resultados obtenidos en este experimento con los datos de dicha tabla para reconocer la especie.

Identificación molecular

Así mismo, se realizó la amplificación del gen 16s ARN, el cual se realizó de un cultivo de la cepa y se incubó durante 24 horas a 40°C ± 1 con agitación. Se extrajo el ADN siguiendo el protocolo del kit “DNeasy Plant Mini Kit” (QIAGEN). Una vez extraído el ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para comprobar la calidad del ADN. Posteriormente, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para amplificar el segmento del gen 16S ARN, utilizando los primers 518f (5'CCAGCAGCCGCGGTAATACG 3'), 928r (5'CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 3') y U1115R (5'AGGGTTGCGCTCGTTGCG 3'), E334-16S-F (5'CCRRACTCCTACGGGAGGCAG C 3'). Por último, las muestras obtenidas se almacenaron a -20°C y se mandaron a secuenciar al laboratorio de Secuenciación de ADN de la UBIPRO, FES-I, UNAM.

Los resultados obtenidos de la secuenciación se visualizaron y se editaron en el Software Geneious Prime Versión 2024.0.4. Las secuencias obtenidas, fueron comparadas con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando “BLAST” (Basic Local Alignment Search Tool). Se elaboró el árbol filogenético utilizando el mismo Software.

A continuación, se construyó un árbol filogenético con 57 especies más los aislados correspondientes a *L. plantarum* y *E. faecium*. Para ello, primeramente, se realizó un alineamiento de secuencias múltiples utilizando Muscle con los datos obtenidos por la secuenciación PCR del 16s ARN. Después, se infirió la historia evolutiva de las secuencias utilizando el método Neighbor-Joining; para obtener el árbol óptimo, se agruparon utilizando la prueba de Bootstrap (1000 réplicas) y las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de 3 parámetros de Tamura utilizando el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versión 11. Todos los números de acceso de las cepas utilizadas se obtuvieron del GenBank.

X. Fase de tricotecenos

Cuantificación de tricotecenos

Los tricotecenos tipo A (toxina T-2, toxina HT-2, Neosolaniol (NEO) y Diacetoxiscirpenol (DAS) fueron proporcionados por el Laboratorio de Biogeoquímica de la UBIPRO, FES-I, UNAM. Se tomaron 100 µL, con ello se hizo una dilución 1:10 y posteriormente una dilución de 1:100 donde se inyectaron 1, 5 y 10 µL en HPLC-ESI-TOF-MS para obtener la concentración de cada una de las toxinas (Tanaka *et al.*, 2006).

Ensayo de inactivación de tricotecenos

Se realizaron un total de 3 ensayos diferentes para comprobar la inactivación bajo diferentes condiciones. En el primero se prepararon tubos de 9 mL con 4.5 mL de medio MRS a una concentración de toxina T-2 (1.11 ppm), toxina HT-2 (1.06 ppm) y NEO (0.552 ppm). A cada tubo se adicionaron 100 µL del cultivo de bacterias (3

cepas bacterianas). Cada muestra se colocó a 2 tiempos (1 y 18 h), 2 temperaturas (37 y 40 °C $\pm$ 1°C) y 2 condiciones (con y sin agitación) (**tabla 4**). Dicha evaluación se realizó triplicado.

Tabla 4. Especificaciones de los parámetros de temperatura, tiempo y condición para cada tratamiento.

Temperatura (°C)	Tiempo (h)	C/S agitación
37	18	Con agitación
	1	Con agitación
40	18	Sin agitación
	1	Sin agitación

Para el segundo ensayo se prepararon tubos de 9 mL con 4.5 mL de medio YPD y BHI a una concentración de toxina T-2 (1.11 ppm), toxina HT-2 (1.06 ppm) y NEO (0.552 ppm). A cada tubo se adicionaron 100 μ L del cultivo de bacterias dependiendo de la cepa en cuestión: *Bacillus* en YPD y *Enterococcus* en BHI. Cada muestra se colocó a 40°C $\pm$ 1°C en 2 condiciones (en agitación y sin agitación) durante un lapso de 24 horas. Dicha evaluación se realizó 3 veces.

Y finalmente, para el último ensayo, se tomó 100 μ L del cultivo de bacterias y se procedió a vaciar en tubos Eppendorf de 1.5 mL con 900 μ L de medio estéril respectivo para cada bacteria; es decir, para *Bacillus* fue TSB y tanto para *Enterococcus* como para *Lactobacillus* fue MRS. Se dejaron incubar de nuevo por 24 h manteniendo las mismas condiciones y una vez terminado el tiempo, se centrifugaron en una centrífuga refrigerada a 4000 rpm durante 5 min a fin de separar las bacterias (pastilla) del medio (sobrenadante). Dicho sobrenadante se decantó en viales estériles de 1 mL y se agregaron una concentración de toxina T-2 (1.11 ppm), toxina HT-2 (1.06 ppm) y NEO (0.552 ppm).

La pastilla se resuspendió en PBS (Phosphate Buffer Saline por sus siglas en inglés) estéril a fin de evitar crecimiento bacteriano. Se inactivaron las bacterias utilizando el método de esterilización en una autoclave a 121 °C por 20 minutos. Una vez inactivadas las bacterias, nuevamente se le agregaron las mismas concentraciones de las micotoxinas. Ambos experimentos se dejaron en agitación y a temperatura controlada a $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante un lapso de 24 horas.

Extracción de tricotecenos del cultivo de bacterias

Después del tiempo establecido, en cada tubo se agregó 1 mL de acetato de etilo y se agitó en un vortex por 30 segundos, se recuperó entre 0.8 mL del solvente (dependiendo de la separación de fases en cada tubo); para nuevamente agregar 1 mL de acetato de etilo y se agitó en el vortex para recuperar 1 mL. El solvente recuperado, se evaporó a sequedad en una campana de extracción. Posteriormente se resuspendió en dos pasos: la muestra, inicialmente en 750 μL de metanol, se almacenará en un tubo Eppendorf y se repitió este paso.

Análisis residual de tricotecenos

De los tubos Eppendorf donde se almacenó la muestra de cada tratamiento, se tomó 1 mL y se agregó en frascos viales de 1.5 mL para su análisis en el HPLC-ESI-TOF-MS, así mismo se inyectó un control. El análisis se realizó en modo fase reversa en un HPLC-ESI-TOF-MS (High Pressure Liquid Chromatography-Electrospray-Time of Flight-Mass spectrometry), en modo iones positivos usando un sistema HPLC (que consistió en un degasificador de vacío, automuestreador y bomba binaria) (Agilent 1260 Infinity, Agilent Technologies), equipado con una columna ZORBAX Eclipse Plus C18, 21,2 x 150 mm, 5 μm . La temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C. La fase móvil consistió en Acetato de amonio 0.01 M (A) y Acetonitrilo (B). El gradiente inició con un 80% de A y 20% de B, posteriormente cambió al minuto 15 a 95% de B y se mantuvo durante 10 min. La velocidad de flujo fue de 0.150 mL /min. El tiempo de estabilización de la columna al finalizar el análisis fue de 14 min. El volumen de inyección fue de 10 μL .

El HPLC se acopló a un TOF/MS (Agilent 66230 B) con interfaz electrospray. La temperatura del gas fue de 350 °C, el flujo del gas 6 L/min y la presión del nebulizador 50 psig, el fragmentor 105 V, skimmer 60 V y OCT RF Vpp 750 V, voltaje del capilar 4000 V. El software empleado fue Mass Hunter Workstation LC/MS Data Acquisition for 6200 series versión B.05.01 Build 5.01.5125.3 y de análisis Qualitative Analysis versión B.06.01 Build 6.0.633.10 (2012, Agilent Technologies; Tanaka *et al.*, 2006).

XI. Resultados

Los resultados son presentados por orden de aparición en la parte de material y métodos, es decir; primero toda la parte de microbiología (aislamiento, purificación e identificación) y luego la parte de tricotecenos (cuantificación y ensayos de inactivación).

Fase microbiológica

Aislamiento, purificación e identificación de *Enterococcus*

De la muestra biopro (la cual es un probiótico para ganado) se aisló y purificó la cepa bacteriana *E. faecium*. logró aislar una cepa bacteriana de las cuales lo componen y de acuerdo con los resultados obtenidos en la técnica de tinción de Gram se observaron bacterias que se tiñeron de un color violeta claro, indicando que pertenecen al grupo de bacterias Gram positivas. (González *et al.*, 2020) Para el caso de la prueba de la catalasa arrojó una nula efervescencia, lo que se interpreta como catalasa negativa, figura 15.

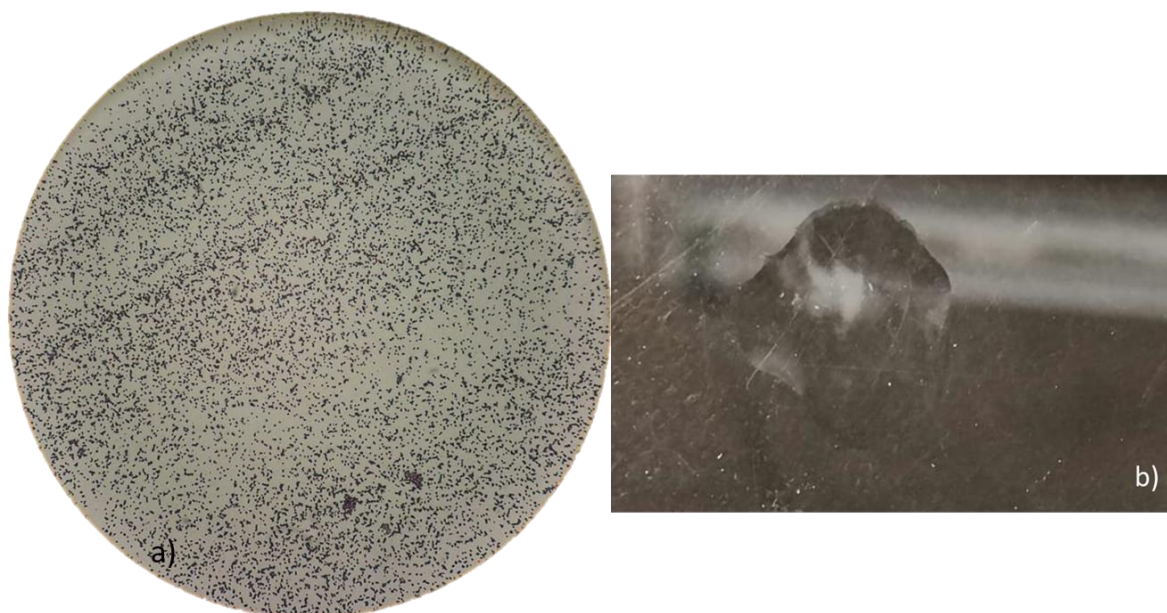


Figura 15. a) Tinción de Gram del aislado bacteriano del producto “biopro” con las características del género *Enterococcus*. **b)** Prueba de la catalasa con resultado negativo.

Además, la morfología presentada por la bacteria es en forma esferoidal, la mayoría se presenta en forma individual y algunas en par, características de las bacterias pertenecientes al grupo de cocos (Covo *et al.*, 2017). Por otro lado, a simple vista no se observó ninguna espora o movimiento alguno. Estas características concuerdan con las reportadas por Díaz *et al.*, en 2010, quienes indican que el género *Enterococcus* son cocos, Gram positivos, que no son formadores de endosporas, además ellos también indican que presentan células esféricas u ovóides (de aproximadamente 0.6 - 2 x 0.6 - 2.5 μ m de tamaño), se pueden presentar en forma de pares o de cadenas cortas y son catalasa negativa. Así mismo, la mayoría de las especies no son motiles. De igual manera, se reporta que el rango de temperatura para su crecimiento es de 10 a 45°C y generalmente crece en un caldo de cultivo con requerimientos nutricionales complejos, como el medio MRS.

Así mismo, al comparar los resultados de las demás pruebas bioquímicas realizadas por el kit “BBL Crystal ID” con el perfil bioquímico indicado en una tabla adjunta por el mismo kit, dio como resultado que la especie es *E. faecium* (**Tabla 5**).

La cepa aislada de la muestra biopro, indicada que pertenece al género *Enterococcus*, fue identificada mediante pruebas bioquímicas utilizando el “Sistema BBL CRYSTAL para Gram Positivos”. Dicha metodología fue elegida debido a que comparándola con otros sistemas (o kits) para la identificación de bacterias Gram positivas, permite identificar una gran variedad de especies distribuidas en aproximadamente 24 géneros, uno de los cuales es el mismo género *Enterococcus*. Dicho kit también cuenta con un porcentaje de identificación a nivel de especie correcta del 90%. Además, de que es relativamente sencilla de emplear y no tiene requerimientos de materiales y/o instrumentos adicionales complejos (Von *et al.*, 1998).

Tabla 5. Perfil bioquímico obtenido por parte del aislado de la muestra “biopro” perteneciente al género *Enterococcus* y comparado con el manual de identificación.

Prueba bioquímica	Manual de identificación	Resultado
Trehalosa	(90 % positivo)	Positivo
Lactosa	(90 % positivo)	Positivo
Metil alfa y Beta glucósido	V (26 - 74 % positivo)	Positivo
Sacarosa	(+) (75 - 89 % positivo)	Positivo
Manitol	(90 % positivo)	Positivo
Maltotriosa	(90 % positivo)	Positivo
Arabinosa	(90 % positivo)	Positivo
Glicerol	V (26 - 74 % positivo)	Positivo
Fructosa	(90 % positivo)	Positivo
P - nitrofenil - beta - D glucósido	(90 % positivo)	Positivo
P - nitrofenil - beta - D celobiosa	(90 % positivo)	Positivo
Prolina y leucina - P - nitroanilida	(10 % positivo)	Negativo
P - nitrofenil fosfato	(-) (11 - 25 % positivo)	Negativo
P - nitrofenil - alfa - D - maltosida	(90 % positivo)	Positivo
O - nitrofenil - beta - D galactosido (ONPG) y P nitrofenil - alfa - D - galactosido	(+)(75 - 89 % positivo)	Positivo
Urea	(10 % positivo)	Negativo
Esculina	(90 % positivo)	Positivo
Arginina	(90 % positivo)	Positivo

No obstante, con base al resultado del análisis filogenético, con un 37 % de Bootstrap relaciona a *E. faecium* con la especie *E. durans*, sin embargo, los valores menores a 50 % de Bootstrap sugiere una relación filogenética entre los nodos inexacta, por lo que el resultado es poco confiable. Si tomamos en cuenta los resultados obtenidos por la amplificación del 16S ARN con un 99.90 % de similitud en las pares de bases (pb) y las pruebas bioquímicas, podemos considerar a la especie como *E. faecium*. **Tabla 6.**

Tabla 6. Comparación de la secuencia del gen 16S ARN con la base de datos BLAST

J	Especie	E - valué	Query cover (%)	Identidad (%)	Numero de acceso Gen – Bank
1	<i>Enterococcus faecium</i> HBUAS664669	0	100	99.90	ON205711.1
2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 12731	0	100	99.58	MW445205.1

Por otro lado, en el caso de *L. plantarum* el valor de Bootstrap fue de 77 %. Los valores mayores a 50 % de Bootstrap nos sugiere aceptar con reservas la relación filogenética entre los nodos, sin embargo, al tomar en cuenta los resultados obtenidos en la secuencia del 16S ARN, con un 99.58 % de similitud, podemos afirmar que la especie pertenece a *L. plantarum*, Figura 16.

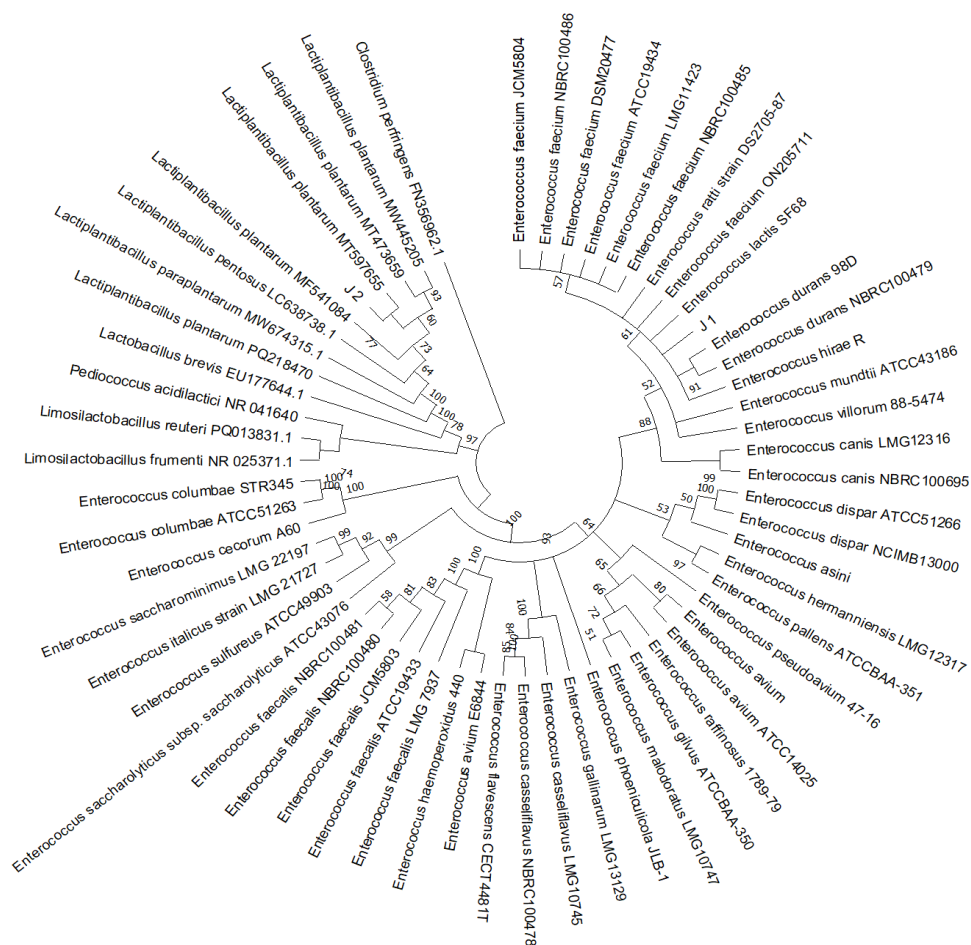


Figura 16. Árbol filogenético que muestra el parentesco de la muestra aislada del producto “biopro” (J1) con otras especies del género *Enterococcus*.

En el caso de las cepas del género *Bacillus* y *Lactobacillus*, donadas por parte del CCBIZTA, se le realizaron tinción de Gram y prueba de catalasa para verificar su género. Se identificó al género *Bacillus*, ya que se observó una morfología bacilar, es decir, en forma de bastón y de acuerdo a la tinción de Gram, pertenece al grupo de las Gram positivo. Para la prueba de la catalasa, el resultado obtenido fue la presencia de una abundante efervescencia, lo que indica que es positiva, figura 17.

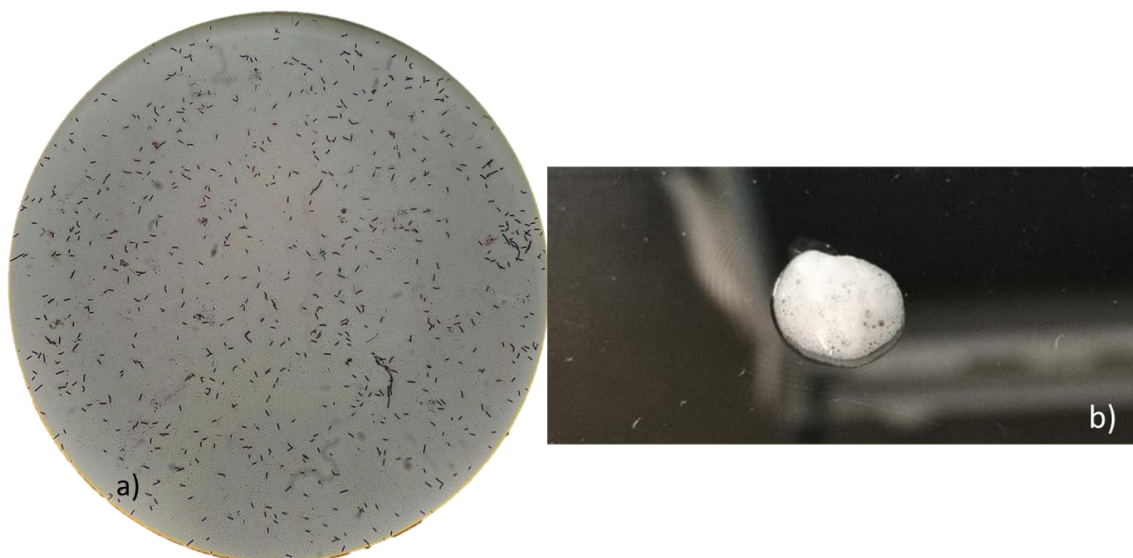


Figura 17. a) Tinción de Gram del género *Bacillus*. **b)** Prueba de la catalasa con resultado positivo.

En el caso de la cepa donada perteneciente al género *Bacillus*, el medio utilizado para su crecimiento fue soya tripticasa (TSB). Uno de sus componentes principales es la soya en forma de digerido papaico de harina de soya. Debido a que en algunos estudios informan que el empleo de soya, que es la fuente de nitrógeno, en medios de cultivo benefician tanto el crecimiento como esporulación de *Bacillus subtilis*.

Al observarse la morfología bacteriana con el microscopio óptico, fue bacilar (forma de bastón), con una aparente movilidad y presencia de estructuras redondeadas dentro de la bacteria (lo que se sugiere que son sus endosporas) y catalasa positiva, características indicadas por Villareal *et al.* (2018) y Sneath *et al.* (1986).

La otra cepa donada con indicaciones de pertenecer al género *Lactobacillus*, dio como resultado a la tinción de Gram, Gram positivo y su morfología fue bacilar (con forma de bastón), pero a diferencia de la de *Bacillus*, también presenta un contorno arriñonado o curvo y en la prueba de catalasa el resultado fue negativo, lo cual, aunado a la morfología verifica características concordantes con el género *Lactobacillus*, **figura 18**.

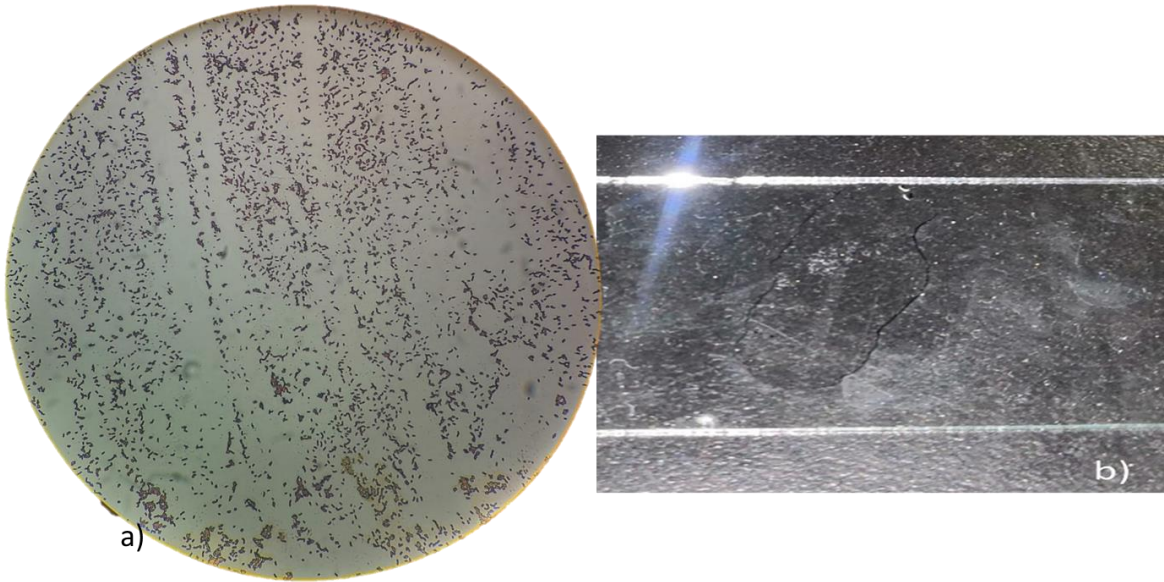


Figura 18. a) Tinción de Gram del género *Lactobacillus*. **b)** Prueba de la catalasa con resultado negativo.

Finalmente, las características morfológicas observadas a través de la tinción Gram concuerdan con las descritas en el trabajo de Abdul *et al.* en 2016, es decir Gram positivos con forma de bastones (bacilos) cortos (aunque también pueden encontrarse algunos largos), agrupados en cadenas, sin movilidad ni esporas. Además, de ser catalasa negativa. Esta descripción también es corroborada por lo mencionado por Ücok y Sert en 2020, la cual menciona que son bacterias bacilares con los contornos redondeados presentando células solitarias, en pares o en cadenas.

Análisis morfológico mediante el uso microscopía electrónica de barrido

En el análisis por SEM, se observó de mejor manera la morfología bacteriana de cada cepa. En el caso de *Enterococcus* fue ovoide (coco), para *Bacillus* fue en forma de bastón (bacilar) y para *Lactobacillus* fue bacilar arriñonada. **Figura 19.**

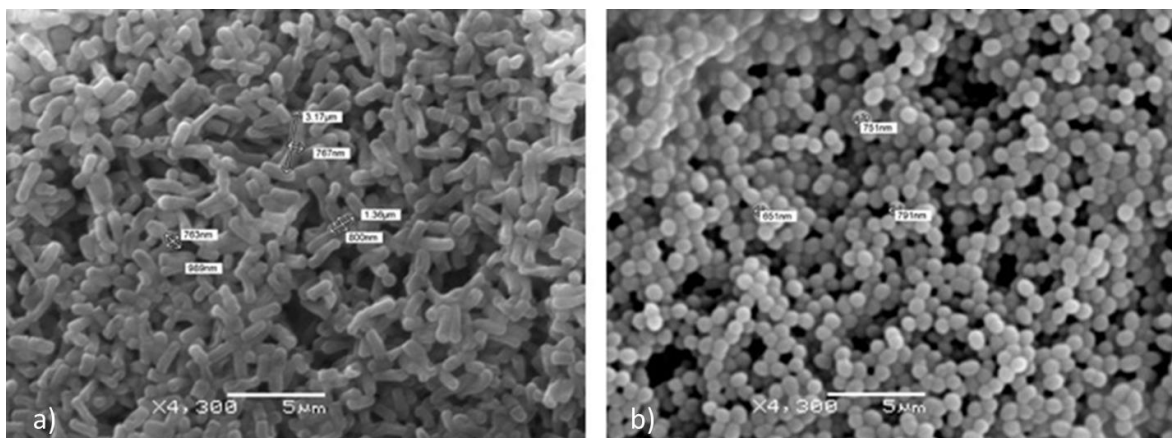


Figura 19. a) Morfología bacteriana de *Lactobacillus plantarum*. **b)** Morfología bacteriana de *Enterococcus faecium*. Condiciones de observación: JSM-5310 LV, JEOL, Voltaje de aceleración 20 kV, Distancia de trabajo (WD) 20.0mm, Electrones secundarios (SE), Ampliación X4, 300, Condiciones HV

XII. Fase de tricotecenos

Identificación de los tricotecenos y cuantificación

De la muestra cultivada en medio BHI del tratamiento con agitación a 24 horas, se lograron identificar 4 tricotecenos mediante su ion molecular, los cuales son:

Tabla 7. Identificación de los tricotecenos por su ion molecular (peso molecular + ion amonio (NH_4)).

Micotoxina	Ion molecular (m/z)
Diacetoxiscirpenol (DAS)	384.20
Neosolaniol (NEO)	400.19
Toxina HT-2	442.24
Toxina T-2	484.25

Además, en la cuantificación de tricotecenos se obtuvo el cromatograma donde se observó una mayor cantidad de toxina T-2, seguida de toxina HT-2 y neosolaniol (NEO). Así mismo solo se identificó el diacetoxiscirpenol (DAS) pero no se pudo cuantificar (**Figura 20**).

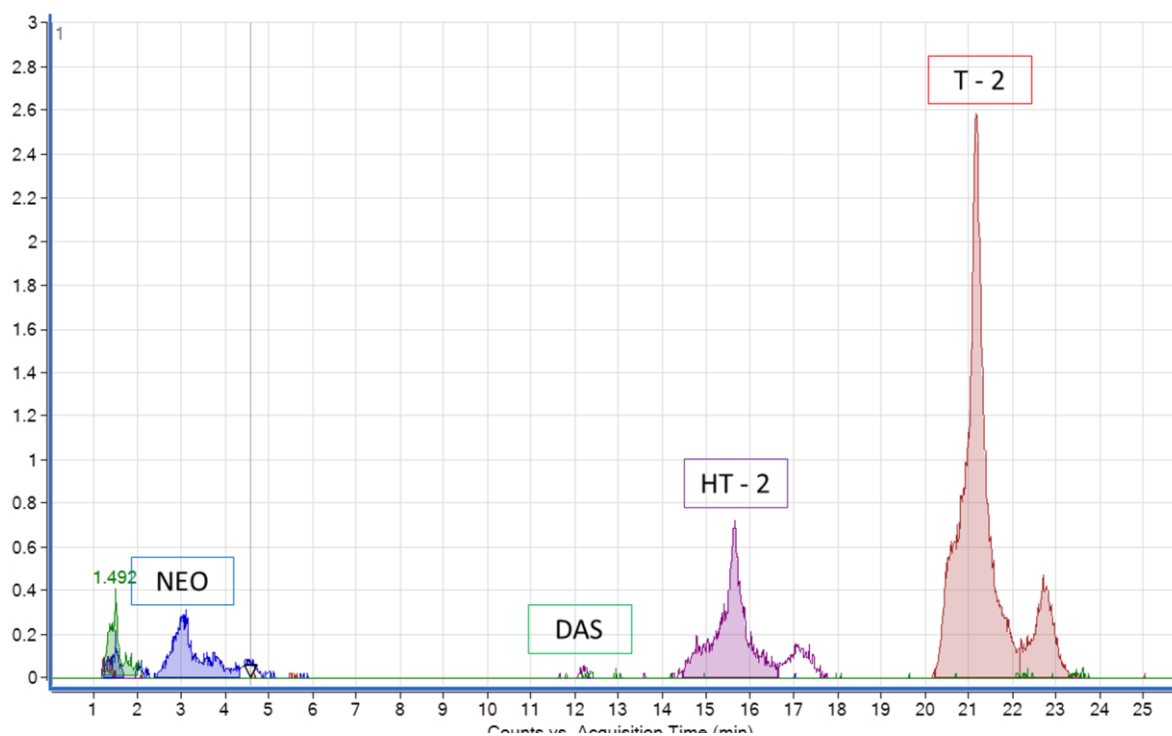


Figura 20. Cromatograma obtenido por la técnica HPLC-ESI-TOF-MS de la muestra cultivada en medio BHI del tratamiento con agitación a 24 horas.

La técnica HPLC-ESI-TOF-MS se consideró la más óptima debido al fundamento que presenta, el cual en resumen ioniza y divide las moléculas en iones de menor masa, lo que nos permite identificar y cuantificar el ion molecular específico de cada tricoteceno, no importando si en la muestra existen más de 2 tipos diferentes (como fue el caso de este experimento, que presentaba hasta 4: NEO, DAS, T-2 y HT-2) y no necesariamente en concentraciones altas, ya que su límite de detección abarca hasta picogramos (Landa, 2003).

Todos los 6 ensayos de inactivación bajo diferentes condiciones se ajustaron mediante una regla de 3 para que, independientemente de la concentración que presentaba la muestra inyectada en el HPLC, la toxina T-2 quedará a una concentración final de 1 ppm y asimismo las demás concentraciones de las demás toxinas, es decir, HT-2 y NEO quedaron de 0.23051 y 0.09126 ppm, respectivamente.

Ensayo de disminución de tricotecenos

Aquí, los resultados fueron presentados por orden de descripción en material y métodos. El primer experimento fue la comparación de tiempo, temperatura y agitación. En el segundo experimento fue la comparación de con y sin agitación y el tercer experimento fue la comparación de medio de cultivo y PBS.

Baño a 37 °C

En este primer experimento se utilizó el consorcio bacteriano de la muestra “biopro”. Para el tiempo de 18 hrs dio como resultado una inactivación de alrededor de 353 nM para NEO, 392 nM para HT-2 y 467 nM para T-2. Para el tiempo de 1h dio como resultado una inactivación de aproximadamente 301 nM para NEO, 353 nM para HT-2 y 411 nM para T-2. **Figura 21.**

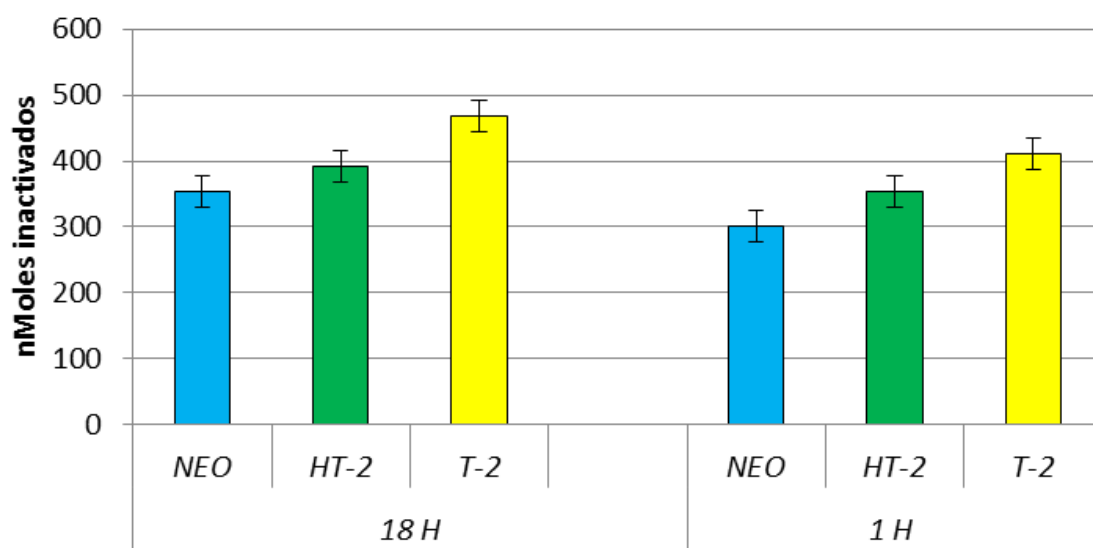


Figura 21. Inactivación de tricotecenos por parte del consorcio bacteriano de la muestra “biopro” en agitación a 37°C.

Estufa a 40 °C

Igual se utilizó todo el consorcio bacteriano de la muestra “biopro”. Para el tiempo de 18 hrs dio como resultado una inactivación de alrededor de 315 nM para NEO, 152 nM para HT-2 y 250 nM para T-2. Para el tiempo de 1h dio como resultado una inactivación de aproximadamente 293 nM para NEO, 500 nM para HT-2 y 431 nM para T-2. **Figura 22.**

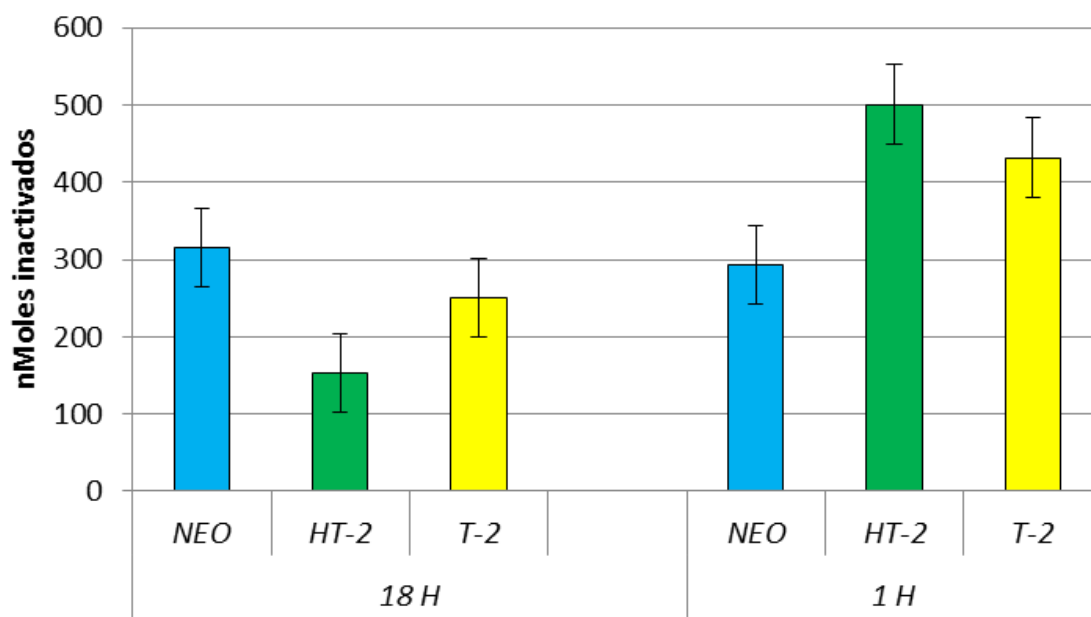


Figura 22. Inactivación de tricotecenos por parte del consorcio bacteriano de la muestra “biopro” sin agitación a 40°C.

El tratamiento del primer experimento, es decir; temperatura a 37°C y agitación, son condiciones óptimas para las bacterias en general (incluidas nuestras cepas) y las del segundo, es decir; a 40°C y sin agitación, son condiciones que están dentro de los rangos de crecimiento de nuestras cepas. Además de que, está pensado en su aplicación a pollos de engorda (la temperatura reportada del intestino de pollo es de 40°C). Con los resultados observados, se intuye que no existe diferencia entre la temperatura utilizada, ya que ambas temperaturas están dentro del intervalo a la que pueden crecer las cepas.

Con agitación 24 h

Aquí ya se utilizó el aislado de la muestra biopro perteneciente al género *Enterococcus*. Esta cepa dio como resultado que T-2 fue la que obtuvo una mayor inactivación con 0.062 nM. Seguido de la HT-2 con una inactivación de 0.047 nM y una aparente nula inactivación de NEO (0 nM).

Para *Bacillus*, se observó que hubo una aparente nula inactivación en contra de las 3 toxinas. No obstante, la desviación estándar salió de gran valor lo que nos

indica que existe mucha variación con respecto a diversos factores que no se tomaron en cuenta como el pH, el medio de cultivo, etc. **Figura 23.**

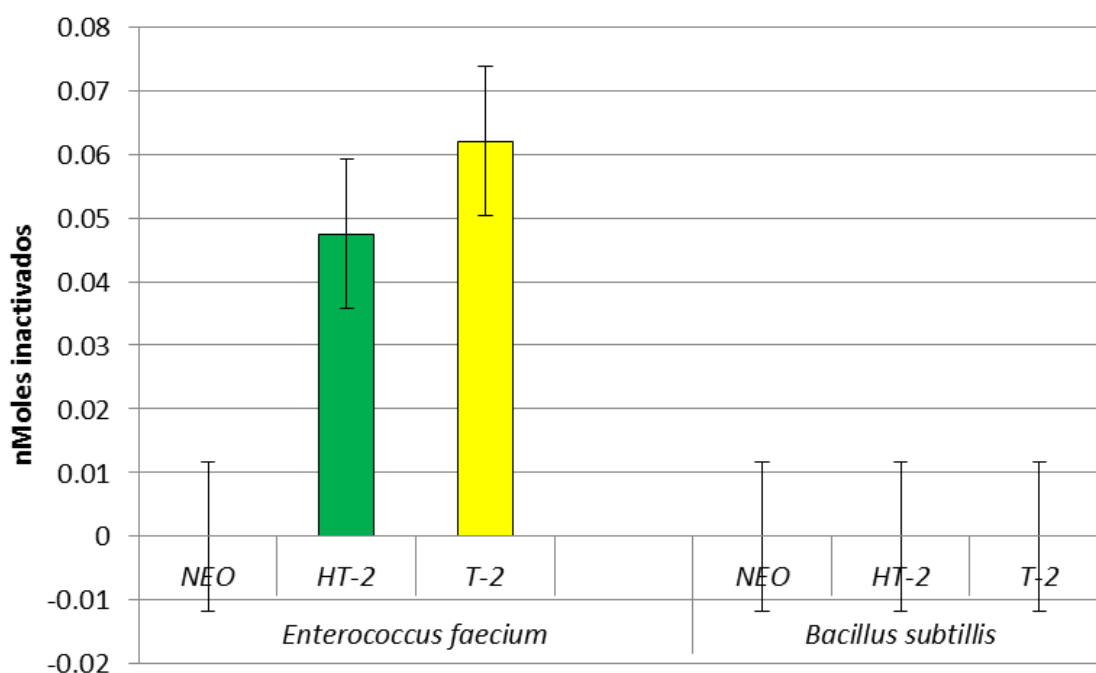


Figura 23. Inactivación de tricotecenos por parte de *Enterococcus* y *Bacillus* en agitación a 40°C.

Sin agitación 24 h

En el caso de *Bacillus*, al contrario del tratamiento pasado, existió una inactivación de T-2 y HT-2, con un porcentaje de aproximadamente 0.03 nM y 0.15 nM respectivamente. De NEO al parecer no presentó inactivación. Caso contrario con la cepa de *Enterococcus*, en donde todas las toxinas fueron inactivadas siendo que NEO (0.19 nM) tuvo el mayor porcentaje seguido de HT-2 (0.16 nM) y finalmente de T-2 (0.1495 nM). **Figura 24.**

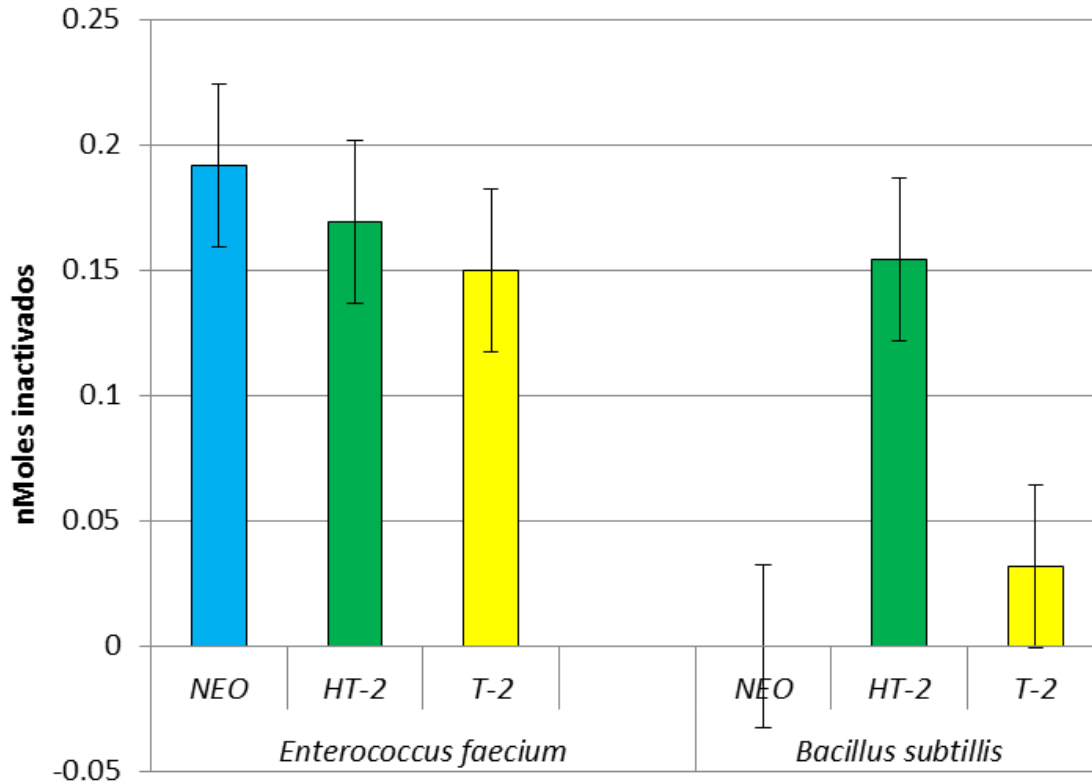


Figura 24. Inactivación de tricotecenos por parte de *Enterococcus* y *Bacillus* sin agitación a 40°C durante 24 hrs.

Para el caso de *Bacillus*, fue bajo o nulo el porcentaje de disminución, se supone que es debido a que algunos tricotecenos como T-2 pueden tener un efecto retardante y/o inhibitorio en algunas cepas bacterianas. Además de que el medio pudo haber interferido con la unión, ya que el utilizado en este caso fue YPD y no MRS como el tratamiento anterior.

Por el contrario, los porcentajes nulos de disminución por parte de *Enterococcus* se piensa que fue debido a que los ensayos fueron realizados en medio BHI y esto generó una alteración en los componentes que forman la pared celular bacteriana lo que, a su vez, afectaría la unión al tricoteceno.

Medio 24 h

En el ensayo que se realizó con medio por 24 hrs, se encontró que ninguna de las 3 bacterias inactivó a NEO. En el caso de *Bacillus*, inactivó a T-2 (1.59 nM). *Lactobacillus* y *Enterococcus*, inactivaron a HT-2 y T-2. Para *Lactobacillus* inactivo

0.16 nM de HT-2 y 1.80 nM de T-2. Mientras que *Enterococcus* inactivo un 0.03 nM de HT-2 y 1.68 nM de T-2. **Figura 25.**

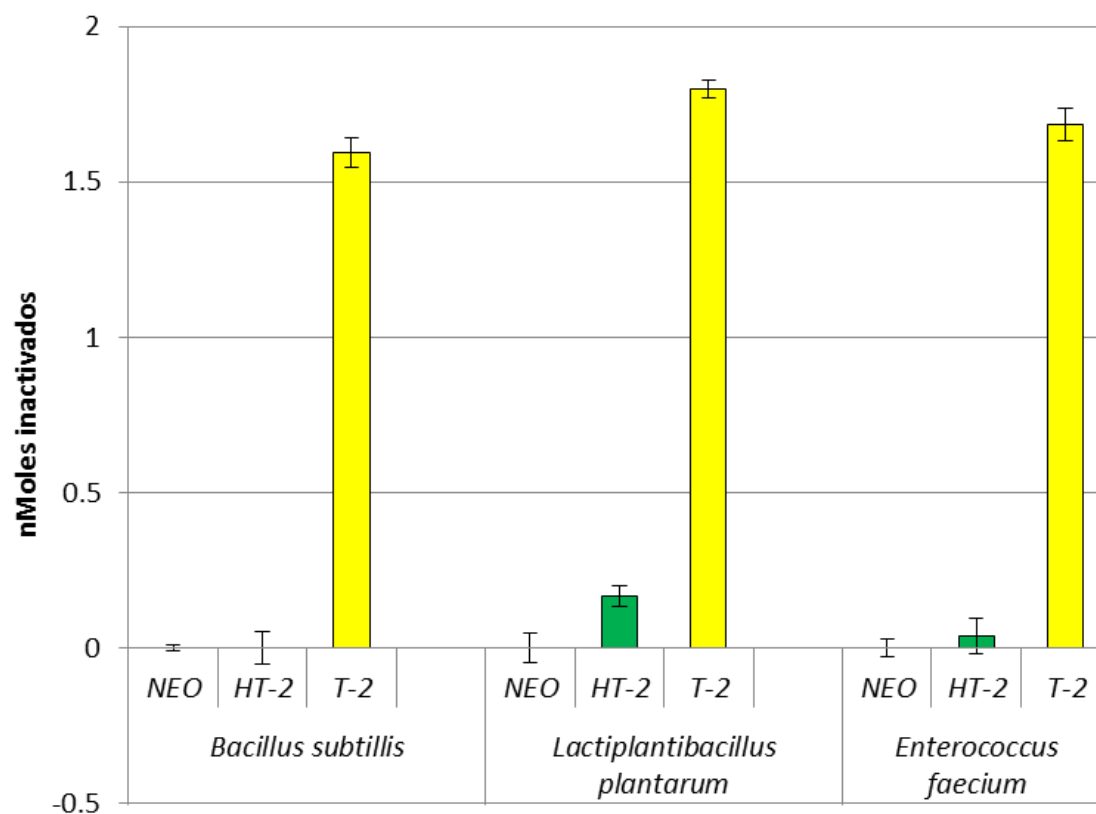


Figura 25. Inactivación de tricotecenos por parte de *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Enterococcus* en medio MRS y TSB a 40°C durante 24 hrs.

PBS 24 h

En el ensayo que se realizó con buffer de fosfatos salino (PBS) por 24 hrs, se observó que ninguna de las 3 bacterias inactivó a NEO. En el caso de *Bacillus*, a diferencia del ensayo anterior, inactivo a HT-2 (0.12 nM) y T-2 (1.67 nM). *Lactobacillus* y *Enterococcus* inactivaron a HT-2 y T-2. Para *Lactobacillus* inactivo 0.11 nM de HT-2 y 1.66 nM de T-2 y para *Enterococcus* inactivo 0.17 nM de HT-2 y 1.69 nM de T-2. **Figura 26.**

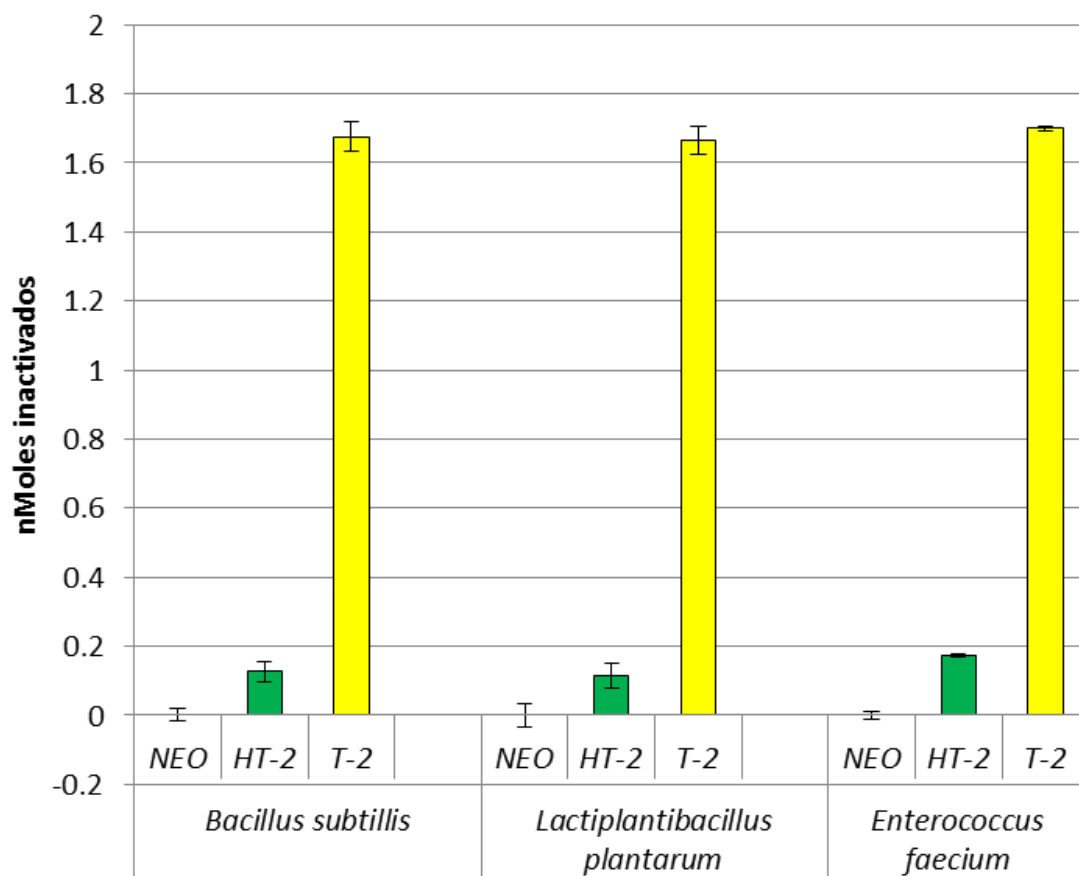


Figura 26. Inactivación de tricotecenos por parte de *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Enterococcus* en PBS a 40°C durante 24 hrs.

Se encontró que todas las bacterias presentan una capacidad de inactivar tricotecenos (a excepción de NEO), tanto de medio con bacterias como con solo paredes celulares en PBS. Se considera que es debido a los diversos mecanismos de desintoxicación que presentan las BAL sobre las micotoxinas, como lo son la adsorción y la biotransformación.

A pesar de que no se conoce con exactitud cómo es que funcionan estos distintos mecanismos de inactivación, se sugiere que para la biotransformación las enzimas producidas por las BAL juegan un papel importante generando distintas reacciones químicas modificando la estructura original de la toxina. Mientras que para el mecanismo de adsorción se reporta que la micotoxina interactúa con los carbohidratos presentes en la pared celular a través de enlaces hidrofóbicos. De

igual manera, se ha reportado que los grupos funcionales que contienen las paredes celulares son las responsables de la adsorción con la micotoxina.

Un caso aparte es el de *Bacillus*, ya que a pesar de que el género no es perteneciente al grupo de BAL, se encontró que tanto en medio de cultivo como en PBS (el cual contenía paredes celulares) logró una inactivación de tricotecenos. Esto sugiere que ocurrió debido a una adsorción, ya que las especies del género *Bacillus* son bacterias Gram positivas (al igual que las BAL, como *Lactobacillus* y *Enterococcus*), lo que conlleva a tener componentes similares en su pared celular permitiendo la unión de la bacteria con los tricotecenos.

Con respecto a nuestros resultados que aparentan ser inexistentes con la inactivación de la toxina neosolaniol, se puede especular que dichos resultados fueron causados por una variedad de factores, como por ejemplo el aumento en la concentración de la micotoxina (mayor concentración, menor inactivación) y el tipo de micotoxinas presentes en la muestra (cierta afinidad de algunas micotoxinas). Otro factor que podría intervenir sería la cepa bacteriana utilizada (si está purificada o en consorcio) y el medio utilizado (pudo alterar la composición de los componentes de la pared celular bacteriana). Un factor adicional para tomar en cuenta sería el estado fisiológico de las BAL (algún tratamiento previo de las bacterias) y el pH (dependiendo del valor del pH, es la cantidad de inactivación).

XIII. Discusión

Aislamiento e identificación de microorganismos

A) Género *Enterococcus*

El uso del antibiótico amikacina, permitió la purificación del cultivo al anular posibles contaminaciones por bacterias aerobias Gram negativas. Se utilizó este antibiótico ya que está indicado para el tratamiento de infecciones por bacterias Gram negativas, no obstante, también está indicada para algunas Gram positivas (por ejemplo, estafilococos). Su mecanismo de acción se basa en la unión a la subunidad 30s del ribosoma bacteriano, provocando que haya una deficiente traducción de proteínas y a su vez, generando proteínas anómalas, dañando así la membrana citoplasmática y después la muerte celular (Ramírez y Tolmasky, 2017). De igual manera, se sabe que la especie que aislamos (*E. faecium*) presenta una enzima (Aac A4), la cual le permite poseer cierta resistencia a dicho antibiótico (Ramírez y Tolmasky, 2010).

De igual forma, el resultado de identificación de la especie: *E. faecium*, es comparable al descrito por Méndez (2018), quien utilizó el mismo sistema BBL Crystal para identificar cepas de Gram positivas de un cepario, incluyendo géneros como *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, en donde identificó una cepa de este último género como la especie *E. faecium* con un 99% de confiabilidad.

Por otro lado, para poder identificar a los organismos microscópicos, existen diferentes estrategias que pueden utilizar caracteres fenotípicos, bioquímicos, fisiológicos, serológicos y características genotípicas, por ejemplo, la secuenciación. En el caso de los primeros métodos, presentan una serie de dificultades que dependiendo de la bacteria pueden ser ineficaces para su identificación, como pueden ser las diferencias observadas entre las características morfológicas o bioquímicas (Bou *et al.*, 2011). En cambio, con los métodos genotípicos, al tener varias ventajas como pueden ser su rapidez y alta

eficacia al momento del análisis que puede llegar hasta el nivel de identificación de subespecie han tenido un destacado desarrollo, sin embargo, en algunas cepas se puede presentar una elevada homología genética, lo que dificulta también su posible identificación (Sauer *et al.*, 2008; Estrada, 2014). No obstante, ambos métodos coadyuvan a conocer la taxonomía de la especie en cuestión, es por ello por lo que se decidió complementar la identificación por pruebas bioquímicas con una prueba molecular adicional, la cual es la identificación por secuenciación del gen ribosomal (ARNr) 16s.

El gen 16s ARNr es la región más utilizada para estudios filogenéticos y taxonómicos en temas de clasificación bacteriana. El cual se caracteriza por poseer una longitud aproximada de 1500 pares de bases (pb). También se caracteriza por estar presente desde tiempos remotos y es altamente conservado hasta las bacterias recientes, asimismo, su estructura es persistente lo que causa qué posibles cambios sean producto de modificaciones al azar y lentas. De igual forma, el proceso de secuenciar es considerado sencillo de llevar a cabo, existen variadas bases de datos que frecuentemente están siendo complementadas (Rodicio y Mendoza, 2004).

Dicha metodología de secuenciación ha sido manejada diversas veces para identificar bacterias de todo tipo en diferentes trabajos, por mencionar algunos, Calisaya (2017) pudo identificar una cepa del género *Klebsiella*, Diana *et al* (2019) logró identificar diferentes cepas del género *Staphylococcus*, utilizando esta misma metodología. También existen trabajos de identificación de BAL, por ejemplo, el elaborado por Domingos *et al.*, (2017) en el cual pudieron reconocer cepas del género *Enterococcus* y *Lactobacillus* con un 99% de similitud. Estos resultados son comparados con los reportados por Avni *et al.*, (2016) los cuales reconocieron más cepas de BAL entre las cuales se encuentran los mismos géneros anteriores. Otro trabajo que verifica la misma identificación por dicho método es el hecho por Silva *et al.*, (2022) en donde identificó distintas cepas de BAL en quesos artesanales, cabe destacar que aquí se lograron identificar las especies *E. faecium* y *L. plantarum*.

Confirmándose que con el nombrado análisis molecular se puede identificar las especies de los géneros utilizados en este estudio. No obstante, con respecto al árbol filogenético, está reportado que existen similitudes muy altas entre secuencias del ADNr 16S entre especies del mismo género, lo que dificulta la identificación entre cepas, aun así, debido a sus ventajas como lo es su poca mutabilidad y su presencia en bacterias, dicho gen es el óptimo para su utilización.

En el análisis molecular, en base al valor de bootstrap (37 %) se encontró que nuestra cepa está más emparentada con la especie *E. durans*. Esto se sugiere que es debido a la taxonomía del género, ya que ambas especies pertenecen al mismo grupo (especies faecium) de entre las cuales destacan *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundit* y *E. villorum*. Sin embargo, como el valor de bootstrap fue menor a 50%, se interpreta como una relación imprecisa entre ambas cepas. Además, Devriese *et al.*, 2002, indica que las cepas pertenecientes a este grupo poseen un rango de 98.8 % a 99.7 % de similitud del gen ARNr 16s. No obstante, con base a las pruebas bioquímicas, está reportado que algunas reacciones son diferentes entre *E. faecium* y *E. durans*, por ejemplo, el manitol, arabinosa y sacarosa son positivas para *E. faecium* mientras que para *E. durans* son negativas, lo que se intuye que nuestra cepa podría pertenecer a la especie *E. faecium*.

B) Género *Bacillus*

Para el caso de *Bacillus* se utilizó el medio soya tripticasa (TSB), el cual, con base en algunos estudios, indican que la soya contribuye con su crecimiento. Por ejemplo, en el estudio realizado por Ramos (2014) utilizó 2 medios para crecer a *B. subtilis*, uno fue un medio de soya formulado con proteína de soya, extracto de levadura y NaCl y el otro fue el caldo Luria Broth (LB). Comparó a ambos con parámetros de crecimiento y esporulación encontrando que ambos parámetros fueron mejores usando el medio de soya.

Otros estudios que confirman la utilización de soya fueron los realizados por Chen *et al.*, (2009) reportando que un medio formulado con harina de soya para la esporulación de *B. subtilis* produce formación de esporas altas. Así mismo,

Sarmiento en 2012, nuevamente utilizó medio de soya y LB para el crecimiento de *Bacillus*, confirmando que un medio con soya prolifera el crecimiento y formación de esporas. Además, el rango de crecimiento se encuentra entre 30 y 40°C (Difco Laboratories, 1998; Calvo y Zuñiga, 2010).

Por otro lado, con base a los resultados obtenidos en la técnica de tinción de Gram se observaron bacterias que se tiñeron de un color azul - violeta, indicando que pertenecen al grupo de bacterias Gram positivas (González *et al.*, 2020). Además, la morfología presentada por las colonias fue en forma mucóide y rugosa, sus bordes fueron ondulados y abarcaban gran parte del medio, dichas características concuerdan con lo reportado por Realpe *et al.*, (2002).

C) Género *Lactobacillus*

En todos los estudios se realizaron en medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS). De igual manera, el medio fue utilizado para su crecimiento debido a que está indicado para el crecimiento tanto de Lactobacilos como de otras BAL, ya que entre sus componentes contiene peptona y dextrosa (lo que les proporciona la fuente de carbono y nitrógeno) que estimula su desarrollo y como también contiene mono oleato de sorbitan, acetato, magnesio y manganeso, son inhibidores de algunos cuantos microorganismos ajenos a los lactobacilos, aunque el principal es el citrato de amonio, el cual inhibe Gram negativas (Difco Laboratories, 1998). Por otro lado, debido a la gran cantidad de componentes, también puede hacer crecer otras bacterias con requerimientos nutricionales complejos, como las BAL, además de que está reportado que, por su diminuta selectividad, es posible el desarrollo de otros géneros como *Weissella* (Fusco *et al.*, 2015), *Streptococcus*, *Lactococcus* (Renyé *et al.*, 2011) y el mismo *Enterococcus* (Silva *et al.*, 2022). Es debido a lo anterior que también se utilizó el mismo medio para ambas cepas.

Cuantificación de tricotecenos

Debido a la gran variedad de micotoxinas que existen, las cuales presentan estructuras químicas particulares para cada grupo, no se encuentra una única o

general metodología para el análisis de micotoxinas, sino que va a depender de cuál grupo se esté estudiando en cuestión. Para el caso de los tricotecenos, existen varios métodos para su estudio, entre los cuales incluyen la cromatografía en capa fina, espectrofotometría de ultravioleta - visible, cromatografía de líquidos de alta resolución, electroforesis capilar de zona, técnica de ELISA y cromatografía de gases (Landa *et al.*, 2016).

Sin embargo, todas las metodologías anteriores presentan ciertas limitantes para su realización, entre las cuales destacan que necesitan concentraciones altas para su detección, algunos tricotecenos no poseen cromóforos en su disposición química por lo que son difíciles de percibir con la luz UV y debido a su estructura, algunas técnicas son específicas para tricotecenos de tipo B. No obstante, existe otro método de análisis: la Espectrometría de Masas, el cual fue utilizado tanto para la identificación y cuantificación residual de los tricotecenos.

Por otro lado, se identificaron los 4 diferentes tipos de tricotecenos de forma evidente por su ion molecular, estos mismos resultados concuerdan con el estudio realizado por Magdaleno (2021), en donde utilizando la misma técnica de identificación, logró identificar a la toxina T-2 y toxina HT-2 en base a su ion molecular, los cuales fueron de 484.2538 m/z y 442.2349 m/z para cada toxina respectivamente. Así mismo, esto se corrobora con los datos reportados por Nielsen y Smedsgaard (2003), donde indican valores similares de cada ion para identificar cada respectiva toxina. Además de que la concentración colocada en este trabajo para la identificación fue en nanogramos, superando el límite mínimo para su detección, el cual es en picogramos en base a los datos reportados por el mismo estudio de 2003.

Disminución de micotoxinas por bacterias (BAL)

Experimento 1 (37°C) Y 2 (40°C):

Como al menos 2 de las cepas trabajadas en este experimento, pertenecen al grupo de las BAL, es idóneo pensar que pueden presentar actividad de

inactivación en contra de micotoxinas. Tal y como se encontró en nuestro estudio, en donde en consorcio bacteriano fue capaz de inactivar los 3 diferentes tricotecenos. Así como se ha reportado el uso de bacterias ácido lácticas (BAL) para disminuir no solo tricotecenos, sino también aflatoxinas, por ejemplo Haskard *et al.*, (2001) evaluó la capacidad de desintoxicación de aflatoxinas (AFB₁) de 5 cepas de *Lactobacillus* sobre medios líquidos, encontrando que al menos 2 cepas bacterianas desintoxicación hasta un 80 % de la micotoxina. Otros estudios que han utilizado las BAL para la adsorción de micotoxinas (OTA) incluyen al realizado por Mateo *et al.*, (2010) utilizaron la especie *Oenococcus oeni* contra OTA (0.002 µg/mL), resultando en una disminución del 67% y también el hecho por Abrunhosa *et al.*, (2014) utilizaron la especie *Pediococcus parvulus*, la cual fue inactivada térmicamente, encontrando un 1.3% de adsorción de OTA (1 µg/mL). Asimismo, El-Nezami *et al.*, (2002) mostraron que una cepa de *Lactobacillus* (*L. rhamnosus* GG) elimina hasta un 70% de zearalenona (ZEA) de medios líquidos. Confirmándose que las bacterias ácido lácticas pueden disminuir fusariotoxinas de medios líquidos como en este trabajo. Así mismo, se ha demostrado que las BAL son capaces de sintetizar una amplia variedad de compuestos que afectan el crecimiento fúngico y también la síntesis de micotoxinas (Crowley *et al.*, 2013).

Experimento 3 (agitación) y 4 (sin agitación):

Para *Bacillus*, se observó una poca o nula inactivación, se sugiere que es producto de algún efecto inhibitorio por parte de la toxina T-2 a algunas bacterias, como lo indica en un estudio realizado por Böhm *et al.*, en el 2000, encontrando que DAS y T-2 tiene efectos negativos en el crecimiento cuantificado en UFC por parte de cepas de *Lactobacillus* y *Bacillus*. Asimismo, Ali-Vehmas *et al.* en 1998, indica que algunas micotoxinas (T-2, DON, OTA, AF1 y FB1) pueden inhibir o afectar el crecimiento de algunos géneros bacterianos.

Por otra parte, *Bacillus* según lo reportado por Calvo *et al.*, (2008) se encuentra localizado en la rizosfera (siendo la mayoría de las especies saprofitas) formando parte de la microbiota donde de igual manera se encuentra en micelio de hongos (entre ellas levaduras). El medio que fue utilizado fue el YPD, el cual es un medio

generalista pero que se utiliza para mantener y propagar levaduras, sin embargo, al contener extracto de levadura, este estimula también el crecimiento bacteriano.

Enterococcus obtuvo nula inactivación, se sugiere que es debido a que el medio pudo interferir con los componentes de la pared celular bacteriana. Con lo anterior, se corrobora con el experimento 1 y 2 donde se utilizó medio MRS para el ensayo y si mostró una disminución de la concentración de tricotecenos. Al mismo tiempo, esto se comprueba con el estudio realizado por Piotrowska en 2014, donde reportó que cepas de *Lactobacillus* en medio MRS eliminaron un 35% de ocratoxina (A) en comparación con un tampón fosfato.

Enterococcus generalmente crece en un caldo de cultivo con requerimientos nutricionales complejos; debido a que el medio BHI (el cual se utiliza para el cultivo de microorganismos anaerobios o aerobios exigentes con numerosos requerimientos) contiene peptona de carne y gelatina, además de dextrosa y propiamente la infusión de cerebro y corazón, le suministran los elementos necesarios para su crecimiento (Vallejo *et al.*, 2008; Difco Laboratories, 1998).

Experimento 5 (medio de cultivo) y 6 (PBS):

En el caso de *Enterococcus*, se encontró que tiene capacidad de inactivar tricotecenos, tanto de medio con bacterias como con solo paredes celulares en PBS. Estos resultados son comprobados por variedad de artículos que han utilizado diferentes especies del mismo género (principalmente *E. faecalis* y *E. faecium*) para evaluar la capacidad de inactivación en diferentes micotoxinas (Topcu *et al.*, 2010; Hatab *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2015). La composición de la pared celular de *E. faecium* es clave en la unión en comparación con otras BAL. No obstante, como estos enlaces son débiles, el complejo que se formará entre micotoxina y pared celular sería inestable (El-Nezami *et al.*, 2004). Al igual que de entre todos los componentes característicos de una pared celular de una bacteria de tipo Gram positiva (una membrana citoplasmática que contiene variedad de proteínas, ácidos lipoteicoicos y teicoicos, polisacáridos y una capa gruesa de peptidoglucanos), los que destacan son los polisacáridos y peptidoglucanos por ser los que juegan un papel fundamental en la unión (Chapot y Kulakauskas,

2014). No obstante, las posibles variaciones en las adsorciones se sugieren son debidas a múltiples factores como el estado fisiológico de las células bacterianas, el medio de cultivo utilizado, la concentración inicial de micotoxina, la temperatura, el pH, la cantidad de bacterias, etc. (Sadiq *et al.*, 2019).

Otro trabajo que se asemeja es el de Niderkorn *et al.*, (2007) utilizaron cuatro cepas del género *Enterococcus* (además de otras BAL como *Lactococcus*) para ver su capacidad de unión y/o biotransformación de DON y ZEA (entre otras). No se encontraron evidencias de productos que fueran resultado de biotransformación de DON ni ZEA por parte de dichas cepas. Sin embargo, sí reportaron que remueve aproximadamente rangos de entre 15 y 22 % de DON, mientras que para ZEA removi6 un 35 %. Ellos argumentan que el posible mecanismo fue la adsorción de la micotoxina y la pared celular bacteriana. Además de que independientemente de la estructura química de las toxinas, los géneros *Enterococcus* y *Streptococcus* fueron los que mayor eficiencia tuvieron de unión en comparación con los demás. No obstante, las variaciones obtenidas entre la cantidad de inactivación entre este estudio y el anterior, se sugiere que es debido a múltiples factores como la concentración (en el de ellos fue de 5 ug/mL) o la temperatura del ensayo (en el de ellos fue a 25°C). De igual manera, Topcu *et al.*, (2010) encontraron que unas cepas bacterianas de *Enterococcus faecium* tuvieron capacidad de eliminación de aflatoxinas y patulinas de una solución acuosa, explicando que esto se debió a la unión de la micotoxina a los componentes de la pared celular de la bacteria.

Ahora bien, la cepa de *Lactobacillus* también mostr6 una actividad de inactivación frente a los tricotecenos tanto en medio MRS como en PBS. Estos resultados se asimilan con los mostrados por la investigación de Juodeikiene *et al.*, (2017) en la cual realizaron un estudio con BAL aplicadas a granos de trigo infectados por micotoxinas (tricotecenos) de *Fusarium*, encontrando que existe una reducción por parte de estas bacterias sobre la concentración de los tricotecenos (ZEN, DON, T-2, HT-2) en los granos. Una de las cepas de BAL fue una del mismo género *Lactobacillus*, pero la especie *sakei*. Ellos sugieren que esto fue debido al mismo

mecanismo de unión de la micotoxina y la pared celular bacteriana. Esto último se corrobora con el estudio llevado a cabo por Krol *et al.*, (2018) donde proponen 3 posibles mecanismos de unión entre la zearalenona y la pared celular de las BAL. El primero es la unión entre la micotoxina con las proteínas presentes en la superficie de la pared celular a través de interacciones hidrofóbicas y/o electrostáticas. El segundo es nuevamente la adsorción de la micotoxina por parte de los peptidoglucanos que componen la pared celular y el último es una adsorción interna donde interactúa con las proteínas localizadas intracelularmente.

Adicionalmente, Juodeikiene *et al.*, 2017, también sugieren que otro posible mecanismo de inactivación es la biotransformación de la estructura química de la toxina por parte de enzimas producidas por las BAL. Se sabe que la toxicidad de los tricotecenos es debida principalmente al grupo epóxido presente en su estructura y al modificar este grupo funcional, las enzimas generarían conversiones en compuestos menos tóxicos. Esto último, se complementa por lo dicho por Dalie *et al.*, (2010) donde indican que además de los procesos de unión, otros mecanismos de degradación o reducción de micotoxinas por parte de BAL incluyen la degradación química y/o enzimática y las conversiones metabólicas.

En el mecanismo de biotransformación estarían actuando procesos de acetilación, desacetilación, oxigenación, depoxidación, epimerización y glucosilación (McCormick, 2013). De este último mecanismo, destaca la revisión realizada por Karlosky (1999), en donde resume que unas enzimas precisas (de-epoxidasas) son capaces de realizar un de-epoxidación reduciendo así su nivel de toxicidad. De igual manera, en los estudios realizados por Fuchs *et al.*, (2000, 2002) indican que las enzimas epoxidasas generadas por la cepa bacteriana *Eubacterium* BBSH 797 son capaces de modificar el anillo epóxido de la estructura de tricotecenos de tipo A y B. Otro trabajo que informa sobre enzimas es el de Garvey *et al.*, (2008) en donde reporta que las enzimas llamadas tricoteceno 3-O acetiltransferasas son capaces de transformar al DON a 3 acetildeoxinivalenol (3 ADON) mediante una acetilación. Si bien, se ha comprobado que los tricotecenos pueden ser biotransformados mediante enzimas producidas por microorganismos, aún se

desconoce si las BAL las pueden producir, por lo que faltarían estudios complementarios centrados en estudiar el mecanismo de inactivación.

Para el género *Bacillus*, a pesar de no pertenecer propiamente al grupo de BAL, su uso en distintas aplicaciones y la cantidad de referencias de su uso en la eliminación de micotoxinas, lo convierten en una opción a considerar para evaluar su capacidad de inactivación en tricotecenos. Hay diversos estudios que han evaluado dicha capacidad de inactivación del género con diferentes micotoxinas, por ejemplo, el trabajo realizado por Farzaneh *et al.*, (2012) reportando que degrada aflatoxina B1 en caldo nutritivo. También en el estudio realizado por Ju *et al.*, (2019) indican que 2 cepas de este género (*B. subtilis* y *B. natto*) son capaces de eliminar zearalenona tanto en alimentos líquidos como sólidos.

Por otro lado, existen pocos estudios que han utilizado cepas del mismo género para ver su actividad en contra de tricotecenos. Sin embargo, a pesar de que nuestros resultados de inactivación para la toxina HT-2 con el tratamiento de medio con bacterias aparentemente fueron nulos pero buenos para la toxina T-2, son parecidos a los obtenidos por Zahoor *et al.*, (2021) en donde varias cepas del género *Bacillus* (entre las cuales destacan *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. cereus*) fueron capaces de degradar múltiples micotoxinas generadas por el género *Fusarium*, entre las cuales destacan zearalenona, T-2 y HT-2 de medio líquido LB. Es importante resaltar que al igual que en este estudio, ellos mencionan que no importa la cepa, todas mostraron una menor inactivación de la toxina HT-2 con respecto a la toxina T-2. Ellos explican que el posible mecanismo fue la degradación microbiana en compuestos menos tóxicos. Este resultado es comparable con la recopilación de datos hecha por Awad *et al.*, (2010) en donde agrupa varios datos de diferentes cepas bacterianas que son capaces de degradar a DON en moléculas menos tóxicas, las cuales son aisladas del rumen o también del intestino de pollo (en donde se pueden encontrar cepas de BAL). En consideración de lo anterior, se supone que las posibles diferencias entre estudios fueron debidas a factores como que no son las mismas cepas, la concentración

inicial de la toxina, el tipo de medio de cultivo, la cantidad de inóculo bacteriano, temperatura y tiempo del ensayo, por mencionar algunos.

Asimismo, nuestros resultados de inactivación en medio TSB son afines a los reportados por Chen *et al.*, (2019) en donde cepas aisladas del mismo género (que con base a un análisis molecular indican que resultó ser de la especie *B. subtilis*), fueron capaces de reducir el contenido de toxina T-2 en medio TBS durante 24 horas. Cabe destacar que también obtuvo buenos resultados de reducción con otras micotoxinas como ZEA, AFB1 y DON. Además, encontraron que las cepas bacterianas manifestaron actividad enzimática de tipo esterasa, lo que sugiere que dicha actividad fue la responsable de la degradación.

Sin embargo, como en nuestros resultados mostraron que el ensayo con PBS también inactivo los tricotecenos, se sugiere que se podría tratar de una adsorción. Esto se piensa que al ser *Bacillus* una bacteria Gram positiva (como las BAL) al igual que *Lactobacillus* y *Enterococcus*, presenta una estructura similar de la pared celular que permitió la unión con los tricotecenos tal como lo explica en la investigación ejecutada por Tinyiro *et al.*, (2011), los cuales observaron tanto degradación como adsorción por parte de cepas de *Bacillus* con zearalenona, en donde las diferencias del porcentaje de absorción (55%) entre este estudio y el nuestro se supone que es debido a la cantidad del volumen inicial de bacterias y que propiamente no son las mismas micotoxinas.

Con respecto a nuestros resultados que aparentan ser nulos con la inactivación del neosolaniol, no pueden ser fácilmente comparados con otros estudios, ya que hasta donde sabemos, no hay suficientes estudios con dicha toxina y su posible inactivación con microorganismos. Aun así, se puede especular que dichos resultados fueron causados por una variedad de factores, como por ejemplo el aumento en la concentración de micotoxina y el tipo de micotoxinas presentes en la muestra. En el mismo estudio de Zahoor *et al.*, (2011) encontraron que, a mayor concentración de toxina, menor es el porcentaje de inactivación sin importar de qué bacteria se tratase. También hallaron que cuando existen diferentes micotoxinas juntas, hay una cierta sensibilidad por parte de unas, ya que en el

caso de la T-2 al estar en conjunto con otras micotoxinas como las fumonisinas, en estas últimas se observa un intervalo menor de degradación, lo que nos hace considerar que al estar el neosolaniol junto con los demás tricotecenos, el mecanismo de inactivación sea más afín o tenga mayor preferencia con las otras micotoxinas siendo que las demás (como la toxina T-2) si muestran efectos de inactivación y NEO al parecer ninguno.

Otro factor que podría intervenir sería la cepa bacteriana utilizada, ya que en un estudio efectuado por Chlebicz y Slizewska (2020), utilizaron un consorcio bacteriano de 12 cepas del género *Lactobacillus* en lugar de una cepa purificada como fue en este caso. Un factor más sería el tipo de medio utilizado, esto causó que afectará la composición de los componentes de la pared celular bacteriana, la cual es responsable de la unión a la micotoxina como lo indica Sadiq *et al.*, en 2019. Al mismo tiempo, esto se comprueba con el estudio realizado por Piotrowska en 2014, donde reportó que cepas de *Lactobacillus* en medio MRS eliminaron un 35% de ocratoxina (A) en comparación con un tampón fosfato.

Un factor adicional para tomar en cuenta sería el estado fisiológico de las BAL. Existen múltiples estudios en donde explican que bacterias que son inactivadas (no viables) por tratamientos como calor o algún ácido, indican una mayor habilidad de unión de la pared celular con diferentes micotoxinas en comparación con bacterias viables, lo cual es explicado por la modificación (rompiendo enlaces glicosídicos o enlaces amida) de los componentes de dicha pared (los peptidoglucanos y polisacáridos), causando que la superficie tenga una mejor unión, lo que nos hace considerar que al no someter nuestras cepas a algún tratamiento adicional con calor o ácido, su pared celular no fue modificada haciendo que su superficie no tenga unión alguna (Haskard *et al.*, 2001; El Nezami *et al.*, 2002; Niderkorn *et al.*, 2009).

Otro factor no menos importante para ser tomado en consideración es el pH. Algunos estudios expresan que, dependiendo del valor del pH, es la cantidad de inactivación. Esto se interpreta que el pH puede afectar las interacciones hidrofóbicas y/o electrostáticas que hacen posible la unión de la micotoxina con la

pared celular, tal como lo explica Wang *et al.*, (2015) en dicha investigación informan que al cambiar de pH 4 a 6, las mencionadas interacciones aumentan unión de mayor medida la patulina a la pared celular. No obstante, existen diversas variaciones con respecto al valor del pH, por ejemplo, en el trabajo realizado por Fuchs *et al.*, (2008) dicen que el valor ideal de pH para inactivar patulina y ocratoxina es de 5. Así mismo, Luz *et al.*, (2018) mencionan una disminución del porcentaje de inactivación de ocratoxina en intervalos de pH que varían desde 6.5 a 1.6, observándose un patrón de disminución de inactivación mientras también disminuye el pH.

Finalizando, con los resultados de este trabajo, se consiguió aislar, purificar, identificar y conservar una cepa bacteriana que tiene potencial de inactivar tricotecenos de tipo A (*Enterococcus faecium*). Al igual que, con las otras 2 bacterias (*L. plantarum* y *B. subtilis*), se contribuye al conocimiento sobre el uso de microorganismos con capacidad para la detoxificación de este mismo grupo específico de micotoxinas, el cual no hay reportes previos de cepas que posean propiedades de inactivar. Así mismo, con estos datos de inactivación, se propone su posible aplicación en la industria pecuaria como aditivos (propiedades probióticas) para alimento de ganado.

XIV. Conclusión

- Se logró el aislamiento y purificación de una cepa bacteriana contenida por la muestra Biopro. De acuerdo con la tinción de Gram son bacterias Gram positiva, con morfología esferoidal, que puede encontrarse de manera individual o en par. Además, con base en las pruebas bioquímicas y moleculares, se logró identificar que es la especie *Enterococcus faecium*.
- Se determinó una inactivación de la toxina T-2 mediante todas cepas bacterianas de los géneros *Enterococcus*, *Bacillus* y *Lactobacillus* indistintamente del tratamiento al cual hayan sido sometidas.
- Se observó que solo *Bacillus* no pudo inactivar a HT-2 en 2 tratamientos, los cuales fueron en medio TSB a 40°C sin agitación y el segundo fue con agitación.
- En presencia del consorcio bacteriano, existe una inactivación de NEO, sin embargo, cuando se trabajó con las cepas purificadas, en la mayoría de los casos aparentó una nula inactivación de NEO.

XV. Referencias bibliográficas

- Abdul A. J. Sinan, Al Badran E. Adnan, Aboud A. H. Aswan y Al Sherifi R. Hassan. 2016. Isolation and identification of a local strain of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* and studied the tolerance ability for different levels of pH. *Basrah Journal of veterinary Research*, 15(2), 329–345. <https://doi.org/10.33762/bvetr.2016.124330>
- Abrunhosa L., Ines A., Rodrigues A., Guimaraes a., Pereira V. y Parpot P. 2014. Biodegradation of ochratoxin A by *Pediococcus parvulus* isolated from Douro wines. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.019>
- Adebo O.A., Molelekoa T., Makhuvele R., Adebiyi J.A., Oyedele A.B., Gbashi S., Adefisoye M.A., Ogundele O.M. y Njobeh P.B. 2021. A review on novel non-thermal food processing techniques for mycotoxin reduction. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 56: 13-27. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14734>
- Aguilera Martinez Yoatzi Ketzali. 2020. Estudio de la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus plantarum* y *Lactococcus lactis* aisladas del atole agrio de Villahermosa, Tabasco. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- Aguirre Acosta E., Ulloa M., Aguilar S., Cifuentes J. y Valenzuela R. 2014. Biodiversidad de Hongos en México. Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad. Supl*, 85, S76–S81.
- Ahlberg S., Joutsjoki V. y Korhonen H. 2015. Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *International Journal of Food Microbiology*, 207, 87–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.042>
- Alassane Kpembi Imourana, Gerd Schatzmayr, Ionelia Taranu, Daniela Marin, Olivier Puel y Isabelle Paule Oswald. 2017. Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(16), 3489–3507. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1140632>
- Alcaraz LD, Moreno-Hagelsieb G, Eguiarte LE, Souza V, Herrera-Estrella L y Olmedo G. 2010. Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-332>
- Álvarez M., Rodríguez A., Peromingo B., Nuñez F. y Rodríguez M. 2020. *Enterococcus faecium*: a promising protective culture to control growth of ochratoxigenic moulds and mycotoxin production in dry-fermented sausages. *Mycotoxin Research*, 36(2), 137–145. <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00376-6>

Arroyo Manzanares N., Huertas Pérez J. F., Gamíz García M. y García Campaña A. M. 2014. Control de Micotoxinas en Alimentos. *Grupo de Investigación FQM-302-Calidad en Química Analítica Alimentaria*, 7, 16–31.

Avalos Javier y Limon M. Carmen. 2022. Fungal secondary metabolism. *Encyclopedia*, 2(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2010001>

Avni Kırmacı H., Hamdi Özer B., Akçelik M. y Akcelik N. 2016. Identification and characterisation of lactic acid bacteria isolated from traditional Urfa cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 69, 301–307.

Bin Umer M. A., McLaughlin J. E., Basu D., McCormick S., y Tumer N. E. 2011. Trichothecene mycotoxins inhibit mitochondrial translation-implication for the mechanism of toxicity. *Toxins*, 3(12), 1484–1501. <https://doi.org/10.3390/toxins3121484>

Bravo Pichardo Rodrigo Gabriel. 2017. Evaluación del papel de especies de *Enterococcus* en la maduración de quesos. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. Ciudad de México, México.

Bryden W.L. 2011. Mycotoxins and Mycotoxicoses: Significance, Occurrence and Mitigation in the Food Chain. In General, Applied and Systems Toxicology. eds B. Ballantyne, T.C. Marrs, T. Syversen, D.A. Casciano and S.C. Sahu. <https://doi.org/10.1002/9780470744307.gat157>

Calisaya Calderon Jesus Miguel. 2017. Aislamiento y caracterización molecular del ARNr 16S de una cepa bacteriana degradadora de cianuro de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Magollo, Tacna - Perú. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Escuela Profesional de Biología-Microbiología. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú.

Casillas Vega N., Mendoza Olazarán S., Flores Aréchiga A. y Llaca Diaz J. 2020. Procedimientos de Microbiología Médica Diagnóstica. McGraw-Hill Education. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2973§ionid=249056517>

Castillo U. Pável y Duran De Bazúa Carmen. 2006. Las micotoxinas: metabolitos secundarios de los hongos filamentosos. Edición química 17(2).

Chapot Chartier M. y Kulakauskas. 2014. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*, 13(Suppl 1), S9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-s1-s9>

Chen P., Xiang B., Shi H., Yu P., Song Y. y Li S. 2020. Recent advances on type A trichothecenes in food and feed: Analysis, prevalence, toxicity, and decontamination techniques. *Food Control*, 118(107371), 107371. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107371>

Cepero de García M.C., Restrepo R. Silvia, Franco M. E. Ana, Cárdenas T. Martha y Vargas E. Natalia. 2012. Biología de hongos. Primera edición. Universidad de los Andes. Bogotá. Ediciones uniandes.

Gonçalves B. L., Muaz K., Coppa C. F. S. C., Rosim R. E., Kamimura E. S., Oliveira C. A. F., y Corassin, C. H. 2020. Aflatoxin M1 absorption by non-viable cells of lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* strains in Frescal cheese. *Food Research International* (Ottawa, Ont.), 136(109604), 109604. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109604>

Dalie D., Pinson-Gadais L., Atanasova-Penichon V., Marchegay G., Barreau C., Deschamps A. y Richard-Forget F. 2012. Impact of *Pediococcus pentosaceus* strain L006 and its metabolites on fumonisin biosynthesis by *Fusarium verticillioides*. *Food Control*, 23(2), 405–411.

Desjardins A. E., Hohn T. M. y McCormick S. P. 1993. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: Chemistry, genetics, and significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 57, 595–604.

Devlieghere F, Vermeiren J. y Debevere J. 2004. New preservation technologies: Possibilities and limitations, *Review. International Dairy Journal*, 14, 273–285.

Devriese L.A., Vancanneyt M., Descheemaeker P., Baele M., Van Landuyt H.M., Gordts B., Butaye P., Swings J. y Haesebrouck F. 2002. Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 821–827. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01586.x>

Diana Leticia, Ciuffo Camila y Musto Héctor. 2019. Identificación y caracterización de *Staphylococcus* resistentes a meticilina aislados de perros. *Veterinaria (Montevideo)*, 55(212), 45–51.

Díaz Perez Marilyn, Rodriguez Martinez Claudio y Zhurbenko C. Raisa. 2010. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(2), 147–161.

Domingos L.M.F.P., Stanton C., Ross P.R., Dapkevicius M.L.E. y Silva C.C.G. 2017. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiology*, 63, 178–190.

Dong Tianyi, Liang Yucheng, Shao Tao, Wang Wenbo, Ma Pengfei, Wang Wenkang, Li Junfeng y Yuan Xianjun. 2023. Detoxifying mycotoxins and antifungal properties of two rumen-derived *Enterococcus* species in artificially contaminated corn silages. *J Sci Food Agric*, 103, 5981–5991.

Doyle P. Michael, Diez Gonzalez Francisco y Hill Colin. 2019. Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. 5th edition. Washington, DC: ASM Press.

Duboc P. y Mollet B. 2001. Applications of exopo-lysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11, 759–768.

El Nezami H., Polychronaki N., Lee Y. K., Haskard C., Juvonen R., Salminen S., y Mykkanen H. 2004. Chemical moieties and interactions involved in the binding of zearalenone to the surface of *Lactobacillus rhamnosus* strains GG. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4577–4581.

El Nezami H., Polychronaki N., Salminen S. y Mykkanen, H. 2002. Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative α -zearalenol. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3545–3549.

El Nezami H. S., Chrevatidis A., Auriola S., Salminen S. y Mykkanen, H. 2002. Removal of common *Fusarium* toxins in vitro by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Additives and Contaminants*, 19(7), 680–686.

Encina Troncoso G. Antonio y Stiglich Fuentealba D. Eduardo. 2021. Presencia de ocratoxina A en alimentos y uso de bacterias ácido lácticas como mecanismo de control. Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias de la salud. Escuela de tecnología médica. Talca, Chile. 57 p.

Estrada Hernandez Gabriela. 2014. Identificación de bacterias del género *Salmonella* mediante la secuenciación de ADN de nueva generación. Tesis Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. Ciudad de México, México.

Farzaneh M., Shi Z. Q., Ghassempour A., Sedaghat N., Ahmadzadeh M., Mirabolfathy M. y Javan Nikkhah M. 2012. Aflatoxin B1 degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran. *Food Control*, 23, 100–106.

Fernandez Juri M. G., Dalcero A. M. y Magnoli C. E. 2015. In vitro aflatoxin B-1 binding capacity by two *Enterococcus faecium* strains isolated from healthy dog faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 118(3), 574–582.

Flores Ortiz C. M., Hernández Portilla L. B. y Vázquez Medrano J. 2006. Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Tec Pecu Méx*, 44(2).

Foroud N. A. y Eudes F. 2009. Trichothecenes in cereal grains. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(1), 147–173. <https://doi.org/10.3390/ijms10010147>

Foroud N. A., Baines D., Gagkaeva T. Y., Thakor N., Badea A., Steiner B., Bürstmayr M. y Bürstmayr H. 2019. Trichothecenes in cereal grains - an update. *Toxins*, 11(11), 634. <https://doi.org/10.3390/toxins11110634>

Fuchs E., Binder E., Heidler D. y Krska R. 2000. Characterisation of metabolites after the microbial degradation of A- and B-trichothecenes by BBSH 797. *Mycotoxin Research*, 16, 66–69.

Fuchs, E., Binder, E. M., Heidler, D., & Krska, R. (2002). Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797. *Mycotoxin Research*, 16, 66–69.

Fuchs S., Sontag G., Stidl R., Ehrlich V., Kundi M. y Knasmüller S. 2008. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 46(4), 1398–1407.

Fusco V., Quero G.M., Cho G.S., Kabisch J., Meske D., Neve H., Bockelmann W. y Franz C.M.A.P. 2015. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Front. Frontiers in Microbiol*, 6, 1–22.

Garvey, G. S., McCormick, S. P., & Rayment, I. (2008). Structural and functional characterization of the TRI101 trichothecene 3-O-acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*: Kinetic insights to combating *Fusarium* head blight. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 1660–1669.

García Cristina, Rendueles Manuel y Díaz Mario. 2019. Liquid-phase food fermentations with microbial consortia involving lactic acid bacteria: A review. *Food Research International*, 119, 207–220.

Gao X., Mu P., Wen J., Sun Y., Chen Q. y Deng Y. 2018. Detoxification of trichothecene mycotoxins by a novel bacterium, *Eggerthella* sp. DII-9. *Food Chem. Toxicol*, 112, 310–319.

González Melendez C. Roberto, Elizalde C. Briseida, Cortés C. M. Estefanía y Orduña S. Manuel. 2020. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología: un enfoque gráfico. UNAM, Fes Zaragoza. ISBN: 978-607-30-3771-6.

Guo M., Huang K., Chen S., Qi X., He X., Cheng W.H., Luo Y., Xia K. y Xu, W. 2014. Combination of metagenomics and culture-based methods to study the interaction between ochratoxin A and gut microbiota. *Toxicological Sciences*, 141(1), 314–323.

Guo Y., Zhou J., Tang Y., Ma Q., Zhang J., Ji C. y Zhao L. 2019. 2020. Characterization and Genome Analysis of a Zearalenone-Degrading *Bacillus velezensis* Strain ANSB01E. *Curr. Microbiol*, 77, 273–278.

Hamad M. Gamal, Mehany Taha, Simal Gandara Jesus, Abou Alella Sarah, Esua J. Okon, Abdel Wahhab A. Mossad y Hafez E. Elsayed. 2023. A review of recent innovative strategies for controlling mycotoxins in foods. *Food Control* 144.

Haque M. A., Wang Y., Shen Z., Li X., Saleemi M. K. y He C. 2020. Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A

review. *Microbial Pathogenesis*, 142(104095), 104095.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104095>

Haskard C. A., El-Nezami H. S., Kankaanpää P. E., Salminen S. y Ahokas J. T. 2001. Surface binding of aflatoxin B-1 by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3086–3091.

Hassan Ul., Zahoor Thani, Al Roda, Alsafran Mohammed, Migheli Quirico y Jaoua Samir. 2021. Selection of *Bacillus spp.* with decontamination potential on multiple *Fusarium* mycotoxins. *Food Control*, 127(108119), 108119.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108119>

Hatab S., Yue T. y Mohamad O. 2012. Removal of patulin from apple juice using inactivated lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 112(5), 892–899.

He J.W., Bondy G.S., Zhou T., Caldwell D., Boland G.J. y Scott P.M. 2015. Toxicology of 3-epi-deoxynivalenol, a deoxynivalenol-transformation product by *Devosia mutans* 17-2-E-8. *Food Chem. Toxicol*, 84, 250–259.

Herrera, T. y M. Ulloa. 1990. El Reino de los Hongos, micología básica y aplicada. UNAM-Fondo de Cultura Económica, México, D. F. 552 p.

Hlaváčková Lucie, Vyřasová Jarmila, Novotná Šárka, Mořková Šnévajšová Petra, Brožková Iveta y Honzlová Alena. 2012. Effect of Selected Microorganisms on *Fusarium* Toxins Production. *Analytical Letters*, 45(7), 702–713.
<https://doi.org/10.1080/00032719.2011.653895>

Holzappel W.H. y Wood B. J.B. 2014. Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy. Wiley

Ho K. Chang, Hwa H. Seul, Seoul K. Jim, Gyeong K. Youg, Jeong Yulah, Min P. Hye y Soo P. Nam. 2019. Inhibition of nitric oxide production, oxidative stress prevention and probiotic activity of lactic acid bacteria isolated from the human vagina and fermented food. *Microorganisms*, 7(4), 109.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7040109>

Hussein H.S. y Brasel J.M. 2001. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167:101–134

Jagnow G. y Wolfgang D. 1991. Introducción con experimentos modelo, Ed. Zaragoza: Achbla. p. 157-167.

Juárez R. Alejandra. 2017. Efecto de la longitud de cadena de cationes orgánicos en la adsorción de Ocratoxina A con aluminosilicatos modificados. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO). Laboratorio de Biogeoquímica.

Ju Jian, Tinyiro E. Samuel, Weirong Yao, Hang Yu, Yahui Guo, He Quian y Yunfei Xie. 2019. The ability of *Bacillus subtilis* and *Bacillus natto* to degrade zearalenone

and its application in food. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(10). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14122>

Juodeikiene G., Bartkiene E., Cernauskas D., Cizeikiene D., Zadeike D., Lele V. y Bartkevics V. 2018. Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application for *Fusarium* mycotoxin reduction in malting wheat grains. *LWT Food Science and Technology*, 89, 307–314.

Karlovsky P. 1999. Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Natural Toxins*, 7, 1–23.

Kuhn D. M. y Ghannoum M. A. 2003. Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: Infectious disease perspective. *Clin Microbiol Rev*, 16, 144–172.

Krol A., Pomastowski P., Rafinska K., Railean Plugaru V., Walczak J. y Buszewski B. 2018. Microbiology neutralization of zearalenone using *Lactococcus lactis* and *Bifidobacterium sp.* *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(3), 943–952.

Krska R., Welzig E. y Boudra H. 2007. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. *Anim Feed Sci Technol* 137(3–4):241–264

Lara J. 2003. Métodos de Determinación, Identificación y Control de Micotoxinas en Ingredientes para la Nutrición Animal. Investigación aplicada. NUTEK.

Landa Nava Maria del Pilar. 2003. Análisis de toxina t2 en cereales mediante inserción directa en espectrometría de masas. Tesis Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. Ciudad de México, México. 58 p.

Landa Nava Ma. del Pilar, Hernández Portilla L.B., Flores Ortiz C.M. y Manzanares Gómez M.D. 2016. Análisis de Toxina T2 en cereales mediante inserción directa en espectrometría de masas. Los Avicultores y su Entorno. BM Editores.

Li Y., Wang Z., Beier R.C., Shen J., De Smet D., De Saeger S. y Zhang S. 2011. T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin: review of toxicity, metabolism, and analytical methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3441–3453. <https://doi.org/10.1021/jf200767q>

Li Yan, Tian Guangyan, Dong Gongyue, Bai Shansong, Han Xiaoyu, Liang Jinsheng, Meng Junping y Zhang Hong. 2018. Research progress on the raw and modified montmorillonites as adsorbents for mycotoxins: A review. *Applied Clay Science*, 163, 299–311.

Lustre Sánchez Hermes. 2022. Los superpoderes de las plantas: los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. *Revista digital universitaria*, 23(2). <https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2022.23.2.10>

Luz C., Ferrer J., Manes J. y Meca G. 2018. Toxicity reduction of ochratoxin A by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 112, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.030>

MacFaddin F. Jean. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Tercera edición. Editorial médica panamericana S.A. ISBN: 950-06-1572-X

Magdaleno R. Ángela Daniela. 2017. Determinación de la capacidad de degradación enzimática sobre Zearalenona y Tricotecenos *in vitro*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Laboratorio Nacional en Salud: Diagnóstico Molecular y Efecto Ambiental en Enfermedades Crónico-Degenerativas. Área de Espectrometría de Masas.

Mahmood F.H., Abbasi R. y Khaneghah M.A. 2018. The detoxification of aflatoxin M1 by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.: A review. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(9), e13704. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13704>

Mateo E., Medina A., Mateo F., Valle Algarra F., Pardo I. y Jimenez M. 2010. Ochratoxin A removal in synthetic media by living and heat-inactivated cells of *Oenococcus oeni* isolated from wines. *Food Control*, 21(1), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.03.012>

Marshall H., Meneely J.P., Quinn B., Zhao Y., Bourke P., Gilmore B.F., Zhang G. y Elliott C.T. 2020. Novel decontamination approaches and their potential application for post-harvest aflatoxin control. *Trends in Food Science & Technology*, 106, 489–496. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.11.001>

Masood I.M., Qadir I.M., Shirazi H.J. y Khan U.I. 2011. Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings, *Critical Reviews in Microbiology*, 37:1, 91-98, DOI: 10.3109/1040841X.2010.536522

Mayoral Terán Claudia. 2024. Evolución de la patogenicidad de *Enterococcus faecium* Vancomicina resistente (EfmVR). Tesis de doctorado. Facultad de Medicina. UNAM. Ciudad de México, México. 102 p.

McCormick S., Stanley A., Stover N., Alexander N. 2011. Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins*, 3(7), 802–814. <https://doi.org/10.3390/toxins3070802>

McCormick P. Susan. 2013. Microbial Detoxification of Mycotoxins. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 907–918. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0321-0>

Mendez Dimate Hasbleidy Yury. 2018. Caracterización molecular de bacterias Gram positivas del banco de cepas de la Universidad Colegio Mayor de

Cundinamarca. Facultad de Ciencias. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá, Colombia. 68 p.

Montoya Urbina Isabel. 2023. Revisión bibliográfica sobre el diagnóstico de bacterias esporuladas: *Bacillus* y *Clostridium*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. 72 p.

Moreno Julio Ricardo, Gorriti Marta Fabiana, Flores Regina Maria y Albarracin Virginia Helena. 2012. Microbiología ambiental y ecología microbiana en el estudio de microorganismos en ambientes extremos. *Reduca (Biología). Serie Microbiología*, 5(5), 94–109.

Moya Villegas Erik. 2018. Caracterización de bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos de Villahermosa, Tabasco. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. Ciudad de México, México. 70 p.

Mozzi F. 2016. Lactic Acid Bacteria. En *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 501–508). Elsevier.

Murray R. Patrick, Rosenthal S. Ken y Pfaller A. Michael. 2009. Microbiología médica. 5th ed. MMVI Elsevier España, S. A. ISBN: 978-84-8174-927-4.

Niderkorn V., Morgavi D. P., Aboab B., Lemaire M. y Boudra H. 2009. Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B(1) and B(2) by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 106(3), 977–985.

Niderkorn V., Morgavi D. P., Pujos E., Tissandier A. y Boudra H. 2007. Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an in vitro simulated corn silage model. *Food Additives and Contaminants*, 24(4), 406–415.

Nielsen F. y Smedsgaard F. 2003. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *Journal of Chromatography A*, 1002, 111–136.

Nunes V.M., Moosavi M., Khaneghah A.M. y Oliveira C.A. 2021. Innovative modifications in food processing to reduce the levels of mycotoxins. *Current Opinion in Food Science*, 38, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.11.010>

Oliveira P., Brosnan B., Jacob F., Furey A., Coffey A., Zannini E. y Arendt E. K. 2015. Lactic acid bacteria bioprotection applied to the malting process. Part II: Substrate impact and mycotoxin reduction. *Food Control*, 51, 444–452.

Olvera Garcia Myrna Elena. 2018. Caracterización genómica, poblacional y funcional de *Enterococcus* aislados de un alimento artesanal. Tesis de doctorado. Facultad de Química. UNAM. Ciudad de México, México. 120 p.

Ondiek Walter, Wang Yaling, Sun Lijun, Zhou Langhua, On L.W. Stephen, Zheng Haotian y Ravi Gooneratne. 2022. Removal of aflatoxin B1 and T-2 toxin by bacteria isolated from commercially available probiotic dairy foods. *Food Science and Technology International*, 28(1), 15–25.

Pankaj S.K., Shi y Keener K. M. 2018. A review of novel physical and chemical decontamination technologies for aflatoxin in food. *Trends Food Sci Technol*, 71, pp. 73-83.

Parra Huertas Ricardo Rodolfo. 2010. Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93–105.

Peltonen K., El-Nezami H., Haskard C., Ahokas J. y Salminen S. 2001. Aflatoxin B1 binding by Dairy Strains of lactic acid bacteria and Bifidobacteria. *American Dairy Science Association*, 84, 2152–2156.

Piotrowska Małgorzata. 2021. Microbiological Decontamination of Mycotoxins: Opportunities and Limitations. *Toxins*, 13(11), 819. <https://doi.org/10.3390/toxins13110819>

Piotrowska M. 2014. The adsorption of Ochratoxin A by *Lactobacillus* species. *Toxins*, 6(9), 2826–2839.

Porte L, Hervé B, Prat S, Chanqueo L. 2007. *Enterococcus* sp. Parte I. *Rev Chil Infect*, 24(3).

Ramirez S. Maria y Tolmasky E. Marcelo. 2017. Amikacin: Uses, Resistance, and Prospects for Inhibition. *Molecules*, 22. <https://doi.org/10.3390/molecules22122267>

Ramirez M. S. y Tolmasky M. E. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 13(6), 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.003>

Renye J.J.A., Somkuti G.A., Van Hekken D.L., Guerrero P.V.M. 2011. Short communication: Characterization of microflora in Mexican Chihuahua cheese. *Journal of Dairy Science*, 94, 3311–3315.

Revista Digital Universitaria. Vol. 18, Num.6 http://www.revista.unam.mx/vol.18/num6/art46/PDF_art46.pdf

Reyes P. J. Abigail, Quezada V. M. Yolanda, Moreno L. Josefina, Flores T. David y Arrua A. A. Andrea. 2021. Determinación de micotoxinas presentes en alimentos de consumo infantil comercializados en México: Determination of mycotoxins present in foods for infant consumption marketed in Mexico. *South Florida Journal of Development*, 2(4), 5122–5134. <https://doi.org/10.46932/sfjdv2n4-013>

Rodríguez Gonzalez Maria. 2009. Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de genética y microbiología. Facultad de biociencias. 199 p

Ruggiero A. M., Gordon P. D., Orrell M. T., Bailly N., Bourgoin Thierry., Brusca C. R., Smith C. T., Guiry D. M. y Kirk M. Paul. 2015. A higher level classification of all living organisms. *PLoS ONE*, 10(4).

Sadiq F. A., Yan B., Tian F., Zhao J., Zhang H. y Chen W. 2019. Lactic acid bacteria as antifungal and anti- mycotoxigenic agents: a comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(5), 1403–1436.

Santillán M. R., Rodríguez A. G., Fernández P. S. P., Vázquez M. G., Montero C. J. C. Benítez M. J. 2017. Micotoxinas: ¿Qué son y cómo afectan a la salud pública?

Savado A., Ouattara Cheik A. T., Bassole Imael H. N y Traores S. Alfred. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria - a mini review. *African Journal of Biotechnology*, 5, 678–683.

Sauer S., Freiwald A., Maier T., Kube M., Reinhardt R., Kostrzewa M. y Geider K. Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry and Computational Analysis. *PLoS ONE*, 3(7).

Serrano Colli HA. y Cardona Castro N. 2015. Micotoxiosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *Rev CES Med*, 29(1), 143–152.

Silva P.L., López V.G., Montañó G.M., Villa A.R., Herrera R.J., González S.A., Inzunza A.F., Gutiérrez F.K., Monge N.F., Martínez A.C., García G.F. y Medina B.G. 2022. Identificación de bacterias ácido lácticas en quesos artesanales de Baja California, México, por secuenciación del gen ARNr 16S. *Arch. Zootec*, 71(274), 96–101.

Sistek, V., Maheux, A.F., Boissinot, M., Bernard, K.A., Cantin, P., Cleenwerck, I., De Vos, P. y M.G. Bergeron. 2012. *Enterococcus ureasiticus* sp. nov. and *Enterococcus quebecensis* sp. Nov., isolated from water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt 6), 1314–1320. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.029033-0>

Smith J. E. y Moss M.O. 1985. Mycotoxins: formation, analysis, and significance. Wiley, Chichester; New York. 148 p.

Solé M. D. C. M., Espadalé R. M. A. y Aubert, A. C. 1992. NTP 351: Micotoxinas (aflatoxinas y tricotecenos) en ambientes laborales. *Recuperado de* http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/301a400/ntp_351.pdf.

Solís Cruz Bruno. 2019. Prevención de los efectos tóxicos de la aflatoxina B1 en pollos de engorda mediante el uso de polímeros absorbentes, curcumina y probióticos. Tesis de doctorado. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. Ciudad de México, México. 127 p.

Soriano J. M. et al. 2007. Micotoxinas en Alimentos. ¿Qué son las micotoxinas? *Díaz de Santos. España*, 1–3.

Suzuki T. y Iwahashi Y. 2014. Phytotoxicity evaluation of type B trichothecenes using a *Chlamydomonas reinhardtii* model system. *Toxins*, 6(2), 453–463. <https://doi.org/10.3390/toxins6020453>

Taheur B., Kouidhi B., Mohammed Y., Qurashi, A. y Salah-Abbès. 2019. Review: Biotechnology of mycotoxins detoxification using microorganisms and enzymes. *Toxicon*, 160, 12–22.

Tanaka Hiroki, Takino Masahiko, Sugita-Konishi Yoshito y Tanaka Toshitsugu. 2006. Development of a liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric method for the simultaneous determination of trichothecenes, zearalenone and aflatoxins in foodstuffs. *Rapid Commun. Mass spectrum*, 20, 1422–1428.

Tejera Hernández Berto, Rojas Badía Marcia M. y Heydrich Pérez Mayra. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3), 131–138.

Tola Marta y Kebede Bedaso. 2016. Occurrence, importance and control of mycotoxins: a review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1191103>

Topcu A, Bulat T, Wishah R y Boyaci IH. 2010. Detoxification of aflatoxin B1 and patulin by *Enterococcus faecium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 139(3), 202–205. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.006>

Tsiouris Vasilios, Panagiotis Tassis, Jog Raj, Tilemachos Mantzios, Konstantinos Kiskinis, Marko Vasiljević, Nikola Delić, Evanthia Petridou, Georgia D. Brellou, Zoe Polizopoulou, Nikolaos Mittas y Ioanna Georgopoulou. 2021. Investigation of a novel multicomponent mycotoxin detoxifying agent in amelioration of mycotoxicosis induced by aflatoxin-B1 and ochratoxin A in broiler chicks. *Toxins*, 13(6), 367. <https://doi.org/10.3390/toxins13060367>

Üçok G. y Sert D. 2020. Growth kinetics and biomass characteristics of *Lactobacillus plantarum* L14 isolated from sourdough: Effect of fermentation time on dough machinability. *LWT*, 129, 109516. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109516>.

Ukwuru M. U., Ohaegbu C. G., y Muritala A. 2017. An overview of mycotoxin contamination of foods and feeds. *J. Biochem. Microb. Toxicol*, 1(1), 101.

Ülger G. T., Uçar A., Çakıroğlu F. P. y Yilmaz S. 2020. Genotoxic effects of mycotoxins. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 185, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.07.004>

Villarreal Delgado, M. F., Villa Rodríguez, E. D., Cira Chávez, L. A., Estrada Alvarado, M. I., Parra Cota, F. I., y Santos Villalobos, S. D. L. 2018. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95–130.

Vinderola G., Ouwehand A., Salminen S. y Von Wright A. (Eds.). 2019. *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (5a ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429057465>

Von H. Baum, Klemme F.R., Geiss H.K. y Sonntag H.G. 1998. Comparative evaluation of a commercial system for identification of gram-positive cocci. *European journal of clinical microbiology y infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 17, 849–852.

Wang L., Wang Z. L., Yuan Y. H., Cai R., Niu C. y Yue T. L. 2015. Identification of key factors involved in the biosorption of patulin by inactivated lactic acid bacteria (LAB) cells. *PloS One*, 10(11), e0143431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143431>

Wu Qinghua, You Li, Wu Wenda, Long Miao y Kuca Kamil. 2023. Mycotoxins: Emerging toxic mechanisms, and unanswered research questions. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 174(113673), 113673. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113673>

Wu Q., Dohnal V., Kuca K. y Yuan, Z., 2013. Trichothecenes: structure-toxic activity relationships. *Current Drug Metabolism*, 14(6), 641–660. <https://doi.org/10.2174/1389200211314060002>

Xue Huali, Qili Liu y Zhimin Yang. 2023. Pathogenicity, Mycotoxin Production, and Control of Potato Dry Rot Caused by *Fusarium* spp.: A Review. *Journal of Fungi* 9, no. 8: 843. <https://doi.org/10.3390/jof9080843>

Young J. Christopher, Zhou T., Yu Hai., Zhu H. y Gong J. 2007. Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 45(1), 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.028>

Zheng Jinshui, Wittouck Stijn, Salvetti Elisa, Franz M.A.P. Charles, Harris M.B. Hugh, Salvetti Paola, O'Toole W. Paul, Pot Bruno, Vandamme Peter, Walter Jens, Watanabe Koichi, Wuyts Sander, Felis E. Giovanna, Gänzle G. Michael y Lebeer Sarah. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and

union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858.

Zhou L. H., Wang Y. L., Qiu M., Shi Q., Sun L. J., Liao J. M., Xu Y.L., Liu Y., Fang Z.J. y Gooneratne R. 2017. Analysis of T-2 toxin removal factors in a *Lactococcus* fermentation system. *Journal of Food Protection*, 80(9), 1471–1477. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-051>

Zou Z. Y., He Z. F., Li H. J., Han P. F., Meng X., Zhang Y., Zhou F., Ouyang K.P., Chen X. Y. y Tang J. 2012. In vitro removal of deoxynivalenol and T-2 toxin by lactic acid bacteria. *Food Science and Biotechnology*, 21(6), 1677–1683. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0223-x>