



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

TESIS:

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLADOS NATIVOS DE *Aspergillus flavus* EFICACES PARA EL CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN CON AFLATOXINAS DEL ENSILAJE DE MAÍZ EN AGUASCALIENTES

QUE PRESENTA:

M. en C. ERIKA JANET RANGEL MUÑOZ

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTORES:

DR. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES
DR. ONÉSIMO MORENO RICO

INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORAL:

DR. NETZAHUALCÓYOTL MÁYEK PÉREZ

Aguascalientes, Ags. 24 de mayo del 2019.

AUTORIZACIONES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado de la egresada **ERIKA JANET RANGEL MUÑOZ** con ID 13236, quien realizó la tesis titulada: **CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLADOS NATIVOS DE *Aspergillus flavus* EFICACES PARA EL CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN CON AFLATOXINAS DEL ENSILAJE DE MAÍZ EN AGUASCALIENTES**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir mi **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 14 de mayo de 2019

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'AG'.

Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores
Co-Tutor de tesis

- c.c.p.- Interesada
- c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
- c.c.p.- Consejero Académico
- c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

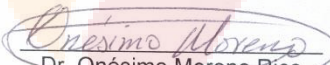
M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS,
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS,
P R E S E N T E.

Por medio del presente como Tutor designado de la estudiante **ERIKA JANET RANGEL MUÑOZ**, con ID 13236, quien realizó la tesis titulada: **CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLADOS NATIVOS DE *Aspergillus flavus* EFICACES PARA EL CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN CON AFLATOXINAS DEL ENSILAJE DE MAÍZ EN AGUASCALIENTES**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que *ella* pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATE NTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags., a 14 de mayo de 2019.


Dr. Onésimo Moreno Rico

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Microbiología
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



Reynosa, Tamaulipas; 13 de mayo de 2019.

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES
PRESENTE

Por medio del presente como Asesor designado de la estudiante *ERIKA JANET RANGEL MUÑOZ* con ID 13236 quien realizó la tesis titulado: *CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLADOS NATIVOS DE *Aspergillus flavus* EFICACES PARA EL CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN CON AFLATOXINAS DEL ENSILAJE DE MAÍZ EN AGUASCALIENTES*, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que *ella* pueda proceder a imprimirla y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

DR. NETZAHUALCOYOTL MÁYEK PÉREZ
ASESOR DE TESIS
UNIVERSIDAD MÉXICO AMERICANA DEL NORTE AC



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

ERIKA JANET RANGEL MUÑOZ
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"CARACTERIZACION MORFOLOGICA Y MOLECULAR DE AISLADOS NATIVOS DE *Aspergillus flavus* EFICACES PARA EL CONTROL DE LA CONTAMINACION CON AFLATOXINAS DEL ENSILAJE DE MAIZ EN AGUASCALIENTES"** hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 16 de Mayo de 2019

"Se lumen proferre"

EL DECANO

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José de Jesús Ruíz Gallegos'.

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.

AGRADECIMIENTOS

Por el apoyo financiero para la realización de este proyecto:

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).
- Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA).

Por su invaluable apoyo y asesoría profesional, a los miembros de mi comité tutorial:

- Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores (Centro de Ciencias Agropecuarias, UAA)
- Dr. Onésimo Moreno Rico (Centro de Ciencias Básicas, UAA).
- Dr. Netzahualcóyotl Máyek Pérez (Coordinación de Investigación, UMAN)

Por su asesoría para la realización de las técnicas analíticas:

- M. en C. Sanjuana Hernández Delgado, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional.
- Biol. Aracely Adabache Ortiz, Laboratorio de Microscopía Electrónica de Alta Resolución, Departamento de Biología, Centro de Ciencias Básicas, UAA.
- Dra. María Carolina de Luna López, Laboratorio de Investigación, Centro de Ciencias Agropecuarias, UAA.

Por su apoyo técnico:

- M. en C. Amalio Ponce Ramírez (Área Agrícola, Centro de Ciencias Agropecuarias, UAA).
- Ing. Alberto Rangel Muñoz (Laboratorio de Investigación, Centro de Ciencias Agropecuarias, UAA).
- Dr. Carlos Cruz Vázquez (Instituto Tecnológico El Llano)
- Dr. Teódulo Quezada Tristán (Centro de Ciencias Agropecuarias, UAA).
- Dr. Raúl Ortiz Martínez (Centro de Ciencias Agropecuarias)
- M. en C. Estrella Hernández García (Laboratorio de Investigación, Centro de Ciencias Agropecuarias, UAA).
- Lic. Teresita de Jesús de Luna López (Laboratorio de Investigación, Centro de Ciencias Agropecuarias, UAA).
- M.V.Z. Jorge Luis Medrano Martínez.
- M.V.Z. Gabriel Salazar Rodríguez.
- M.V.Z. Fernanda Esparza Garcia.
- E.M.V.Z. Cecilia González Valderrama.
- EM.V.Z. Claudia Gisell Pedroza Gallardo.

Por brindarnos el acceso y el apoyo para tomar las muestras, a los propietarios de las Unidades de Producción Lechera:

- Sergio Armando Jiménez González.
- Oscar Jaime Quezada Gallardo y Daniel Quezada Gallardo.

DEDICATORIA

A Dios, que es el principio y el punto de llegada de toda lo que existe.

Con todo mi amor, gratitud y admiración a las dos personas mas importantes en la construcción de mi vida, mis padres

Eva y J. Guadalupe

Porque me han mostrado el rostro de Dios con su testimonio de vida, me han acompañado incondicionalmente con su amor y son los primeros que han confiado en mí para hacer realidad mis sueños.

Con un cariño único y eterno, a mis hermanos

Juan José, Victor Hugo, Gerardo, Maribel, María Guadalupe, Alberto, Ernesto y Diana Laura

Porque juntos, hemos logrado ser una familia sólida, el primer apoyo para cada uno de nosotros, cuna de fortaleza y esperanza ante las adversidades.

Con un cariño especial, a mis sobrinos

Juan Fernando, Katia, Nestor, Ximena, Julio César, Zara Victoria, Marienne, Brisa y Roberto

Porque le dan alegría fresca a la familia, mantienen encendida la luz de la esperanza y me refrescan la vida con su paz.

ÍNDICE GENERAL

AUTORIZACIONES.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	6
DEDICATORIA	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ACRÓNIMOS	6
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
1.1. JUSTIFICACIÓN	12
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1. LA ACTIVIDAD AGROPECUARIA.....	14
2.1.1. Importancia del sector agropecuario en el contexto mundial	14
2.1.2. La actividad agrícola en México.....	14
2.1.3. La actividad lechera en México	14
2.1.4. La actividad agropecuaria en Aguascalientes	16
2.1.5. Desafíos del sector agropecuario	16
2.2. EL GÉNERO <i>Aspergillus</i>	17
2.2.1. Características del género <i>Aspergillus</i>	17
2.2.2. <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	19
2.3. CARACTERÍSTICAS DE <i>Aspergillus flavus</i>	20
2.3.1. Morfología de <i>A. flavus</i>	20
2.3.2. Condiciones para el crecimiento de <i>A. flavus</i>	21
2.3.3. Producción de metabolitos secundarios	21
2.3.4. Técnicas para la identificación de <i>A. flavus</i>	22
2.4. PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS	23
2.4.1. Características físico-químicas de las aflatoxinas	24
2.4.2. Biosíntesis de aflatoxinas	25
2.4.3. Metabolismo de la aflatoxinas	28
2.4.4. Mecanismos de acción de las aflatoxinas	29

2.4.5. Implicaciones en la salud humana y animal	29
2.4.6. Métodos para la detección de aflatoxinas	30
2.5. CONTROL BIOLÓGICO DE LA CONTAMINACIÓN CON AFLATOXINAS	30
2.5.1. Exclusión competitiva.....	30
2.5.2. Inhibición por mecanotransducción	31
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
3.1. HIPÓTESIS.....	33
3.2. OBJETIVO GENERAL	33
3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. MATERIALES Y MÉTODOS	34
4.1. DISEÑO METODOLÓGICO.....	34
4.1.1. Tipo de estudio.....	34
4.1.2. Selección de unidades de producción lechera (UPL)	34
4.2. TÉCNICAS DE MUESTREO	35
4.2.1. Muestreo de suelo agrícola.....	35
4.2.2. Muestreo de alimento.....	35
4.3. TÉCNICAS PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>A. flavus</i>	36
4.3.1. Técnica de vaciado en placa por diluciones	36
4.3.2. Preparaciones con azul de algodón-lactofenol	36
4.3.3. Obtención de cultivos monospóricos	37
4.3.4. Microscopia electrónica de barrido.....	37
4.4. TÉCNICAS MOLECULARES	38
4.4.1. Extracción de ADN genómico.....	38
4.4.2. Amplificación de genes con PCR.....	39
4.4.3. Purificación y secuenciación de productos amplificados	40
4.5. TÉCNICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS	40
4.5.1. Técnica de agar coco con vapores de amonio	41
4.5.2. Cromatografía en capa fina (TLC).....	41
4.6. MICROENSILAJE DE MAÍZ.....	43
4.6.1. Producción de maíz en invernadero	43
4.6.2. Preparación del inóculo de <i>A. flavus</i>	44
4.6.3. Infección del maíz con el inóculo	45
4.6.4. Diseño estadístico	46
5. RESULTADOS.....	47

5.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE DE <i>Aspergillus spp.</i> y <i>A. flavus</i>	47
5.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	50
5.3. CAPACIDAD AFLATOXICOGÉNICA DE AISLADOS <i>A. flavus</i>	55
5.4. INTERACCIÓN, <i>in vitro</i> , DE CEPAS DE <i>A. flavus</i> CON Y SIN CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA	58
5.5. INTERACCIÓN ENTRE CEPAS CON Y SIN CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA EN ENSILAJE DE MAÍZ	58
6. DISCUSIÓN.....	65
6.1. AISLAMIENTO DE <i>A. flavus</i>	65
6.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>A. flavus</i>	66
6.3. CARACTERIZACIÓN AFLATOXIGÉNICA DE <i>A. flavus</i>	67
6.4. INTERACCIÓN ENTRE CEPAS DE <i>A. flavus</i> CON Y SIN CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA	67
7. CONCLUSIONES.....	69
8. GLOSARIO.....	71
9. REFERENCIAS.....	75
8. ANEXOS	85
ANEXO A: PROPUESTA ARTÍCULO	i

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción anual de leche de bovino en México (miles de litros) 15

Tabla 2. Especies de hongos *Aspergillus* productoras de aflatoxinas 20

Tabla 3. Estructura química de las aflatoxinas 24

Tabla 4. Genes involucrados en la biosíntesis de las aflatoxinas 27

Tabla 5. Iniciadores y secuencias empleadas para caracterización molecular de *Aspergillus flavus* 39

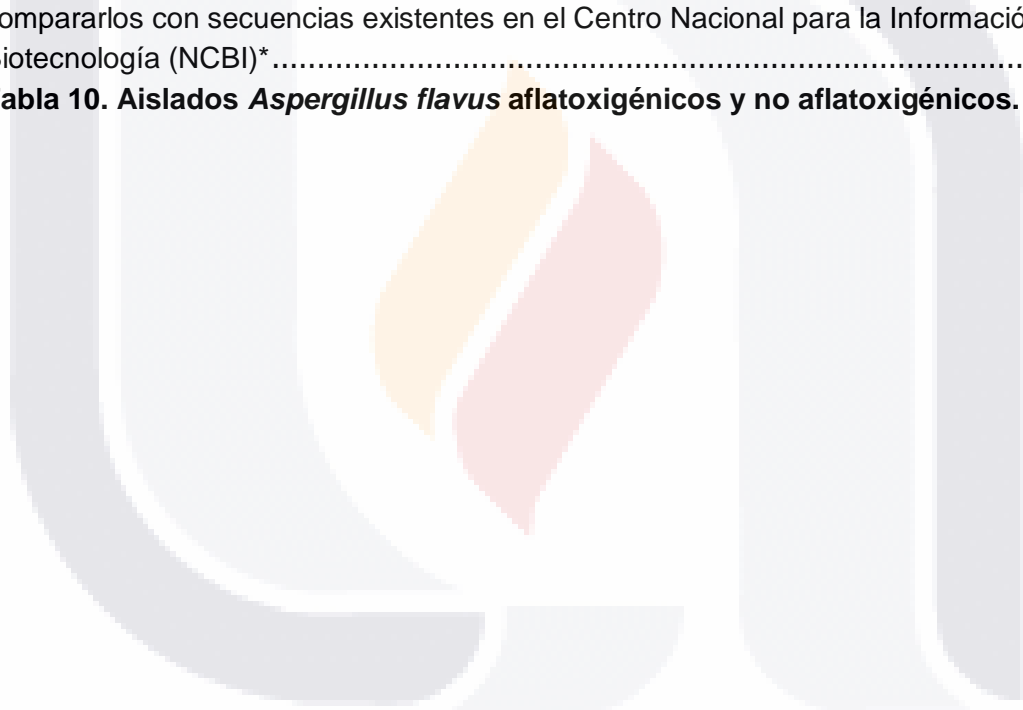
Tabla 6. Diseño de tratamientos para inóculos con esporas de *A. flavus*..... 45

Tabla 7. Géneros fúngicos identificados en muestras de una Unidad Productora Lechera en el Altiplano Central Mexicano 47

Tabla 8. Comparación de las dimensiones de las estructuras morfológicas de aislados de *Aspergillus flavus* obtenidos de ensilaje de maíz (EM) y alimento (AC) integral de vacas lecheras, así como de las cepas Cuautitlán (C) y Tamaulipas (T). 50

Tabla 9. Identidad de los aislados de *Aspergillus spp.* obtenidos de las dietas alimenticias para vacas lecheras, maíz y suelo agrícola en Aguascalientes, México; al compararlos con secuencias existentes en el Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI)* 53

Tabla 10. Aislados *Aspergillus flavus* aflatoxigénicos y no aflatoxigénicos. 57



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía electrónica de barrido de *Aspergillus spp.* 18

Figura 2. Estructura molecular de las principales aflatoxinas 25

Figura 3. Biosíntesis de aflatoxinas. 26

Figura 4. Ubicación geográfica de las unidades de producción (estrella). 34

Figura 5. Técnica de “M” o zig-zag para toma de muestras 35

Figura 6. Ubicación del invernadero N° 6. Área Agrícola del CCA-UAA 43

Figura 7. Morfología de los aislamientos de *Aspergillus flavus* en agar dextrosa y papa.
..... 48

Figura 8. Estructuras morfológicas de *Aspergillus flavus*..... 49

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados del gen Calmodulina. 50

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados para ITS. 51

Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados del gen *aflR*. 51

Figura 12. Electroferograma de una sección de nucleótidos (A, C, G, T) de productos de PCR secuenciados. 52

Figura 13. Placa de sílica gel vista en transiluminador..... 56

Figura 14. Intensidad de color en agar coco al contacto con vapores de amonio en cepas de *A. flavus*. 57

Figura 15. Enfrentamientos *in vitro* en agar coco con vapores de amonio. 58

Figura 16. Interacción en ensilaje de maíz entre cepas control de *A. flavus*. 59

Figura 17. Interacción en ensilaje de maíz entre la cepa control AF-36 (AF⁻) y las cepas *A. flavus* AF⁺ aisladas de alimento concentrado..... 60

Figura 18. Interacción en ensilaje de maíz entre la cepa control AF-36 (AF⁻) y las cepas *A. flavus* AF⁺ aisladas de ensilaje de maíz..... 61

Figura 19. Interacción entre la cepa de *A. flavus* EM1 (AF⁻) y las cepas control (AF⁺). 62

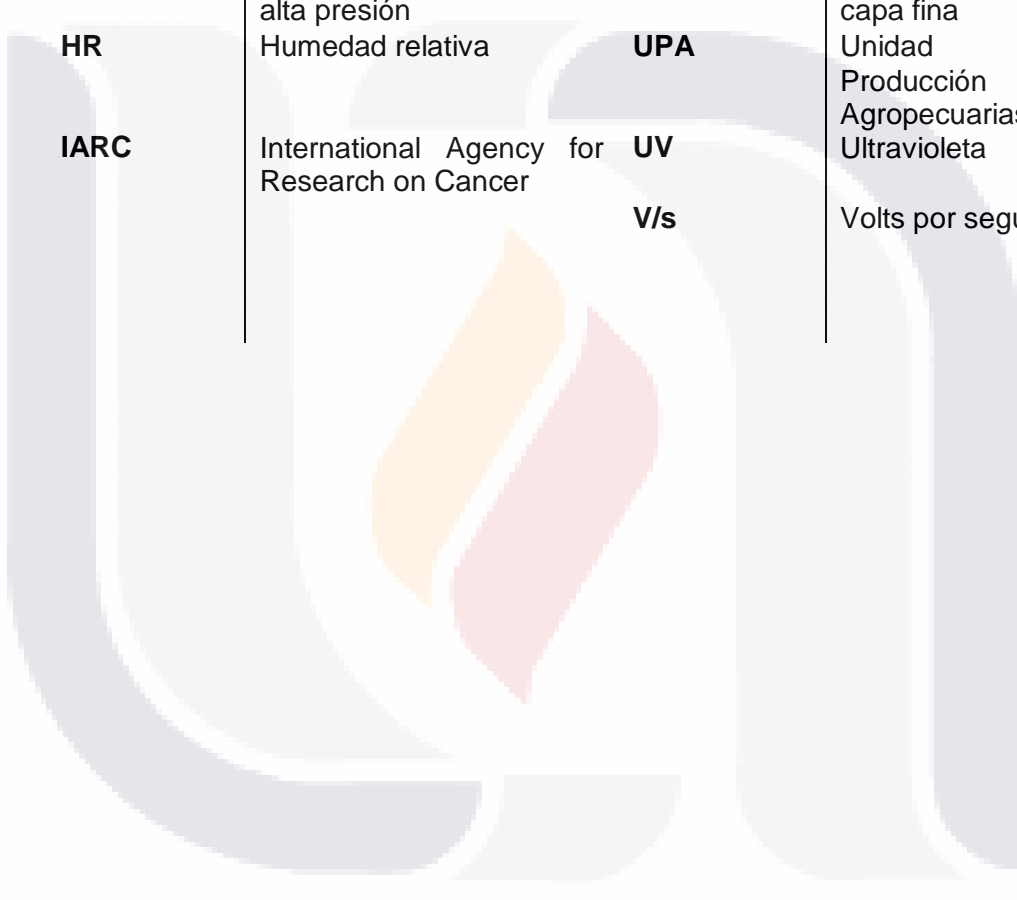
Figura 20. Interacción entre la cepa AF-EM1 (AF⁻) y las cepas *A. flavus* AF⁺ aisladas de alimento concentrado (AC1, AC2, AC3). 63

Figura 21. Interacción entre las cepas de *A. flavus* (AF⁻ y AF⁺) aisladas de ensilaje de maíz. 64

ACRÓNIMOS

Abs	Absorbancia	INIFAP	Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria
ADN	Ácido desoxirribonucleico	kg	Kilogramo
AFB₁-N⁷-Gua	Aducto trans-8,9-dihidro-8-(N ⁷ -guanil)-9-hidroxi-AFB ₁	L	Litro
AFB₂	Aflatoxina B ₂	LD₅₀	Dosis letal media
AFB_{2α}	Derivatizada de AFB ₁	M	Molar
AFBO	8,9-epóxido-AFB ₁	mg	Miligramo
AFG₁	Aflatoxina G ₁	min	Minuto
AFG₂	Aflatoxina G ₂	mL	Mililitro
AFM₁	Aflatoxina M ₁	mm	Milímetro
AFM₂	Aflatoxina M ₂	mV	Milivolt
AFP₁	Aflatoxina P ₁	ng	Nanogramo
AFQ₁	Aflatoxina Q ₁	nm	Nanómetro
AF	Aflatoxinas	NOM	Norma Oficial Mexicana
ANDEVA	Análisis de varianza	°C	Grados Celsius
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analistas	PDA	Agar papa y dextrosa
a_w	Actividad de agua	p/v	Peso sobre volumen
ARN	Ácido ribonucleico	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
cm	Centímetro	pH	Potencial de Hidrógeno
CPA	Ácido ciclopiazónico	psig	Libras por pulgada cuadrada
CYP₄₅₀	Citocromo P ₄₅₀	ppb	Partes por billón
E.E.	Error estándar	rpm	Revoluciones por minuto
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas	RF	Factor de Resolución
FAO	Food and Agriculture Organization	s	Segundo

g	Gramos	SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación
GLM	Modelo lineal general	SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
h	Hora	USDA	United States Department of Agriculture
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión	TLC	Cromatografía en capa fina
HR	Humedad relativa	UPA	Unidad de Producción Agropecuarias
IARC	International Agency for Research on Cancer	UV	Ultravioleta
		V/s	Volts por segundo



RESUMEN

Las aflatoxinas (AF) contaminan frecuentemente los alimentos para humanos y animales en todo el mundo; son altamente tóxicas, carcinogénicas y teratogénicas. Las AF son metabolitos secundarios de algunos hongos, especialmente *Aspergillus flavus*. Estudios recientes en cultivos de algodón han mostrado la posibilidad de emplear variantes de *A. flavus* como estrategia de control biológico y reducir la presencia de AF. El objetivo del estudio fue proponer una estrategia de control biológico para reducir la presencia de aflatoxinas en ensilaje de maíz destinado a la alimentación de las vacas lecheras. Por el método no probabilístico por conveniencia se realizó un estudio en dos unidades de producción lechera y se obtuvieron 328 muestras de alimento y de suelos agrícolas. Se caracterizaron morfológicamente, mediante microscopía óptica y electrónica de barrido, 283 aislados de suelos agrícolas y alimentos pecuarios congruentes con 10 géneros de hongos; de los cuales 88 aislados correspondieron a *Aspergillus spp.* Con el empleo de iniciadores (ITS1, ITS4, CMDA7F, CMDA8R, *afIR-R* y *afIR-F*) que codifican para amplificación de genes relacionados con la capacidad aflatoxigénica (AF⁺), se identificaron molecularmente 6 aislados como *A. flavus*. Mediante TLC y vapores de amonio en cultivo de agar coco (CAM-AV), cinco de dichos aislados se identificaron como AF⁺. Se evaluó *in vitro* (CAM-AV) la capacidad de los aislados AF⁻ de *A. flavus* (EM1 y AF-36) para disminuir la producción de aflatoxinas en cepas AF⁺(Cuautitlán, Tamaulipas, AC1, AC2, AC3, EM2 y EM3). Se diseñó un modelo experimental con microensilajes de maíz para evaluar la disminución de la contaminación por aflatoxinas en ensilaje de maíz mediante la interacción de *A. flavus* AF⁺ versus AF⁻. Los resultados obtenidos sugieren que los aislados de *A. flavus* AF⁻ que crecen en el mismo sustrato que los aislados aflatoxigénicos tienen la capacidad para inhibir la producción de AF, por lo que pudieran ser utilizados para reducir la contaminación de los forrajes de las vacas lecheras, protegiendo su salud y comportamiento productivo, así como disminuyendo el paso de residuos metabólicos de las AF a la leche y a los productos lácteos.

ABSTRACT

Aflatoxins (AF) frequently contaminate food for humans and animals around the world; Are highly toxic, carcinogenic and teratogenic. AFs are secondary metabolites of some fungi, especially *Aspergillus flavus*. Recent studies in cotton crops have shown the possibility of using *A. flavus* variants as a biological control strategy to reduce the presence of FA. The objective of the study was to propose a biological control strategy to reduce the presence of aflatoxins in maize silage destined to feed dairy cows. By the non-probabilistic method of convenience, a study was carried out in two dairy production units and 328 samples of food and agricultural soils were obtained. 283 isolates of agricultural soils and livestock feed congruent with 10 genera of fungi were characterized morphologically by optical microscopy and scanning electron microscopy; Of which 88 isolates corresponded to *Aspergillus spp.* With the use of primers (ITS1, ITS4, CMDA7F, CMDA8R, *aflR*-R and *aflR*-F) encoding for amplification of genes related to aflatoxigenic (AF +) capacity, 6 isolates were identified as molecularly *A. flavus*. Using TLC and ammonium vapors in coconut agar (CAM-AV) culture, five of these isolates were identified as AF +. The AF-isolates of *A. flavus* (EM1 and AF-36) were evaluated in vitro (CAM-AV) and to reduce aflatoxin production in AF + strains (Cuautitlán, Tamaulipas, AC1, AC2, AC3, EM2 and EM3). An experimental model with maize microassages was designed to evaluate the reduction of aflatoxin contamination in maize silage through the interaction of *A. flavus* AF + versus AF +. The results obtained suggest that, the isolates of *A. flavus* AF- that grow on the same substrate as the aflatoxigenic isolates, have the capacity to inhibit the production of AF. So they could be used to reduce the contamination of the forages of dairy cows, protecting their health and productive behavior, as well as decreasing the passage of metabolic waste from AF to milk and dairy products.

INTRODUCCIÓN

El género *Aspergillus* está constituido por un poco más de 350 especies agrupadas en diferentes secciones. Hasta hace poco se creía que todos los miembros de éste género se reproducían de forma asexual, pero estudios moleculares recientes han permitido la identificación de individuos que se reproducen sexualmente debido a que presentan un sistema de reproducción heterotálico (Varga *et al.*, 2014). Por lo tanto, las posibilidades de recombinación genética son mayores y las posibilidades de que se desarrollen individuos resistentes a los tratamientos antifúngicos aumentan, además de que podrían potencializar su virulencia y la capacidad de producir micotoxinas (Frisvad y Larsen, 2015).

La sección *Flavi* está constituida por cerca de 22 especies, aquí se encuentran las especies productoras de aflatoxinas: *A. flavus*, *A. parasíticus* y *A. nomius*, estos hongos filamentosos contaminan casi todos los productos agrícolas, de especial forma los cultivos de maíz, alterando su aspecto físico y deteriorando su valor nutritivo (Vargas *et al.*, 2011).

Los miembros de la especie *A. flavus* presentan mayor interés para su estudio debido a que son los mayores productores de aflatoxinas (AF), metabolitos carcinogénicos, altamente tóxicos y mutagénicos para el ser humano y los animales (IARC, 2002). *A. flavus* es cosmopolita y su hábitat natural es el suelo, utiliza como sustrato a los residuos orgánicos que dejan las cosechas, siendo el maíz el producto agrícola que presenta mayor susceptibilidad a la contaminación por estos hongos y sus AF (Ehrlich y Cotty, 2004).

La biosíntesis de AF es una actividad del metabolismo secundario de algunos hongos del género *Aspergillus* para la cual intervienen 29 genes o marcos de lectura abierta (ORFs), que desencadenan al menos 23 reacciones enzimáticas que dan origen alrededor de 15 productos químicos intermediarios para la formación de AF (Ahmad, *et al.*, 2014). Los genes que participan en las principales reacciones enzimáticas para la biosíntesis de AF son afl-R, Ver-1, Nor-1 y Omt-1 (Yu, 2012).

De las AF, la AFB₁ es la que se produce en mayor cantidad, su forma natural es inocua, pero al ser ingerida en alimentos contaminados se bioactiva a epóxido en el hígado por la acción enzimática del citocromo P₄₅₀, AFB₁ 8,9-epóxido es el que posee la capacidad tóxica, mutagénica, carcinogénica e inmunosupresora (Groos, 2012). La acción enzimática sobre la AFB₁ también da origen a la AFM₁ que se elimina en leche y es considerada por la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer como agente cancerígeno para los humanos (IARC, 2002).

El maíz es uno de los productos agrícolas con mayor susceptibilidad a la contaminación por *A. flavus* y AF (Reyneri, 2006; Soares, 2013), en México es el producto agrícola de mayor importancia y el que se produce en mayor cantidad, forma parte fundamental de la dieta de los mexicanos. Además, representa más del 50% del porcentaje total de la dieta de las vacas lecheras. Su consumo principal es en tortilla para las personas y en ensilaje para el ganado lechero.

Debido a la problemática de la contaminación de los alimentos con hongos aflatoxigénicos y AF, se ha trabajado en México, y en muchos países alrededor del mundo, en el diseño de estrategias eficaces para reducir el riesgo de exposición a estos metabolitos carcinogénicos; sin embargo, aumentan los costos de producción y no ha logrado remediar por completo la problemática de contaminación.

Estudios recientes han confirmado la existencia de dos variantes de *A. flavus* que incluyen aislamientos aflatoxigénicos y no aflatoxigénicos de cepas presentes en el suelo, las cuales se han clasificado como: *A. flavus* cepa S (esclerocio < 400 micras) y *A. flavus* cepa L (esclerocio > 400 micras) (Ehrlich, 2014) y la capacidad de producir AF se ha asociado al tamaño de su esclerocio, cepas S producen mayor cantidad de AF en comparación a las cepas L (Mauro *et al.*, 2013).

Debido a que las cepas L crecen a mayor velocidad que las cepas S, se ha estudiado la posibilidad de usar aislamientos nativos de *A. flavus* no aflatoxigénicos (cepas L) para proponer estrategias de control biológico (Ehrlich, 2014) y reducir la propagación de *A. flavus* aflatoxigénico (cepas S) en los productos agrícolas destinados a la alimentación humana y animal (Okunt *et al.*, 2015) y de esta forma reducir la contaminación por AF en los productos agrícolas producidos en el mundo.

En los últimos años se ha propuesto la posibilidad del control biológico de cepas S (aflatoxigénicas) con cepas L (no aflatoxigénicas) ya que las cepas L inhiben la formación de AF de las cepas S, compiten por el substrato, se desarrollan y reproducen más rápido que las cepas S estudios recientes han evidenciado que la velocidad de crecimiento de las cepas L es mayor, por lo que reducen la cantidad de nutrientes que pudieran ser aprovechados por las cepas S para su crecimiento, desarrollo y producción de AF (Okun *et al.*, 2015).

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aspergillus flavus es un ejemplo de hongo, aflatoxigénico, que son habitantes naturales del suelo y se distribuyen en todo el mundo. En los últimos años las prácticas agrícolas empleadas para el rendimiento y mejoramiento de los productos agrícolas destinados a la alimentación humana y animal, han alterado el ecosistema y el hábitat de muchos microorganismos que se ven en la necesidad de evolucionar y desarrollar estrategias de supervivencia; tal es el caso de éstos hongos, que bajo condiciones ambientales extremas, su metabolismo se encamina a la producción de aflatoxinas, metabolitos secundarios altamente tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos para los humanos y los animales (IARC, 2002).

A. flavus crece y se desarrolla en casi todos los productos agrícolas que se producen a nivel mundial alterando su aspecto físico y deteriorando su valor nutritivo, además los contamina con AF y esto representa grandes pérdidas económicas para el sector agropecuario, aunado a esto están los graves daños en la salud humana ya que las AF se consideran como la causa principal de diversos carcinomas hepáticos (FAO, 2003)

El efecto sobre la salud animal se refleja en pérdidas productivas que influyen significativamente en la economía de los países donde se presentan los problemas de contaminación con AF, las vacas lecheras que ingieren dietas contaminadas con AF eliminan en la leche AFM₁, metabolito carcinogénico para los humanos, por lo tanto, el consumo de productos contaminados con AF aumenta, en gran medida, el riesgo de padecer algún tipo de cáncer (IARC, 2002).

En México, la producción de maíz es una actividad agropecuaria que influye en la estabilidad económica del país, ya que es de los principales países consumidores, *per cápita*, de maíz y más del 50% de las dietas destinadas para la alimentación de vacas lecheras está integrada por maíz en alguna de sus formas de conservación. Las estrategias empleadas para reducir los problemas de contaminación con AF son insuficientes para remediar la problemática y el sector agropecuario sigue padeciendo las consecuencias (Cleveland *et al.*, 2003).

1.1. JUSTIFICACIÓN

Durante muchos años se ha pensado que todos los miembros de la especie *Aspergillus flavus* producen aflatoxinas; hasta hace algunos años se lograron identificar dos variantes de esta especie: *A. flavus* cepas S y *A. flavus* cepas L, estas variantes se

relacionan con el tamaño de los esclerocios que producen y con la capacidad aflatoxigénica que poseen. Estudios recientes han demostrado que las variantes de *A. flavus* cepa L no producen AF, además de que su velocidad de crecimiento es más acelerada en comparación a las variantes cepa S. Debido a que no producen AF su metabolismo solo se encamina a la formación de biomasa por lo que aprovecha los nutrientes del sustrato para su crecimiento y desarrollo. Caso contrario es el de las variantes cepa S, que además de metabolizar nutrientes para su conformación estructural, en determinadas etapas de su desarrollo y bajo ciertos factores ambientales y genéticos, su metabolismo se encamina a la producción AF por lo que requiere mayor concentración de carbohidratos y además retrasa su velocidad de crecimiento, por lo que su propagación es más lenta que las variantes cepa L (Ehrlich, 2014).

Algunos investigadores han aprovechado las diferencias entre ambas variantes para diseñar una estrategia de control biológico por competencia y reducir la presencia de AF en campos agrícolas destinados a la producción de algodón (Cotty and Bayman, 1994).

En México las estrategias de control para la contaminación de productos agrícolas con AF se encamina más al uso de agentes secuestrantes, lo que genera un gasto extra para los productores agropecuarios cuyas utilidades ya se ven afectadas por la presencia de *A. flavus* y sus AF.

Por lo tanto, la caracterización morfológica, molecular y aflatoxigénica de aislados nativos de Aguascalientes permitirá la identificación de las dos variantes de *A. flavus*, siendo este el primer paso para el diseño de un control biológico que pueda ser empleado en los ensilajes de maíz. Este diseño de control biológico será probado en ensilaje de maíz que se producirá con un diseño de micro silos.

2. ANTECEDENTES

2.1. LA ACTIVIDAD AGROPECUARIA

2.1.1. Importancia del sector agropecuario en el contexto mundial

El sector agropecuario es fundamental para el desarrollo económico de los países debido a que esta actividad transforma los recursos naturales en productos de primera necesidad para la subsistencia humana; convirtiéndose en una de las actividades económicas de mayor importancia en el contexto internacional (FAO, 2017). El sector agropecuario se conforma principalmente por el sector agrícola y el sector pecuario.

Pese a las reformas económicas que han relegado la actividad agropecuaria a planos secundarios, en México la actividad agropecuaria posee gran potencial de crecimiento y competitividad en el ámbito internacional (SAGARPA, 2018). Dentro de la producción agropecuaria de América Latina, México ocupa el tercer lugar y el onceavo a nivel mundial (SAGARPA, 2018)

2.1.2. La actividad agrícola en México

La agricultura es una de las actividades más antiguas que aún sigue manteniendo importancia económica, cultural y alimentaria a nivel mundial, Mesoamérica es considerado uno de los centros que dio origen a esta actividad y entre las contribuciones más importantes de esta cultura al mundo fue el cultivo del maíz (*Zea mays* L.) (Hernández, 1985; Engels *et al.*, 2006). El maíz es un producto agrícola de interés mundial por su uso como alimento para humanos y animales, se cultiva en diversos países del mundo como China, Rusia, Brasil, Sudáfrica, Italia, Portugal, Egipto Francia, Argentina y México (Plasencia, 2004; Martínez, 2014).

El maíz es el producto agrícola de mayor importancia para la ganadería y la agricultura mexicanas. Este cultivo ocupa la mayor superficie de siembra (8 449 326 Ha); por eso es la base de la mayoría de las dietas alimenticias para ganado bovino productor de leche (SIAP, 2018). En el año 2017 se obtuvo una producción total de 31 214 043 toneladas de maíz, el 25.8 % correspondió a maíz amarillo y el 74.2% a maíz blanco.

2.1.3. La actividad lechera en México

En México, los esquemas productivos y comerciales que provocan un crecimiento importante de la ganadería lechera son básicamente las grandes extensiones de

explotaciones ganaderas que se establecen con el fin de proporcionar el suministro de alimento a la población. Esta ganadería se desarrolla como unidades productivas agropecuarias, con posesión privada de la tierra y trabajadores permanentes, con una producción dirigida principalmente a satisfacer el mercado interno (SIAP, 2013).

La introducción de nuevas técnicas para la crianza del ganado y la transformación industrial generan un mercado interno dinámico que consolida a la ganadería bovina mexicana. Actualmente, se reconocen cuatro sistemas productivos: especializado, semi-especializado, doble propósito y familiar o de traspatio (FAO, 2012. SIAP, 2013).

México cuenta con 31 948 274 cabezas de bovinos destinados a la producción lechera (SIAP, 2018), observándose que la producción nacional de leche de bovino ha tenido una tendencia ascendente en los últimos años (Tabla 1). La consolidación y expansión de las empresas lecheras y de organizaciones de productores integrados, han incrementado su participación en el mercado de productos terminados presentando mejores ingresos para sus asociados, al participar del valor agregado generado en el proceso de transformación. Debido a esto último, para el año 2018, la producción de leche de bovino alcanzó un promedio de 12 millones 171 mil 887 litros de leche (SIAP, 2018).

Tabla 1. Producción anual de leche de bovino en México (miles de litros)

Mes	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Enero	839,474	868,179	875,046	892,746	909,607	930,146	957,466
Febrero	823,862	831,730	848,510	867,057	886,937	901,354	931,146
Marzo	848,364	863,556	871,578	895,419	907,492	927,279	957,850
Abril	863,510	860,998	883,256	906,204	926,459	947,207	977,131
Mayo	894,448	892,946	914,975	938,239	949,834	974,352	1,003,378
Junio	916,531	928,019	946,998	964,702	972,823	989,748	1,021,132
Julio	976,949	965,669	994,785	1,019,368	1,039,282	1,046,711	1,067,684
Agosto	969,387	975,299	979,622	1,003,405	1,034,567	1,050,014	1,083,929
Septiembre	962,538	965,445	970,110	1,000,277	1,007,923	1,030,053	1,071,531
Octubre	948,917	956,881	960,257	990,230	1,011,847	1,018,340	1,050,120
Noviembre	935,881	936,182	954,148	960,774	973,196	1,001,154	1,021,927
Diciembre	901,009	920,728	930,636	956,242	987,527	991,199	1,028,592
Total	10,880,870	10,965,632	11,129,921	11,394,663	11,607,493	11,807,556	12,171,887

Fuente: http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecResumen.jsp

En nuestro país el sistema de producción lechero es heterogéneo desde el punto de vista tecnológico, las unidades de producción lechera cuentan con infraestructura tecnológica según sus posibilidades de crecimiento, por lo que se ve influenciado en el número de animales que puedan explotar, las técnicas y procedimientos empleados para su manejo y la calidad de los insumos destinados a la alimentación del ganado (SIAP, 2013). Sin embargo, una de las actividades económicas más importantes para el país dentro de la rama de productos alimenticios es la industria de productos lácteos.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Su crecimiento depende de la cantidad y calidad de leche producida en el país y destinada a la industrialización (ENA, 2017).

La globalización mundial ha repercutido en todos los ámbitos del país, el sector agropecuario ha sido uno de los más afectados, por esto la actividad lechera deriva hacia la producción ganadera de tipo intensivo destinada a satisfacer la demanda interna, que en los últimos años se ha visto afectada por la oferta de leche procedente de otros países. (SIAP, 2018).

2.1.4. La actividad agropecuaria en Aguascalientes

En Aguascalientes, la agricultura es la actividad económica a la que se dedican la mayor parte de las personas económicamente activas (66.6%), mientras que al sector pecuario se dedican alrededor del 32.6% (SAGARPA, 2018), siendo el sector agrícola el que más empleos genera. Sin embargo, es la actividad pecuaria la que aporta mayor porcentaje al Producto Interno Bruto. Por estas actividades económicas, el estado de Aguascalientes, a pesar de su pequeña extensión territorial, se ubica en el décimo lugar con una aportación del 3.6% del ingreso nacional (ENA, 2017).

Dentro del sector pecuario estatal una de las actividades que mayor destaca es la producción de leche de bovino. En el año 2017 la producción promedio alcanzó 432,041 mil litros, y para junio de 2018 había alcanzado los 212,615 mil litros, casi la mitad de producción del año anterior (SIAP, 2018). El desarrollo del sector agropecuario en el estado depende de factores como: suelo, agua, tecnología, vías de comercialización, entre otros, para asegurar la autosuficiencia alimentaria (ENA, 2017).

2.1.5. Desafíos del sector agropecuario

Uno de los desafíos que tiene el sector agropecuario no solo estatal, sino también a nivel internacional es la inocuidad agroalimentaria, muchas de las enfermedades conocidas se transmiten a través de los alimentos y la causa de estas enfermedades incluye bacterias, virus, parásitos, toxinas, metales y priones (FAO, 2017). La inocuidad agroalimentaria garantiza la producción de alimentos sanos y de calidad, reduciendo el riesgo de exposición de la población a adquirir alguna patología que degrade su calidad de vida o la ponga en riesgo (SS, 2002).

El maíz presenta mayor susceptibilidad a ser contaminado por hongos aflatoxicogénicos y AF (Zheng *et al.*, 2006), que al ser ingeridos por las vacas lecheras éstas presentan un trastorno en la salud conocido como aflatoxicosis. Los bovinos

lecheros resisten intoxicaciones agudas, pero las intoxicaciones crónicas son la causa de pérdidas económicas considerables (Cotty, 1994).

2.2. EL GÉNERO *Aspergillus*

2.2.1. Características del género *Aspergillus*

De la gran diversidad de hongos conocidos en el mundo, el género *Aspergillus* es uno de los más abundantes, constituido por un poco más de 350 especies clasificadas en diversos subgéneros y agrupadas en diferentes secciones (Samson, 2014; Frisvad y Larsen, 2015).

Pier Antonio Micheli, en 1729, presentó por primera vez la descripción del género *Aspergillus*; lo nombró así por la similitud estructural de su conidióforo al hisopo litúrgico utilizado para esparcir agua bendita (Amaike y Keller, 2011). Después, Link, en 1809, describe la especie de *Aspergillus flavus* como una especie asexual que sólo produce esporas o conidios asexuales y estructuras asexuales de hibernación denominados esclerocios (Paterson y Lima, 2011).

La identificación de *Aspergillus*, a nivel de género, suele ser fácil basada en sus características morfológicas (Barnett y Hunter, 1999; Raper y Fennell, 1965). Sin embargo, la identificación a nivel de especie es más complicada, especialmente para los aislamientos atípicos (Klich, 2002; Samson, 2014). En 1926, se presentó oficialmente la primera clasificación del género *Aspergillus*, incluyendo 69 especies localizadas en 11 grupos; más recientemente, el término “grupo” se ha sustituido por el de “sección” (Frisvad y Larsen, 2015). Los miembros de este género *Aspergillus* presentan los conidióforos en posición vertical sencilla, debido al estípote que los sostiene (Figura 1); terminan en una hinchazón claviforme llamada vesícula, tienen fiálides en el ápice o irradiando desde el vértice o toda la superficie (uniseriados), algunas especies presentan esterigmas biseriados) y contienen varias esporas o conidios unicelulares, globosos, a menudo de varios colores (Barnett y Hunter, 2000).

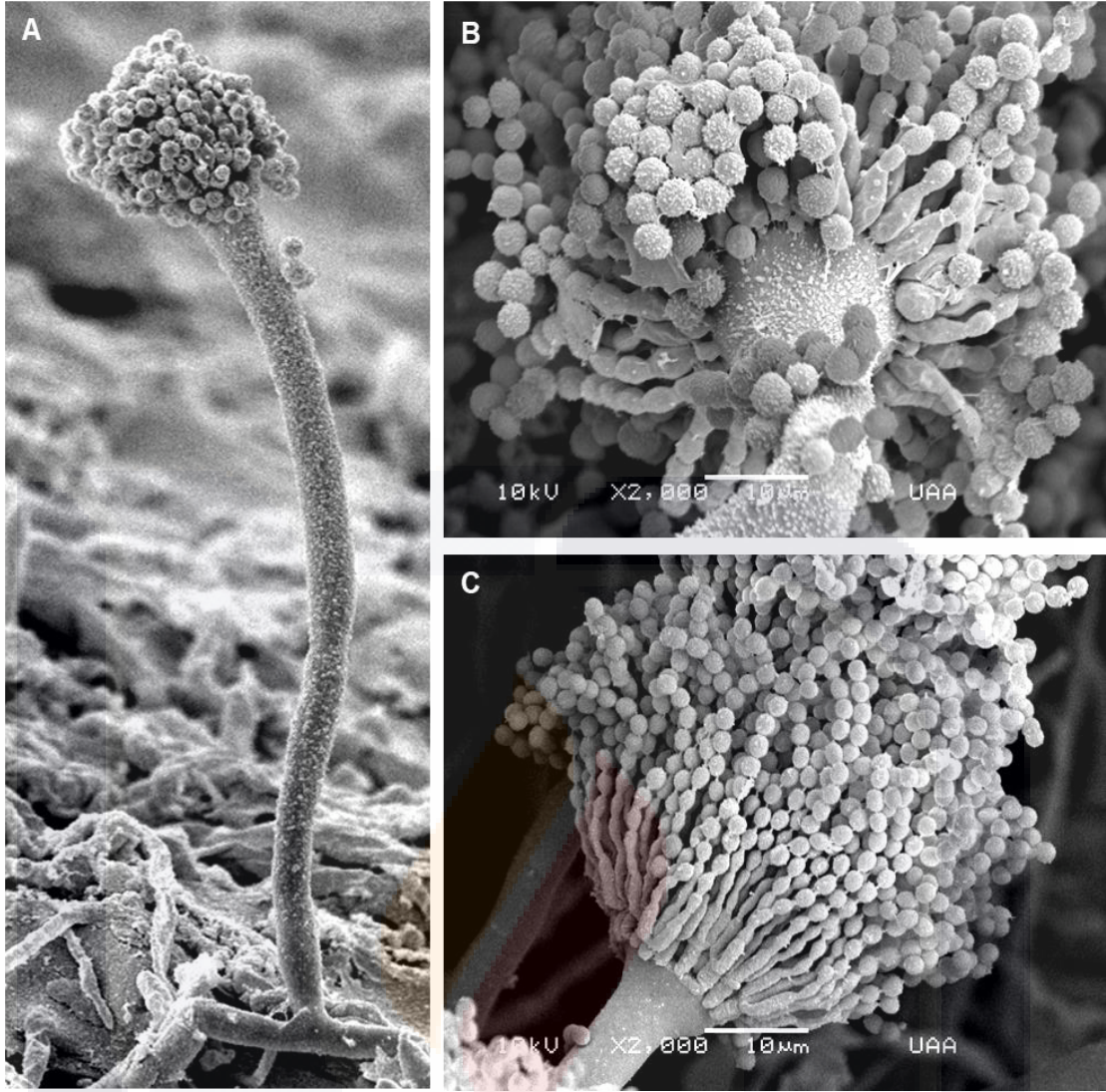


Figura 1. Micrografía electrónica de barrido de *Aspergillus spp.*
Páneos: A) Conidióforo. B) Cabeza uniseriada. C) Cabeza biseriada. Elaboración propia

La taxonomía de *Aspergillus* ha sido ampliamente revisada y reclasificada en los últimos años, basándose sobre todo en estudios moleculares como la secuenciación de genes beta-tubulina o calmodulina (Paterson y Lima, 2011; Yu *et al.* 2010; Yu, 2012). Estos estudios han permitido una identificación más precisa de las especies, pero sin duda seguirán dándose modificaciones en la nomenclatura de *Aspergillus* (Ehrlich, 2014).

Algunas investigaciones recientes han permitido identificar varios individuos del género *Aspergillus* que se reproducen de forma sexual (Varga *et al.*, 2014; Frisvad y Larsen, 2015). Además, la mayoría de las especies presentan un sistema de reproducción heterotálico por lo que las posibilidades de recombinación genética aumentan, lo que podría dar origen a individuos resistentes a tratamientos antifúngicos o se podría potencializar la virulencia y la capacidad de producir micotoxinas, por lo que se estima que aun falta realizar muchas investigaciones detalladas y profundas para conocer el efecto de los cambios genéticos en estas especies micóticas de importancia médica y económica (Varga *et al.*, 2014).

Debido a que sólo se conocía la forma asexual de reproducción de *Aspergillus* fue considerado un hongo anamórfico o imperfecto y se clasificó como miembro de la familia *Trichocomaceae* dentro de la clase *Hyphomycetes*. Aunque la mayoría de los miembros de esta familia pertenecen al filo *Ascomycota*, una fracción de individuos, denominados hongos imperfectos, como el género *Aspergillus*, se clasificaban en el filo *Deuteromycota* (Rapel y Fennell, 1965). Adicionalmente, se ha descubierto que hay individuos del género *Aspergillus* que se reproducen sexualmente (teleomorfos) y se clasifican en el orden de los *Eurotiales* y dentro del filo *Ascomycota* (Amaike y Keller, 2011; Paterson y Lima, 2011).

2.2.2. *Aspergillus* sección *Flavi*

Aspergillus, sección *Flavi*, incluye 22 especies que se han agrupado en siete subtipos. Dentro de esta sección se clasifican especies productoras de aflatoxinas, como *A. flavus* y *A. parasiticus* (Tabla 2), que crecen casi en cualquier cultivo agrícola, también se encuentran incluidas especies que son utilizadas en la fermentación de alimentos como *A. oryzae*, *A. sojae* y *A. tamarii*, estas especies son consideradas domésticas (Varga *et al.*, 2011).

Los miembros de esta sección *flavi* presentan cabezas conidiales en tonos amarillo verdoso y esclerocios de color marrón oscuro. Varias especies de esta sección han sido descritas basándose solamente en los aspectos morfológicos como: diámetro,

color y textura de la colonia, tamaño y textura de conidios y conidióforos. Sin embargo, la clasificación por especie a resultado difícil por la gran similitud en sus características morfológicas (Klich, 2002). La mayoría de los miembros de esta sección son considerados como contaminantes naturales de los cultivos agrícolas ya que deterioran su valor nutritivo y alteran su aspecto físico; ciertas especies suponen un riesgo potencial para la salud ya que producen micotoxinas, una serie de metabolitos secundarios altamente tóxicos (Varga *et al.*, 2011).

Tabla 2. Especies de hongos *Aspergillus* productoras de aflatoxinas

Especie	Distribución	Metabolito producido
<i>A. flavus</i>	Mundial	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , Ac. Aspergílico, Ac. Ciclopiazónico, Ac. Kójico, Paspalininas, Ac. Nitropropiónico.
<i>A. nomius</i>	Brasil, India, Japón, Tailandia y EUA	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , Ac. Aspergílico, Ac. Kójico, Paspalininas, Ac. Tenuazónico.
<i>A. parasiticus</i>	Australia, India, Japón, América del Sur, Uganda, EUA	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , Ac. Aspergílico, Ac. Kójico.
<i>A. arachidicola</i>	Argentina	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , Ac. Aspergílico, Ac. Kójico, Quinazolina.
<i>A. bombycis</i>	Indonesia y Japón	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , Ac. Aspergílico, Ac. Kójico.
<i>A. minisclerotigenes</i>	Argentina, Australia, Nigeria y EUA	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , Aflavarininas, Aflavivinas, Ac. Aspergílico, Ac. Clíclopiazónico, Paspalininas.
<i>A. parvisclerotigenus</i>	Nigeria	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , Ac. Ciclopiazónico, Ac. Kójico, Paspalininas
<i>A. pseudocaelatus</i>	Argentina	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , Ac. Ciclopiazónico, Ac. Kójico.
<i>A. pseudonomius</i>	EUA	AFB ₁ , Ac. Kójico.
<i>A. pseudotamarii</i>	Argentina, Japón	AFB ₁ , AFB ₂ , Ac. ciclopiazónico, Ac Kójico
<i>A. togoensis</i>	África	AFB ₁ , Esterigmatocistina.

FUENTE: Adaptado de Varga *et al.* (2011)

2.3. CARACTERÍSTICAS DE *Aspergillus flavus*

2.3.1. Morfología de *A. flavus*

Las colonias de *A. flavus*, generalmente, presentan conidios de color verde oscuro, verde oliva u oliva, a veces superpuestos con áreas de color amarillo grisáceo a amarillo oliva; micelio blanco; los esclerocios, cuando están presentes, son de color marrón oscuro a negro, de forma y tamaño variable; en ocasiones presenta exudado incoloro, marrón opaco o anaranjado. La textura de la colonia es variable, de lanosa a flocosa; pero generalmente de 2-3 mm de profundidad (Klich, 2002).

Microscópicamente las cabezas conidiales se presentan de irradiadas a columnares; el estípote alcanza un tamaño de entre 400-800 x 8-17 mm de largo, con las paredes generalmente bastante ásperas, incoloras, a veces muy pálidas. Las vesículas tienen una forma de esféricas a alargadas, con un diámetro promedio de 20-45

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

μm de ancho, variable en la seración; la mayoría de las colonias se aíslan con al menos un 20% de cabezas biseriadas, algunas son casi totalmente uniseriadas. Las métulas que cubren tres cuartas partes de toda la superficie de la vesícula, alcanzan un tamaño de entre 8-10 x 5-7 μm ; las fiálides generalmente tienen una longitud de 7-12 x 3-4 μm . Los conidios son de forma globosa a elipsoidal, miden entre 3-6 μm , con paredes lisas y finamente rugosas (Klich, 2002).

Estudios recientes (Ehrlich, 2014) han confirmado la existencia de dos variantes de *A. flavus* que incluyen aislamientos aflatoxigénicos y no aflatoxigénicos de cepas presentes en el suelo, las cuales se han clasificado como: *A. flavus* cepa S (esclerocio < 400 micras) y *A. flavus* cepa L (esclerocio > 400 micras) y la capacidad de producir AF se ha asociado al tamaño de su esclerocio, cepas S producen mayor cantidad de AF en comparación a las cepas L (Krijgsheld *et al.*, 2013).

2.3.2. Condiciones para el crecimiento de *A. flavus*

De la sección *Flavi*, *A. flavus* y *A. parasíticus* son las dos especies que presentan mayor interés para su estudio debido a que son las principales especies productoras de AF y a que *A. flavus* es el segundo agente más común causante de la aspergilosis pulmonar en humanos después de *A. fumigatus* (Varga *et al.*, 2014).

A. flavus es un microorganismo cuyo hábitat natural es el suelo (Cotty, 1994). Estos hongos filamentosos crecen muy bien en los productos agrícolas sobre todo en los granos almacenados como el maíz, donde es saprófito porque su principal fuente de sustrato es la materia orgánica (Ehrlich y Cotty, 2004). *A. flavus* es un microorganismo oportunista que coloniza fácilmente un sustrato cuando hay una rica fuente de carbono y nitrógeno, su principal mecanismo de reproducción es por esporulación asexual, bajo determinadas condiciones ambientales extremas, forman esclerocios capaces de sobrevivir por muchos años (Klich, 2002; Paterson y Lima 2011).

La temperatura óptima para su crecimiento es de 25 a 37 °C, las colonias presentan un aspecto rugoso o en ocasiones lisas, suelen ser de color amarillo a verde lima brillante y crecen a un ritmo rápido (Vargas *et al.*, 2011).

2.3.3. Producción de metabolitos secundarios

A. flavus coloniza los productos agrícolas y produce AF antes, durante o después de la cosecha; en el campo, transporte, almacenamiento o procesamiento (Driehuis *et al.*, 2008; Bhat *et al.*, 2010). Los granos de maíz se encuentran entre los productos agrícolas con mayor susceptibilidad a la contaminación con AF. Reyneri (2006) y Soares (2013), coinciden en que el maíz es uno de los productos agrícolas que presenta mayor

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

incidencia de contaminación por hongos y AF en muchos de los países del mundo. De Luna *et al.* (2013), evaluaron la resistencia que presentan varios genotipos de maíz a la infección por hongos aflatoxicogénicos y a la contaminación por AF, encontrando una asociación entre el genotipo de maíz y el nivel de colonización.

El desarrollo de *A. flavus* se ve favorecido si se reúnen las condiciones adecuadas para su crecimiento: actividad de agua (a_w) de 0.70 a 0.98, concentraciones de iones H^+ (pH) donde los medios ligeramente ácidos (6.5) le favorecen, temperatura de 25 –35°C, concentraciones de O_2/CO_2 , en razón a que crecen bien en medios hasta con un 15% de CO_2 y fuentes de nutrientes principalmente carbono y nitrógeno (Pitt y Hocking, 2009).

2.3.4. Técnicas para la identificación de *A. flavus*

La identificación morfológica de *A. flavus* se basa principalmente en la observación de las características macroscópicas de la colonia (anverso y reverso) y la observación de las estructuras especiales (conidióforos, vesícula, fialides, metulas y conidios) con el microscopio compuesto óptico o electrónico de barrido (López-Arcilla, *et al.*, 2004).

El tamaño promedio de las colonias se encuentra entre 10-30 mm, crecen radial y progresivamente, de aspecto veloso, algodonoso o pulverulentas; de color verde olivo a verde brillante en medio PDA. El color, forma y tamaño de las colonias puede variar dependiendo del medio de cultivo donde se desarrolla el hongo. Para tener mayor precisión en la identificación de *A. flavus* se pueden emplear las claves taxonómicas propuestas para esta especie (Raper y Fennell, 1965; Klich, 2002; Samson *et al.*, 2014).

Los inmunoensayos enzimáticos o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) se ha empleado con frecuencia para la detección de hongos filamentosos, con el inconveniente que se han presentado algunas reacciones cruzadas con otros anticuerpos (Soriano del Castillo, 2007). Fenelon *et al.*, en 1999, reportaron el uso de anticuerpos monoclonales específicos para identificar especies del género *Aspergillus* en tejido pulmonar de un paciente con aspergilosis invasiva causada por *A. fumigatus*. En el estudio se observaron hifas en los tejidos mediante el uso de la tinción con inmunoperoxidasa.

En los últimos años las técnicas moleculares han revolucionado el área de diagnóstico clínico, la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*polymerase chain reaction*) ha contribuido de forma significativa a la identificación de *A. flavus* aislado de suelos, frutos y granos agrícolas (Yu *et al.*, 2010; Yu, 2012; Amare y Keller, 2014). Para la amplificación por PCR se usan como reactivos básicos las cuatro bases nitrogenadas que constituyen el ADN: adenina, guanina, timina y citosina; una polimerasa especial

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

para ADN que funciona a T° elevadas (Taq-polimerasa) y un par de oligonucleótidos (cebadores o iniciadores) y las secuencias seleccionadas corresponden en dirección a la hebra de ADN (3" y 5") (Russell y Niessen, 2007).

Los métodos moleculares no se ven afectados por las condiciones ambientales y no dependen de la forma de interpretación de quien realiza la identificación (Ehrlich y Yu, 2010). La técnica de PCR es rápida, específica y fácil de implementar, presenta alta sensibilidad y requiere de cantidades muy pequeñas de ADN genómico lo que permite detectar células diana en mezclas complejas; por esto han sido utilizadas para la detección de especies aflatoxicogénicas de *A. flavus* (Amare y Keller, 2014). Las regiones de ADN o genes marcadores más utilizados para la identificación de especies de la sección *flavi* es el gen de la calmodulina (Cm α) (Geiser *et al.*, 1998) y el gen de la β -tubulina (Glass y Donaldson, 1995).

Existe una alta variabilidad genética entre los miembros de la sección *flavi*, por lo que la amplificación de un solo gen no es suficiente para la identificación de *A. flavus* (Yu, 2012). Se ha sugerido la amplificación de uno o dos genes más (Amare y Keller, 2014). Para la identificación de *A. flavus* aflatoxicogénico se sugiere la amplificación del gen regulador de la síntesis de AF (*afl-R*) o de algún otro gen que participe en la activación de la ruta para la biosíntesis de AF y desencadene las reacciones enzimáticas que dan origen a los principales productos intermediarios de la AFB₁ (Shapira *et al.*, 1996.), estos genes pueden ser: VER-1, OMT-1 o NOR-1 (Yu, 2012. Amare y Keller, 2014).

2.4. PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS

Las AF representan un serio peligro para los seres humanos y para los animales porque son contaminantes ambientales naturales en la mayoría de los productos alimentarios (Deshpande, 2002; Duarte y Villamil, 2006). Cuando el crecimiento del hongo termina o es interrumpido debido a la falta o a la insuficiencia de algún nutriente esencial, los procesos del metabolismo se encaminan hacia la producción de AF (Yu *et al.*, 2010; Yu, 2012), las cuales se producen en gran cantidad durante la fase estacionaria y al final de la fase exponencial del ciclo de vida del hongo (Samson, 2011).

La biosíntesis de AF es una actividad del metabolismo secundario de algunos hongos del género *Aspergillus* y se ve influenciada por factores bióticos y abióticos (Yu, 2012). Estos factores no genéticos influyen en la expresión del gen regulador de AF (*afl-R*) que pueden alterar el proceso de transcripción (Yu *et al.*, 2010). La esporulación y la formación de esclerocios también resultan del metabolismo secundario de los hongos.

Las AF son compuestos ubicuos, policetónicos resultantes de las reacciones de condensación que tienen lugar cuando bajo determinadas condiciones ambientales, fisiológicas o genéticas se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por los hongos aflatoxigénicos (Díaz, 1995; Céspedes, 1997).

2.4.1. Características físico-químicas de las aflatoxinas

Las AF son un grupo de alrededor de 15 a 20 compuestos químicos estrechamente relacionados, son inodoras, insípidas e incoloras. Químicamente son estables en los alimentos y resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normales, por lo que es muy difícil eliminarlas una vez que se producen. Pertenecen a la familia de las difurano-cumarinas (Tabla 3) y se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a su estructura química (Urrego y Díaz, 2006).

Tabla 3. Estructura química de las aflatoxinas

Grupo	Tipo de Aflatoxina	Fórmula estructural	Peso molecular (g/mol)	Punto de fusión (°C)
Serie 1 Difurano-cumaro-ciclo- pentanonas	B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269
	B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289
	M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299
	M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293
Serie 2 Difurano-cumaro-lactonas	G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	328	244-246
	G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240

Fuente: Urrego y Díaz (2006)

Las dos principales especies de *Aspergillus* que producen AF son *A. flavus* y *A. parasiticus*, las AFB₁ (Figura 2) es la que presentan mayor interés para su estudio (Juan *et al.*, 2007) debido sus propiedades carcinogénicas, inmunosupresoras, nefrotóxicas, y hepatotóxicas. Las aflatoxinas M₁ y M₂ son productos hidroxilados del metabolismo oxidativo de las AFB₁ y AFB₂ respectivamente, metabolitos que pueden eliminarse en la leche (Paterson y Lima, 2010). Las AFB₂, AFG₁ y AFG₂ son menos frecuentes y casi nulas en ausencia de AFB₁ (Forouharmeh *et al.*, 2013).

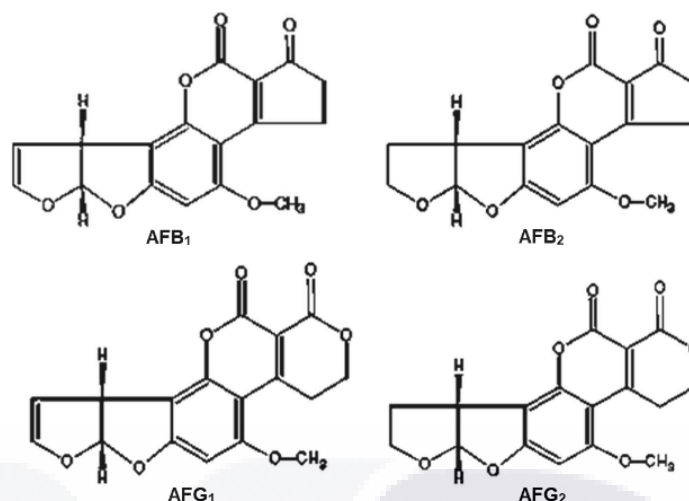


Figura 2. Estructura molecular de las principales aflatoxinas
(Urrego y Díaz, 2006)

2.4.2. Biosíntesis de aflatoxinas

Las AF son polipéptidos derivados de difurano-cumarinas que se sintetizan a partir de malonil CoA, la primera reacción da origen a la formación de CoA hexanoílo y seguida de la formación de antraquinona 9,10-dioxoantraceno. Dos sintetisas de ácidos grasos (FAS-1 y FAS-2) y una policétido sintetasa (PKS) participan en la síntesis del policétido derivado de acetyl-CoA (Yu *et al.*, 2010; Roze *et al.*, 2013). Se estima que existen al menos 23 reacciones enzimáticas que están involucradas en la ruta de biosíntesis para la formación de AF y han sido identificados alrededor de 15 productos químicos intermediarios (Figura 3) (Kabak, 2010; Yu, 2012).

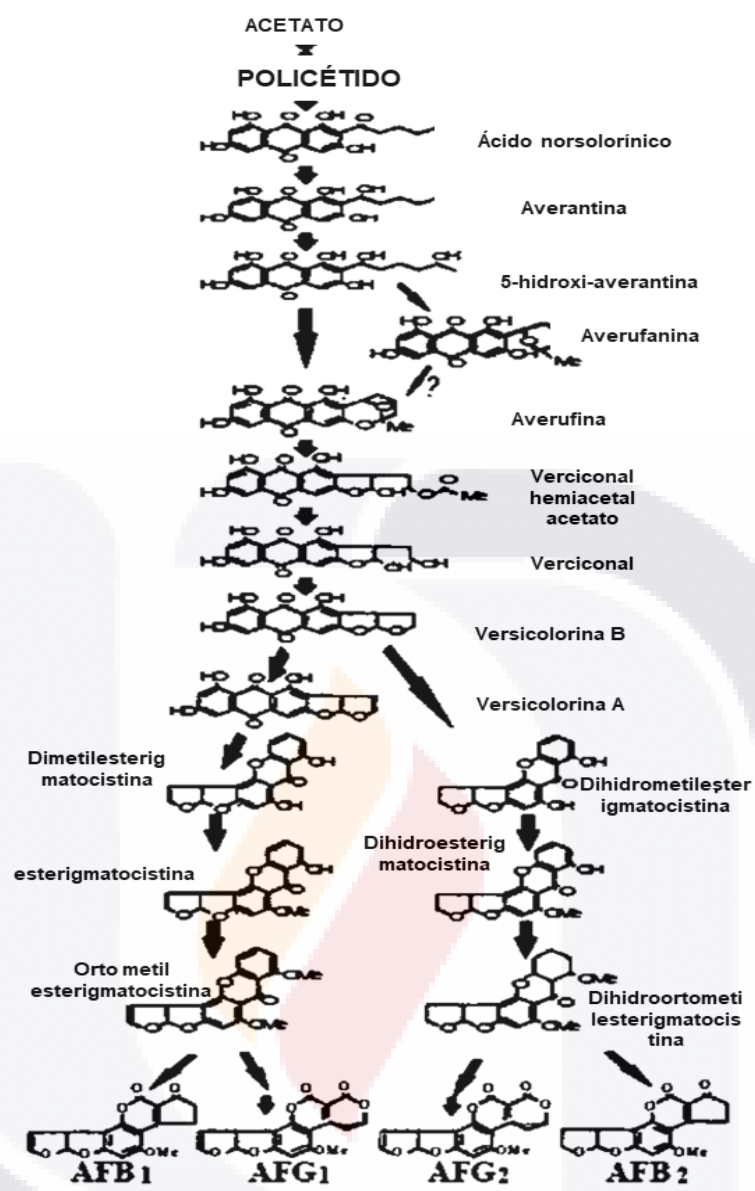


Figura 3. Biosíntesis de aflatoxinas.
(Fuente: Yu, 2012)

Estudios recientes (Yu *et al.*, 2010; Yu, 2012; Ahmad *et al.*, 2014) sobre la identificación de la ruta de biosíntesis para AF, han descubierto la participación de 29 genes (Tabla 4) o marcos de lectura abierta (ORFs), entre los que se encuentran dos grandes grupos: afl-B (Fas-1) y afl-A (FAS-2).

Tabla 4. Genes involucrados en la biosíntesis de las aflatoxinas

Gen	Nombre original	Enzima o producto
<i>aflA</i>	<i>fas-1, hexA</i>	Subunidad alfa de sintetasa de ácidos grasos
<i>AflB</i>	<i>fas-2, hexB</i>	Subunidad beta de sintetasa de ácidos grasos
<i>aflC</i>	<i>pksA</i>	Policétidosintetasa
<i>aflD</i>	<i>nor-1</i>	Reductasa
<i>aflE</i>	<i>norA</i>	Reductasa de ácido norsolorínico
<i>aflF</i>	<i>norB</i>	Deshidrogenasa de ácido norsolorínico
<i>aflG</i>	<i>avnA</i>	Monooxigenasa del citocromo P ₄₅₀
<i>aflH</i>	<i>adhA</i>	Alcohol deshidrogenasa
<i>aflI</i>	<i>avfA</i>	Oxidasa
<i>aflJ</i>	<i>estA</i>	Esterasa
<i>aflK</i>	<i>vbs</i>	Versicolorina B-sintetasa
<i>aflL</i>	<i>verB</i>	Desaturasa
<i>aflM</i>	<i>ver-1</i>	Deshidrogenasa/cetoreductasa
<i>aflN</i>	<i>verA</i>	Mono-oxigenasa
<i>aflO</i>	<i>dmtA, omtB</i>	O-metiltransferasa 1 (B)
<i>aflP</i>	<i>omtA, omt-1</i>	O-metiltransferasa 2 (A)
<i>aflQ</i>	<i>ordA, ord-1</i>	Oxidorreductasa
<i>aflR</i>	<i>aflR</i>	Activador de la transcripción
<i>aflS</i>	<i>aflJ</i>	Potenciador de la transcripción
<i>aflT</i>	<i>aflT</i>	Proteína transmembranal
<i>aflU</i>	<i>cypA</i>	Monooxigenasa del citocromo P ₄₅₀
<i>aflV</i>	<i>cypX</i>	Monooxigenasa del citocromo P ₄₅₀
<i>aflW</i>	<i>moxY</i>	Monooxigenasa
<i>aflX</i>	<i>ordB</i>	Monooxigenasa/oxidasa
<i>aflY</i>	<i>hypA</i>	Proteínas hipotéticas
<i>aflR2</i>	<i>aflR2</i>	Activador de la transcripción
<i>aflS2</i>	<i>aflJ2</i>	Potenciador de la transcripción
<i>aflH2</i>	<i>adhA2</i>	Alcohol deshidrogenasa
<i>aflJ2</i>	<i>estA2</i>	Esterasa
<i>aflE2</i>	<i>norA2</i>	Deshidrogenasa (terminado temprano)
<i>aflM2</i>	<i>ver-1B</i>	Deshidrogenasa (terminal N faltante)
<i>aflO2</i>	<i>omtB2</i>	Metil-transferasa B

Fuente: Yu *et al.*, 2004

El ácido norsolorínico (NOR) es el primer intermediario estable de la AF, después de la formación de este compuesto se presentan una serie de reacciones de óxido-reducción (Yu, 2012; Roze *et al.*, 2013). Las enzimas oxido-reductasa, mono-oxigenasa, deshidrogenasa, dinucleótido-flavina-adenina-mono-oxigenasa, esterasa y sintetasa actúan en secuencia para producir Versicolorin B que es el precursor común de ramas divergentes biosintéticas que producen AFB₁ y AFB₂. De la rama de la AFB₁, versicolorin B-desaturasa produce versicolorin A (VA), que contiene el 2,3-doble enlace en el anillo dihidrodifurano (Kebak, 2010. Yu, 2012), este doble enlace puede ser oxidado en el organismo huésped y formar un epóxido altamente reactivo que media la mutagenicidad, carcinogenicidad y la citotoxicidad de la AFB₁ (Guzman de Peña, 2007).

Varias reacciones enzimáticas están implicadas en la conversión de VA a dimetil-esterigmatocistina y luego a O-metil-esterigmatocistina (Klich *et al.*, 2001), el citocromo P-450 monooxigenasa OrdA cataliza la reacción final para generar la AFB₁ de O-metil-esterigmatocistina (Kabak, 2010; Roze *et al.*, 2013).

2.4.3. Metabolismo de la aflatoxinas

La forma pura de AFB₁ no es mutagénica, sino que requiere la ocurrencia de una fase de biotransformación a epóxido en el tejido, sucede principalmente en el hígado de todos los mamíferos (Valdivia *et al.*, 2012) y se lleva a cabo mediante la acción del complejo enzimático citocromo P₄₅₀. El 8,9-epóxido de AFB₁ es altamente tóxico, mutagénico y carcinogénico (IARC, 2002). La detoxificación de la AFB₁ epóxido puede ocurrir a través de la conjugación con glutatión reducido (GSH), reacción catalizada por las transferasas de GSH (GST; Guzmán de Peña, 2007).

En los seres humanos la detoxificación vía GSH-GST, es inferior a la encontrada en otras especies como en la rata, ratón o conejo (Groos, 2012). La conjugación con GSH es de tipo competitivo y representa el paso de detoxificación más importante con respecto a otros tipos de biotransformación en la obtención de metabolitos menos tóxicos de AFB₁, incluyendo entre ellos aflatoxicol y otros derivados como la AFM₁, AFP₁ y AFQ (Ross *et al.*, 1992; Groos, 2012).

Los metabolitos formados por la acción del sistema de oxidasas de función múltiple (AFQ₁, AFP₁, AFB_{2a}) especialmente por varias isoformas del citocromo P₄₅₀ han mostrado una menor toxicidad y representan los productos de detoxificación. Las dos enzimas más importantes son representadas por la CYP 3A4 que intervienen en la formación de la forma exo-epóxido y el metabolito AFQ₁ y la CYP 1A2 que forma en su mayoría el endo epóxido y la AFM₁ (Guzmán de Peña, 2007; Valdivia *et al.*, 2012; Groos, 2012).

Después de la formación de AFB₁ epóxido, pueden formarse dihidrodioles (8,9-dihidro-8,9-dihidroxi, aflatoxina B₁), metabolitos de la AFB₁ que se unen a proteínas celulares mediante la formación de bases de Schiff, induciendo daño celular y eventualmente muerte celular (Bogantes *et al.*, 2004). AFB₁-epóxido puede formar aductos con los residuos de lisina de la albúmina y otras proteínas celulares (Groos, 2012). La AFM₁ es un metabolito hidroxilado de la AFB₁ que presenta una toxicidad aguda menor que la AFB₁. Estos metabolitos se distribuyen sistemáticamente y de esta forma, se pueden encontrar en la leche, los huevos y los tejidos del animal intoxicado (Rodríguez, 2007; Groos, 2012).

La AFB₁ es la AF más tóxica y está ampliamente asociada con el cáncer de hígado (IARC, 2002); además se presenta hígado graso, pálido, inflamado y friable; la afección de este órgano ocasiona una disminución en la síntesis de enzimas digestivas, por lo que produce un síndrome de mala absorción, que ocasiona una disminución de la ganancia de peso (Groos, 2012). También se afectan los procesos de coagulación de la sangre y los mecanismos en el transporte de lípidos, por lo que, en el examen

bioquímico se puede evidenciar una disminución del valor de la glucosa y un aumento de los lípidos totales, especialmente del colesterol (Rodríguez, 2011).

2.4.4. Mecanismos de acción de las aflatoxinas

Por su alta liposolubilidad las AF se absorben en el tracto gastrointestinal y se biotransforma por la acción de enzimas microsomales de la familia del citocromo P₋₄₅₀. Las AF requieren una activación para producir mutaciones, la ruta de activación es la conversión de la molécula de AF en el metabolito electrofílico AF-8,9-epóxido. La formación del epóxido requiere la presencia de un doble enlace entre los carbonos C8-C9, por esta razón las AFB₂ y AFG₂ son menos tóxicas en comparación con las AFB₁ y AFG₁ (Groos, 2012). La AFM₁ presenta un doble enlace entre los carbonos C8 y C9, por lo que es dos órdenes de magnitud menos tóxica que la AFB₁ en cuanto a carcinogenicidad se refiere (Deshpande, 2002; Groos, 2012). La molécula de AF-epóxido presenta dos conformaciones: una endo y una exo; la forma endo posee aproximadamente 500 veces más poder mutagénico que la forma exo (Urrego, 2006).

El fenómeno de mutagenicidad puede explicarse mediante la formación de un compuesto estable por la unión covalente en el nitrógeno N⁷ de los residuos guanil del DNA (o RNA) mediante la inducción de depurinación y escisión de la hebra lo que puede inducir mutación en células somáticas (Groos, 2012). Estas formaciones de aductos persistentes se llevan a cabo en regiones del DNA, el complejo formado se intercala causando mutación. En este proceso la guanina sufre transversión a timina en el codón 249 del gen *p53*; este gen está implicado como punto de chequeo durante la síntesis y reparación del DNA. Si el daño no se repara, esta misma proteína induce apoptosis (Urrego, 2006). La ocurrencia de este tipo de alteración se ha determinado como carcinoma hepatocelular (Groos, 2012).

Después de la formación de AF-epóxido pueden formarse dihidrodioles (8,9-dihidro-8,9-dihidroxi-aflatoxina), los cuales son metabolitos de AF que se unen a proteínas celulares; AF-epóxido también puede formar aductos con los residuos de lisina de la albúmina y otras proteínas celulares (Steyn y Stander, 1999). Cerca del 5% de la dosis de AF se une a la albúmina (Groos, 2012).

2.4.5. Implicaciones en la salud humana y animal

La capacidad de las AF para inducir la presentación de varios tipos de cáncer en animales domésticos y de experimentación constituye una preocupación para la salud pública, porque algunas aflatoxinas presentan mayor interés por ciertos órganos tales como hígado y riñón, así como por los sistemas inmune y nervioso (Valdivia *et al.*, 2012).

La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC, 2002) clasificó a las AF en el grupo 1, como compuestos carcinógenos para humanos y AFM₁ en el 2, como compuestos posiblemente carcinogénicos para humanos. Además de los efectos carcinogénicos, son conocidos los efectos adversos en la salud y en la producción de los animales domésticos (Valdivia *et al.*, 2012), presentándose reducción en la ganancia de peso, efectos adversos en la reproducción, daño al sistema inmunológico, síntomas severos de intoxicación incluso muerte cuando los niveles tóxicos son demasiado altos (Díaz, 1995; Valdivia *et al.*, 2012).

La FAO ha estimado que el 25% de la producción mundial de cultivos es afectada por las micotoxinas. Adicional a los efectos adversos de las micotoxinas sobre la salud y la producción de animales, y sobre la salud humana, la contaminación con AF genera pérdidas económicas al productor, distribuidor, procesador y consumidor de alimentos, y ocasiona problemas de comercio internacional de granos y cereales (FAO, 2003).

2.4.6. Métodos para la detección de aflatoxinas

Debido a la gran problemática de la contaminación por AF en ingredientes alimenticios para el ganado lechero, se han desarrollado varios métodos analíticos y entre los que tienen mayor precisión para la identificación de AF en alimentos es la cromatografía en capa fina (TLC), herramienta que puede ser cualitativa o semicuantitativa, estableciéndose como método oficial por parte de la *Association of Analytical Chemistry* (AOAC), entre los métodos más modernos que se han desarrollado esta la cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), además de las columnas de inmutofinidad y el ELISA (Requena *et al.*, 2005; Kralj y Prosen, 2009).

2.5. CONTROL BIOLÓGICO DE LA CONTAMINACIÓN CON AFLATOXINAS

2.5.1. Exclusión competitiva

Cuando dos especies biológicas se encuentran en competencia por los mismos recursos no pueden coexistir en forma estable y uno de los competidores siempre dominará al otro, llevándolo a la extinción o a una modificación. Este término de exclusión competitiva también se ha empleado para describir la interacción entre cepas toxigénicas y atoxigénicas de *A. flavus* (Cotty y Bayman, 1993). En los experimentos de estos últimos autores, infectaron semillas de maíz con la cepa atoxigénica AF36, con la cepa toxigénica AF13 y con ambas cepas (21, 6 y 9 semillas, respectivamente). Como

recuperaron más conidios de AF36 llegaron a la conclusión que la competencia por los nutrientes pudo haber contribuido a la disminución de la contaminación por aflatoxinas, debido a la exclusión física.

Wicklow *et al.* (2003) concluyeron que el mecanismo de control biológico para la inhibición de las aflatoxinas puede incluir la exclusión física, la competencia por nutrientes o puede resultar del fracaso de las cepas competidoras para formar una red micelial completamente funcional.

En estudios posteriores (Mehl y Cotty, 2010) se utilizó la técnica molecular de la secuencia de genomas completos mediante luminiscencia (pirosecuenciación) para determinar el polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) y detectar la variación de la biomasa en función de la frecuencia del SNP. Estos autores inocularon, sobre granos de maíz maduros, 38 grupos de *A. flavus* con compatibilidad vegetativa (VCGs), cada uno con un SNP diferente. Cada grupo fue inoculado con una cepa polimórfica atoxigénica (AF36). El análisis de SNP indicó que 15-54% de la biomasa encontrada en los granos se debió únicamente a la cepa común. Claramente, en estos 38 pares no se produjo una exclusión completa por la cepa de control biológico atoxigénico; por lo que se definió el término de desplazamiento competitivo para describir las diferencias en biomasa entre las cepas competidoras.

2.5.2. Inhibición por mecanotransducción

Aún no se ha entendido claramente el mecanismo subyacente de las interacciones físicas entre las especies de *Aspergillus spp.* Una de las posibilidades para mediar las interacciones físicas entre diferentes cepas fúngicas es la mecanotransducción de señales físicas superficiales, mediadas a través de filamentos del citoesqueleto, que terminan afectando la expresión génica nuclear mediante enlaces físicos directos (Wang *et al.*, 2009). Las interacciones por contacto de *Aspergillus* ya había sido reportada (Wynn, 1976; Kumamoto, 2008). Otro ejemplo es el caso de *A. nidulans* en el que el grupo de Schroeckh (2009), demostró la necesidad de un contacto físico con una bacteria para producir metabolitos secundarios que no se producen en cultivo normal.

El grupo de Linz (Chanda *et al.*, 2009, 2010; Linz *et al.*, 2012; Roze *et al.*, 2011) se ha enfocado en la comprensión de la síntesis de aflatoxinas dentro de las células de *Aspergillus parasiticus*, demostrando que pequeñas vesículas, llamadas aflatoxisomas, son sitios de síntesis y exportación de aflatoxina. También, se han generado evidencias que el metabolismo secundario de las células puede ser influido de diversas formas y cambiar el orden de activación transcripcional de genes involucrados en la síntesis de aflatoxinas (Chanda *et al.*, 2010; Damman, 2015). Por lo anterior, puede concluirse que

algunas cepas fúngicas tienen capacidad de realizar algún tipo de interacción con cepas toxigénicas que crecen dentro del mismo sustrato, desarrollando un mecanismo de inhibición de la biosíntesis de aflatoxinas, logrando realizar un control biológico.



3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

La presencia de aislados nativos de *Aspergillus flavus* no aflatoxigénico en maíz disminuye la contaminación por aflatoxinas en ensilaje de maíz.

3.2. OBJETIVO GENERAL

Proponer una estrategia de control biológico para reducir la presencia de aflatoxinas en ensilaje de maíz destinado a la alimentación de las vacas lecheras.

3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.3.1. Obtener y aislar *Aspergillus flavus* de suelo agrícola y de alimento para vacas de unidades de producción lechera en Aguascalientes.

3.3.2. Identificar la morfología, las características moleculares y la capacidad aflatoxigénica de aislados de *Aspergillus flavus* nativos de Aguascalientes.

3.3.3. Evaluar *in vitro* la capacidad de aislados de *Aspergillus flavus* nativos de Aguascalientes para disminuir la producción de aflatoxinas en cepas aflatoxigénicas.

3.3.4. Diseñar y evaluar un modelo experimental para reducir la presencia de *Aspergillus flavus* aflatoxigénico y disminuir la contaminación por aflatoxinas en ensilaje de maíz.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio polietápico con las siguientes fases o etapas: A) Etapa de campo, con una selección de unidades de producción lechera y obtención de muestras de suelo agrícola y alimento para vacas. B) Etapa de laboratorio, para la descripción de las características morfológicas, aflatoxigénicas y moleculares de los aislados de *A. flavus*. C) Etapa de diseño experimental, para evaluar la capacidad de los aislados de *A. flavus* obtenidos para producir AF; primero se probaron *in vitro* enfrentamientos de los aislados y posteriormente se inocularon elotes de maíz en invernadero en un diseño de tratamientos aflatoxigénicos (AF⁺) versus no aflatoxigénicos (AF⁻).

4.1.2. Selección de unidades de producción lechera (UPL)

Con el método no probabilístico por conveniencia se seleccionaron dos unidades de producción lechera (UPL) localizadas en el estado de Aguascalientes (Figura 4), sus principales actividades económicas son la producción de leche de bovino y la producción de maíz, mismo que se destina para la alimentación de su ganado bovino. Previa autorización de los propietarios, se realizó el muestreo de las láminas parcelarias antes de la siembra del maíz y de las dietas alimenticias para vacas lecheras (ensilaje de maíz, concentrado y RTM).



Figura 4. Ubicación geográfica de las unidades de producción (estrella).

4.2. TÉCNICAS DE MUESTREO

4.2.1. Muestreo de suelo agrícola

El procedimiento se ajustó a lo señalado por las normas oficiales mexicanas para muestreo, análisis y estudio de suelos (NOM-021-RECNAT-2000, NMX-AA-132-SCFI-2006). Se muestrearon 5 láminas parcelarias, dibujando imaginariamente una “M” (Figura 3). Sobre la superficie de la parcela agrícola se identificaron los 5 puntos de muestreo y en cada uno se tomaron 5 sub-muestras de 100 gr a una profundidad de 30 cm, a partir de 2 a 4 cm, del perfil de suelo y con ayuda de un sacabocado para suelo. Las cinco sub-muestras se depositaron en una bolsa limpia con cierre hermético debidamente identificada y se obtuvo, finalmente, una muestra de 500 gr. Por cada lámina parcelaria se obtuvieron 5 muestras para un total de 35 muestras de suelo. Las 35 muestras de suelo se almacenaron en una hielera para su transporte al Laboratorio de Investigación del Centro de Ciencias Agropecuarias de la UAA.

4.2.2. Muestreo de alimento

Con base a la técnica establecida por la NOM-188-SSA1-2002 (Figura 5) para muestreo de alimento se tomaron cinco porciones de un kg de ración total mezclada (RTM), alimento concentrado y ensilaje de maíz que se depositaron en una bolsa de plástico y se homogeneizaron para obtener una muestra compuesta de 5kg de RTM y de cada uno de los ingredientes alimenticios (ensilaje de maíz y alimento concentrado). Se obtuvo un total de 266 muestras. Las muestras se identificaron debidamente y se transportaron en una hielera para su análisis en el Laboratorio de Investigación del Centro de Ciencias Agropecuarias de la UAA.

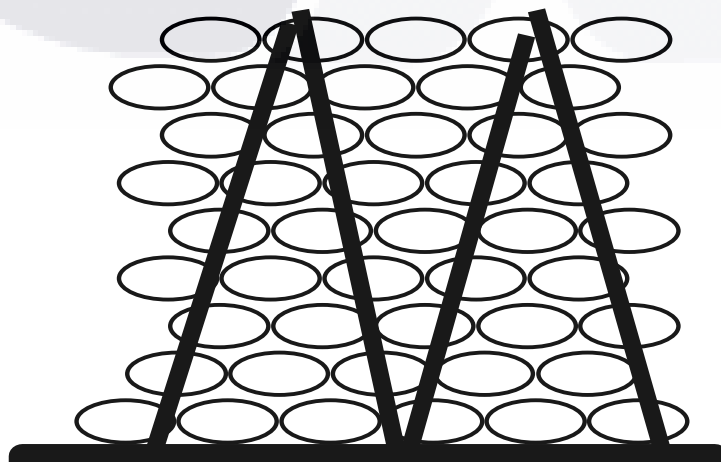


Figura 5. Técnica de “M” o zig-zag para toma de muestras
Fuente: NOM-188-SSA1-2002

4.3. TÉCNICAS PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *A. flavus*

4.3.1. Técnica de vaciado en placa por diluciones

4.3.1.1. Preparación del medio de cultivo papa dextrosa agar. En una balanza semi analítica (BBADAM PGW 453e, Adam Equipment, EUA) se pesaron 39 gr de papa dextrosa agar (PDA: Papa 200 g, dextrosa 200 g, agar 15 g) (Bioxon®, BD Becton Dickinson, EUA) y se disolvió en un litro de agua destilada, el preparado se agitó frecuentemente hasta su ebullición y se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos (Santibáñez *et al.* 2011). El medio estéril se vació en cajas petri estériles dentro de una campana de flujo laminar vertical clase II tipo A2 (LVC-180, Luministell^{MR}, México). La campana se limpió previamente con etanol al 75%, de igual forma el material necesario para el vaciado del medio y se dejó dentro de la campana bajo luz ultravioleta (UV) durante 15 minutos. Se vaciaron 15 mL del medio en cada caja de Petri estéril y se dejaron hasta su gelificación, posteriormente, se taparon las cajas Petri y se almacenaron en refrigeración para su uso posterior.

4.3.1.2. Preparación de agua peptonada (0.1%). Se pesó 1.0 g del polvo de peptona de caseína (Bioxon®, BD Becton Dickinson, EUA) y se disolvió en un litro de agua destilada, se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos, para tener una solución estéril de peptona de caseína al 0.1%, misma que se conservó en refrigeración (5°C) hasta su uso.

4.3.1.3. Preparación de diluciones. En condiciones asépticas se pesaron 10 g de las muestras de alimento y suelo, se diluyeron en 90 mL de agua peptonada al 0.1%, se obtuvieron cuatro diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) y de cada dilución se sembraron 100 μ l en las cajas con medio de cultivo PDA. Las cajas se incubaron en oscuridad, debidamente identificadas a una temperatura de 27 °C durante 5 a 7 días y se monitorearon cada 24 horas hasta observar el crecimiento de alguna colonia fúngica (Santibáñez *et al.* 2011).

4.3.2. Preparaciones con azul de algodón-lactofenol

Las colonias fúngicas que crecieron se identificarán con un número consecutivo. Se colocó una gota de colorante azul de algodón-lactofenol en el centro del portaobjetos previamente desinfectado; con la aguja de disección se tomó una porción de la colonia de interés y se extendió, con ayuda de otra aguja de disección, sobre la gota del colorante, se cubrió con un cubreobjetos previamente esterilizado. Las preparaciones se identificaron con el número de la muestra en la que creció la colonia, el número de

aislado y la fecha. Las preparaciones se observaron al microscopio óptico (Carl Zeiss, Axiostar plus, EUA).

Las colonias del género *Aspergillus*, de acuerdo a las claves taxonómicas empleadas (Klich, 2002) para su identificación, fueron purificadas.

4.3.3. Obtención de cultivos monospóricos

En condiciones asépticas utilizando una campana de flujo laminar, con un palillo estéril se tomó una porción de micelio de los aislados poliespóricos purificados de *Aspergillus spp.* y se diluyeron en 50 mL de agua desionizada estéril (Martínez, 2014).

En cajas de Petri con PDA se depositaron perlas de vidrio (6-8) y 100 μ L de agua desionizada con micelio diluido. Las cajas de Petri se agitaron vigorosamente 20 veces en cada dirección (izquierda-derecha, arriba y abajo) hasta esparcir sobre la superficie del agar los 100 μ L de micelio. Se retiraron las perlas de vidrio, las cajas se sellaron y se incubaron debidamente identificadas, a 26°C en oscuridad y se monitoreó el crecimiento de las colonias.

A las 24 horas se observaron las cajas, se eligieron dos colonias en aquellas donde hubo crecimiento de pequeñas colonias de micelio (cada colonia identificada se origina a partir de un conidio o espora), con un palillo estéril se tomó la colonia, y se sembró en una caja con PDA, y se incubaron a 30 °C debidamente selladas durante siete días, posteriormente fue identificada.

4.3.4. Microscopia electrónica de barrido

4.3.4.1. Preparación de la muestra. De los aislamientos monospóricos se extrajo una porción de la colonia de aproximadamente 0.5 cm³ y se colocó en una placa de cultivo estéril, se recubrieron totalmente con glutaraldehído al 2% y se dejaron en refrigeración durante 24 h para su fijación (Klich *et al.*, 2001). Después de este tiempo se eliminó el glutaraldehído de la placa de cultivo para poder realizar la deshidratación de los aislados fijados. La deshidratación se realizó con la técnica de alcoholes graduales; las muestras se recubrieron con alcohol al 60%, se dejó actuar durante 15min y se retiró de la placa. Esto se repitió para cada concentración de alcohol usando concentraciones de 70, 80, 90, 96 y 100%. Para completar el secado, las muestras se sometieron a un secado por punto crítico dentro del secador de punto crítico (Samdri 795, Tousumis Research, Rockville, Meryland) durante cuatro minutos, el punto crítico se alcanza a una temperatura de 31.1 °C a una presión de 1072 psi.

4.3.4.2. Montaje de las muestras. Las muestras 100% libres de humedad se colocaron sobre cintas de grafito adheridas a un cilindro de aluminio (1cm³) y se pasaron a un

metalizador para muestras (DESK II, DENTON VACUUM, EUA) durante 260 segundos, se recubrieron con oro para obtener un espesor de 100 Å.

4.3.4.3. Digitalización de imágenes. Los trozos de cultivo recubiertos con oro se colocaron dentro de la cámara de vacío del microscopio electrónico de barrido (JSM-5900 LV, JOEL, EUA) y se observaron bajo condiciones óptimas de 10 Kv de voltaje de aceleración, a una distancia de trabajo de 10 mm y a diferentes magnificaciones. Las imágenes se capturaron con detector de electrones secundarios (SE) y las que presentaron problemas de resolución se capturaron con electrones retro-dispersados (BSE) (Glauert, 1974).

4.4. TÉCNICAS MOLECULARES

4.4.1. Extracción de ADN genómico

4.4.1.1. Extracción de ADN. De los cultivos monospóricos se tomó con un palillo estéril un disco de micelio de aproximadamente 1.0 mm de diámetro y se pasó a un tubo Falcón con 4.0 mL de caldo papa y dextrosa (Hoffman y Wriston, 1987). Los tubos debidamente cerrados e identificados se incubaron a 30°C durante 48 horas. Los tubos Falcon se centrifugaron a 3500 rpm durante 30 minutos. La masa celular se lavó con 500 µL de agua destilada estéril, se transfirió a un vial limpio y se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 minutos para descartar el sobrenadante. La pastilla de micelio se resuspendió en 300 µL de buffer de lisis (tritón X-100, 2%; SDS 1%; NaCl, 0.1 M; Tris-HCl pH8, 10mM y EDTA, 1mM) y se le añadió 300 µL de fenol-cloroformo (1:1) y 300 mg de perlas de vidrio (Ballotini) de 0.45mm de diámetro, se agitaron durante 1min en vórtex y se dejaron reposar en hielo durante 1 min. Esta operación se repitió 3 veces. Posteriormente, se añadieron 300µL de TE (10:1; Tris 10mM y EDTA 1mM) y se centrifugaron a 12000 rpm durante 10min. En un tubo nuevo se transfirieron 500 µL del sobrenadante, se agregaron 6 µL de RNAsa y se incubaron a 37°C durante 15 min. Se agregaron 10 µL de acetato de amonio al 4M y 1mL de etanol absoluto, se agitaron por inversión suave y se dejaron reposar a -20°C durante 30min. Se centrifugaron a 12000 rpm durante 10min, se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 100 µL de etanol al 70%. Se eliminó el etanol y se secó en electro evaporador al vacío a 35°C durante 12min; la pastilla de ADN se resuspendió en 35µL de TE 1X (Hoffman y Wriston, 1987).

4.4.1.2. Visualización del ADN. Con la técnica de electroforesis en gel se visualizó la calidad y la cantidad de ADN total obtenida. Se preparó un gel de agarosa al 1% y se sumergió en solución amortiguadora de TAE 1X dentro de una cámara de electroforesis. En cada pocillo del gel se depositó una mezcla de 8µL (1µL de teñidor SYBR Gold®

100X, 3µL de teñidor *Orange loading dye* 6X y 3µL de ADN genómico). En el primer pocillo de cada fila se agregó un ADN control de concentración conocida (ADN λ, de Invitrogen, 250 ng por µL). El gel se dejó correr 45 min a 85 voltios y la visualización del ADN se realizó en un fotodocumentador (BIORAD) y empleando el software Quantity One (versión 4.6.7).

4.4.2. Amplificación de genes con PCR

Se realizó la amplificación de fragmentos del ADN fúngico; para la región ITS1-5.8S-ITS2-ARNr se emplearon los iniciadores universales ITS1 e ITS4 (Eurofins Genomics, Louisville, KY, USA); para el gen de la calmodulina se utilizaron los iniciadores CMDA7F y CMDA8R y para el gen *afIR* se usaron los iniciadores *afIR*-F y *afIR*-R (Eurofins Genomics, Louisville, KY, USA) (Tabla 5). Se siguieron los protocolos descritos por White *et al.*, 1990 para ITS; el de Geiser *et al.*, 1998 para calmodulina y de Shapira *et al.*, 1996 para *afIR*.

Tabla 5. Iniciadores y secuencias empleadas para caracterización molecular de *Aspergillus flavus*

Gen/Región	Peso molecular (Pb)	Iniciador	Secuencia
ITS	NA	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
		ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATG -3'
Calmodulina	468	Cmda7-F (forward)	5'-GCCAAAATCTTCATCCGTAG-3'
		Cmda8-R (reverse)	5'-ATTCGTTTCAGAAATGCCAGG-3'
<i>afIR</i>	796	<i>afIR</i> -F (forward)	5'-GGGATAGCTGTACGAGTTGTGCCAG-3'
		<i>afIR</i> -R (reverse)	5'-TGGKGCCGACTCGAGGAAYGGGT-3'

NA: no aplica. No amplifica un gen sino una región de transcripción.

El volumen total de la mezcla para la reacción de amplificación de los ITS fue de 50 µL (Buffer 5X: 5µL, dNTPs a 10mM: 1µL, MgCl₂: 3µL, DNA: 2µL, Taq-Polimerasa: 0.5µL, iniciador forward: 1µL, iniciador reverse: 1µL y agua libre de nucleasas: 36.5µL). Las condiciones para la reacción de PCR para la amplificación de un fragmento de la región ITS1-5.8S-ITS2 RNAr fueron: Un periodo de desnaturalización de 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos (desnaturalización a 94°C/1 min, alineación a 54°C/1 min y extensión a 72°C/1min), con una extensión final de 9 min a 72°C (White *et al.*, 1990). El volumen total de la mezcla para la reacción de amplificación de los genes de CMDA y *AFLR* fue de 35µL (Buffer 5X: 7µL, dNTPs a 10mM: 4µL, MgCl₂: 4µL, DNA: 5.5µL, Taq-Polimerasa: 0.3µL, iniciador forward: 0.4µL, iniciador reverse: 0.4µL y agua libre de nucleasas: 13.4µL). Las condiciones para la reacción de PCR del gen de CMDA fueron las siguientes: Periodo de desnaturalización un ciclo de 1min/94°C seguido de 30 ciclos (1min/94 °C, para el alineamiento 1 min/53 °C y para la extensión 1min/72 °C) y se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

agregó un período de extensión final de 10 min a 72°C (Geiser *et al.* 1998). Para el gen *afl-R* las condiciones fueron: Para el periodo de desnaturalización un ciclo de 1 min a 94°C seguido de 35 ciclos (1 min/94 °C, para el alineamiento un ciclo de 1min/63 °C y para la extensión un ciclo de 1min/72 °C) y se agregó un período de extensión final de 10 min/72 °C (Shapira *et al.* 1996). Las tres reacciones de amplificación (ITS, CMDA y *afl-R*) se realizaron en un termociclador (modelo 9700 Applied Biosystems, San Francisco, CA, USA).

La calidad de los productos de PCR se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, con 8.0 µL de producto de PCR (ADN amplificado), 3.0 µL de Orange-G (teñidor) y 1.0 µL de SYBR® Gold (teñidor). Se visualizaron las bandas en el fotodocumentador de imágenes (BIO-RAD Molecular Imager®- GEL DOCTM XR Hercules CA, USA) con el software Quantity One (versión 4.6.7.). Se incluyó una escalera de 100 pb como marcador de peso molecular (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA).

4.4.3. Purificación y secuenciación de productos amplificados

Para identificar la sección de nucleótidos amplificada, los productos de PCR obtenidos se purificaron con el reactivo ExoSAP-IT®PCR Product Cleanup (Afflymetrix). Se mezclaron 5 o 7 µL del producto de PCR (dependiendo de la calidad del amplificado) con 2 µL del reactivo ExoSAP-IT y se incubaron a 37°C durante 15min, para la degradación de los iniciadores y nucleótidos remanentes (Sanger, *et. al.* 1977). Finalmente, los productos de PCR se incubaron a 80°C durante 15min para inactivar el reactivo ExoSAP-IT y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Los productos de PCR purificados se secuenciaron en ambas cadenas (forward y reverse) con el método dideoxi de Sanger, *et. al* (1977).

Las muestras se inyectaron en un secuenciador (ABI 3730XL Genetic Analyzers), en el cual se realizó la separación del DNA por electroforesis capilar, que detecta y registra la coloración fluorescente de los nucleótidos (adenina: verde, citosina: azul, guanina: negro y timina: rojo) y los datos resultantes se registrarán en un electroferograma. Los electroferogramas se visualizaron con el software Chromas lite y las secuencias obtenidas se compararon con las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) usando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

4.5. TÉCNICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS

4.5.1. Técnica de agar coco con vapores de amonio

En condiciones asépticas, se pesaron 200g de coco rallado y se agregaron a 1000mL de agua destilada caliente, se mezclaron en licuadora durante 5 min, se pasaron por tres capas de manta de cielo y se ajustó el pH a 6.5. Por cada litro de producto filtrado se agregaron 20g de agar, se mezclaron con frecuencia hasta su ebullición (Davis *et al.*, 1987; Saito y Mchida, 1999; Fani *et al.*, 2014). El medio coco agar (CAM) se esterilizó en autoclave a 16 libras de presión durante 20 min. El medio agar coco estéril se vació en cajas de Petri estériles y dentro de la campana de flujo laminar, previamente desinfectada, a cada caja de Petri se le añadieron 15 ml del medio. Las cajas con el medio se dejaron enfriar hasta su gelificación, posteriormente, se taparon y se guardaron en refrigeración debidamente selladas hasta su uso. Una vez purificados los aislados de *A. flavus* en medio PDA, se realizó la transferencia a una caja con CAM y se incubaron durante tres días en condiciones de oscuridad a 30°C. Pasado el periodo de incubación, en las tapas de las cajas Petri, se depositó una gota (200µL) de solución de amoniaco al 25% y se incubaron en oscuridad a 25°C. Los cultivos incubados se monitorearon hasta observar una coloración rosa. A mayor intensidad de color mayor cantidad de AF presentes en el medio.

4.5.2. Cromatografía en capa fina (TLC)

En condiciones asépticas, dentro de una campana de extracción se fragmentó el medio de cultivo con el aislado monospórico de *A. flavus* y se colocó en un matraz erlenmeyer de 125mL que se tapó con papel aluminio. Se agregaron 15mL de metanol:agua (8:2), se homogeneizó por agitación durante 5 min (Método 972.26. AOAC, 2000). El contenido del matraz se pasó a un tubo Falcón de 50 mL para centrifugarse a 6000rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante por filtración usando papel filtro de porosidad chica y se recuperó en un tubo limpio. Se agregaron 5mL de hexanos, recuperando la fase hidrofílica en otro tubo limpio. A la fase hidrofílica se le agregaron 5mL de cloroformo, se agitó durante 5 minutos y se recuperara la fase del cloroformo para repetir nuevamente éste paso. En un tubo limpio se recuperaron 2.5mL de la fase de cloroformo que se evaporaron a sequedad en baño María y se re suspendió en 500µL de cloroformo.

Para la realización de la cromatografía, las placas de sílica gel sin indicador de fluorescencia (Z265829, Sigma-Aldrich, EUA) se activaron a 110°C en una estufa de alta temperatura (OF-22G JEOL-TECH, Lab Companion, Corea) durante 30min. En la placa cromatográfica se marcó la línea de origen (1.5cm del borde inferior de la placa), se colocaron 5µL del estándar de AFB₁ sobre la línea de origen y del lado izquierdo (1^{er}

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

carril), después 40µL de cada muestra (una muestra por carril) sobre la línea de origen y con un espacio entre muestras de 1cm aprox. Las placas con el estándar y las muestras se colocaron dentro de una cámara cromatográfica con fase móvil cloroformo:acetona:isopropanol (85:10:5) y se dejó correr la fase móvil durante 1.5hrs. Las placas se retiraron de la cámara y se secaron a 100°C en una estufa de alta temperatura durante 10 min. Las placas se visualizaron bajo luz UV en un transiluminador a una longitud de onda de 365 nm, para identificar la presencia o ausencia de manchas correspondientes a AFB₁, con respecto al estándar. La información se registró en una hoja de cálculo electrónica con el software Microsoft Excel® para realizar los análisis estadísticos correspondientes.

4.5.3. Cuantificación de aflatoxinas con cromatografía líquida de alta precisión (HPLC)

Para extraer las aflatoxinas, se pesaron 50 g de la muestra seca y molida, se añadieron 100 mL de metanol:agua (4:1), se mezclaron en licuadora usando un vaso de acero inoxidable durante tres minutos, se filtraron sobre papel filtro de porosidad 1, de acuerdo al método 990.33 de la AOAC (Scott, 1995). Se usaron tubos de extracción en fase sólida (Supelclean™ LC-18 SPE tube, Sigma-Aldrich, EUA). Se limpió el extracto con una mezcla de 1.0 mL del extracto filtrado con 4.0 mL de ácido acético en agua al 0.5%. Se pasó a través de un tubo SPE de 1.0 mL, acondicionado con 2.0 mL de la solución de ácido acético en agua al 0.5%. Posteriormente, la muestra se lavó con el siguiente procedimiento: 0.5 mL de tetrahidrofurano (THF) al 20% en ácido acético 0.5%, luego 2.0 mL de hexano, se secó al aire y luego se añadieron 3.0 mL de THF al 25% en hexano y se secó. Se utilizó una solución de elusión: 2 x 2.0 mL de cloruro de metileno: THF (99:1). El eluato se evaporó del tubo SPE y el residuo se disolvió en 100 µL de metanol, luego se añadieron 100 µL de ácido acético 0.5% en agua. Se derivatizó con ácido trifluoroacético y se inyectó en el sistema cromatográfico de líquidos de alta presión con detector de fluorescencia (Bomba binaria Varian ProStar y detector de fluorescencia Varian, FP-2020, Varian Associates Inc., Victoria, Australia; Columna Supelcosil HPLC LC-18, Supelco Inc.).

Las muestras fueron inyectadas en el sistema cromatográfico bajo las siguientes condiciones: columna (LC-18, USP LI), de 25 cm x 4.6 mm y empaque de 5.0 µm, con guarda columna (LC-18), 2.0 cm x 4.6 mm, mismo empaque, temperatura 25° C. Fase móvil acetonitrilo: metanol: agua (22.5: 22.5: 55), flujo 1.0 mL por minuto, presión 2755 psig, detector de fluorescencia a 360 nm de excitación y 440 nm de emisión, muestra (10 µL), metanol: ácido acético 0.5% (1:1). Las muestras problema se procesarán por

triplicado, se inyectaron en el sistema hasta obtener tres repeticiones consecutivas y se compararon contra estándares positivos, contra estándares negativos y contra una curva patrón de AFB₁ y su derivatizada AFB_{2α} (Scott,1995).

4.6. MICROENSILAJE DE MAÍZ

4.6.1. Producción de maíz en invernadero

La producción de maíz se realizó en el invernadero N°6 en el área agrícola del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, en el municipio de Jesús María (10°20'221" O y 21°05'08"N. Altitud: 1880 msnm). Las dimensiones del invernadero fueron: 6 x 10 m y la construcción de estructura metálica cubierta con película plástica traslúcida; equipado con sistema de riego, ventilador eléctrico, atomizador de agua y mallas laterales que permiten el control de la circulación del aire y la temperatura interior (Figura 6).



Figura 6. Ubicación del invernadero N° 6. Área Agrícola del CCA-UAA

Fuente: <https://www.google.com.mx/maps/place/Aguascalientes/@21.9730255,-102.3627214,206m>

4.6.1.1. Acondicionamiento del invernadero. El invernadero se acondicionó realizando las prácticas culturales tradicionales (desyerbe y fertilización), así como la desinfección con hipoclorito de sodio (3 %) antes de sembrar el maíz. Se seleccionó la variedad de maíz P3055W de PIONNER^{MR} híbrido susceptible a la infección y colonización de *Aspergillus flavus* (de Luna *et al.* 2013) y de ciclo de crecimiento intermedio (100-120 días a floración). El maíz se sembró en macetas (30 x 40 cm) que se prepararon con un evaluado como sustrato libre de microorganismos para reducir en

lo posible la contaminación por hongos y otros microorganismos patógenos para la planta.

Se llevó a cabo la práctica de desyerbe para eliminar la maleza del interior y de los alrededores del invernadero, se niveló la superficie del suelo en el interior y las paredes se desinfectaron preparando una solución de hipoclorito de sodio, al 3%, que se asperjó con ayuda de un aspersor de mano (mochila de fumigación). Esta práctica de desinfección se realizó tres veces durante una semana, previo a la siembra del maíz. Se marcaron siete líneas en el suelo del invernadero usando ladrillos, que se desinfectaron previamente sumergiéndolos en solución de hipoclorito de sodio al 3%, dónde se montaron las macetas (30*27 cm); entre cada línea de siembra quedó un espacio de 70cm, espacio suficiente para que el personal pueda desplazarse y se realicen las prácticas de manejo necesarias.

4.6.1.2. Preparación de las macetas con la mezcla de germinación. Como sustrato se usó musgo esfanginio (*Peat Moss*) y tierra agrícola esterilizada mediante solarización, dejando un sustrato estéril, ligero y con alta capacidad de retención de humedad y con un pH de 5.2-6.0. Cada 150 g del sustrato hidratado dio un rendimiento de 1.0 L y cada maceta se llenó con 12 dm³ de la mezcla para germinación. La mezcla para germinación se preparó con el sustrato, perlitas hortícolas, agua y fertilizante de fondo. Las macetas preparadas se colocaron sobre las líneas de siembra y se mantuvieron con humedad para realizar la siembra.

Se seleccionaron 50 semillas y se sembraron en medio de crecimiento malta-sal-agar (MSA) al 6% de NaCl₂ para verificar la ausencia de microflora fúngica (Moreno-Martínez *et al.*, 2000). Las semillas tratadas se sembraron en las macetas con la mezcla de germinación a una profundidad de 5.0 cm. Los riegos dependieron de la fase fenológica en la que se encontraba la planta, en la fase vegetativa requirieron de 300 mm de agua, 200 mm en la fase de floración y 200 mm en fase reproductiva (Edmeades *et al.*, 1999).

4.6.2. Preparación del inóculo de *A. flavus*

La suspensión de esporas que se utilizó como fuente de inóculo se preparó a partir de los cultivos monospóricos de aislados de *A. flavus* obtenidos de las muestras de alimento y suelo. Además, se preparó inóculo con dos cepas de *A. flavus* (Cuautitlán y Tamaulipas) de alta capacidad aflatoxigénica (de Luna *et al.* 2013) e inóculo con una cepa conocida (AF36 de Syngenta®) que no presenta capacidad aflatoxigénica.

Se obtuvieron cultivos monospóricos de 10 días de crecimiento en PDA incubados en oscuridad a 27°C; la extracción de esporas se realizó en condiciones asépticas

dentro de una campana de extracción. Las cajas con los cultivos en PDA se lavaron con una solución de Tween 20 al 2%; las esporas se suspendieron en agua destilada estéril hasta obtener una concentración de 7×10^7 esporas/mL (Quezada-Viay *et al.*, 2011) y se adicionó aceite parafínico al 1.0% como fijador (Windham *et al.*, 2003; Valdivia *et al.*, 2010). Se prepararon 18 tratamientos (Tabla 6), empleando los aislamientos *A. flavus* aislados de las muestras de alimento y suelo. Además, se preparó una suspensión sin esporas (testigo) y tratamientos combinados entre AF-36 (AF⁻) y aislados *A. flavus* AF⁺ (Cuautitlán, Tamaulipas).

Tabla 6. Diseño de tratamientos para inóculos con esporas de *A. flavus*

Tipo	ID	AF	Sin interacción		Con interacción (AF36)		Con interacción (AF-M1)	
			Tx	ID	Tx	ID	Tx	ID
Testigo*	T	n/a	T-1	n/a				
AF-36	A	-	T-2	A				
Cuautitlán	C	+	T-3	C	T-11	A+C	T-19	4+C
Tamaulipas	T	+	T-4	T	T-12	A+T	T-20	4+T
AF-A1	1	+	T-5	1	T-13	A+1	T-21	4+1
AF-A2	2	+	T-6	2	T-14	A+2	T-22	4+2
AF-A3	3	+	T-7	3	T-15	A+3	T-23	4+3
AF-M1	4	-	T-8	4	T-16	A+4	n/a	n/a
AF-M2	5	+	T-9	5	T-17	A+5	T-24	4+5
AF-M3	6	+	T-10	6	T-18	A+6	T-25	4+6

* Testigo: solución de suspensión de las esporas para inoculación.
n/a= No aplica para esta característica.

4.6.3. Infección del maíz con el inóculo

La inoculación del maíz en el invernadero se realizó por inyección de los estigmas de cada elote con ayuda de una aguja (0.7 x 88 mm) para que la suspensión de esporas se distribuyera hasta el fondo del elote. La inoculación se realizó durante la etapa posterior a la polinización, cuando los estigmas presentaban una coloración café-verdosa a café-rojiza (Quezada-Viay *et al.*, 2011), posteriormente, las mazorcas inoculadas se cubrieron con bolsas de papel y se mantuvieron cubiertas hasta el momento de ensilar el maíz en los micro silos.

4.6.4. Diseño de micro silos

Se elaboraron micro silos de 2.0 kg para evaluar la contaminación por aflatoxinas en el ensilaje de maíz; se elaboraron cinco micro silos por cada tratamiento. El ensilado del maíz se realizó cuando el cultivo alcanzó el momento óptimo para su corte y la línea de leche de los granos llegó a los $\frac{3}{4}$ de distancia. La trituración se realizó usando un molino eléctrico manual hasta lograr un tamaño de partícula de entre 2 y 3 cm. Una vez triturado el forraje se depositó en bolsas de plástico y se compactó debidamente (10 kg/cm²)

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

hasta eliminar la mayor cantidad del aire contenido en la bolsa. Los micro-silos se sellaron y almacenaron debidamente identificados, para su proceso posterior hasta que se hayan concluido las fases del proceso del ensilaje (Flores *et al.* 2014).

4.6.4. Diseño estadístico

Los resultados obtenidos de todas las variables se capturaron y ordenaron en una hoja electrónica de Microsoft Excel® para facilitar su análisis. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) y se realizó el procedimiento para modelos lineales generales (GLM) usando el software *Statistical Analysis System* (SAS, 1999).

El modelo estadístico a seguir para evaluar el diseño completamente al azar será el siguiente:

$$Y_j = \mu + T_j + \varepsilon_j \quad j = 1, 2, \dots, t$$

Donde:

Y_j = variable respuesta (AF, UFC, etc).

μ = media general de respuesta

T_j = efecto del tratamiento (T-1, T2, ... T-17 y T18) sobre cada una de las variables respuestas (Y_j)

ε_j = error aleatorio

La comparación de medias de los tratamientos se realizará por medio de la prueba protegida de Fisher, considerando un nivel de probabilidad $P < 0.05$ (Snedecor y Cochran, 1967).

5. RESULTADOS

5.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Aspergillus spp.* y *A. flavus*

Derivados de un total de 328 muestras de alimento de las vacas lecheras y de suelo agrícola, se identificaron 283 aislados fúngicos, 56.8 % (161) provinieron de los alimentos y los restantes 122 se obtuvieron del suelo (Tabla 7). La identificación de aislados se realizó en dos niveles taxonómicos, primero a nivel de género y después a nivel de la especie *A. flavus*.

Un total de 88 aislamientos (31.0%) mostraron características morfológicas correspondientes a las descritas para el género *Aspergillus* (Klich, 2002). También se encontraron aislamientos con morfología compatible con los géneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Curvularia* y *Bipolaris*. Las proporciones respectivas de cada género se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Géneros fúngicos identificados en muestras de una Unidad Productora Lechera en el Altiplano Central Mexicano

Género	Suelo		Ensilaje de maíz		Alimento concentrado		Ración total mezclada		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Muestras	40	--	96	--	96	--	96	--	328	--
<i>Aspergillus</i>	30	24.6	16	42.1	19	32.8	23	35.4	88	31.1
<i>Penicillium</i>	23	18.9	3	7.9	4	6.9	9	13.8	39	13.8
<i>Fusarium</i>	20	16.4	3	7.9	11	19.0	2	3.1	36	12.7
<i>Rhizopus</i>	15	12.3	4	10.5	7	12.1	8	12.3	34	12.0
<i>Mucor</i>	15	12.3	6	15.8	4	6.9	9	13.8	34	12.0
<i>Cladosporium</i>	5	4.1	4	10.5	10	17.2	10	15.4	29	10.2
<i>Trichoderma</i>	10	8.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0	10	3.5
<i>Alternaria</i>	4	3.3	2	5.3	1	1.7	2	3.1	9	3.2
<i>Curvularia</i>	0	0.0	0	0.0	2	3.4	1	1.5	3	1.1
<i>Bipolaris</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	1.5	1	0.4
Total	122	100	38	100	58	100	65	100	283	100

Solamente seis aislamientos mostraron una morfología coincidente con *A. flavus* y provinieron del alimento concentrado (AC1, AC2 y AC3) y del ensilaje de maíz (EM1, EM2, EM3); al ser cultivados en APD, mostraron características típicas con una coloración verde olivo y la periferia blanquecina. La mayoría de estos aislados (5/6) mostraron presencia de esclerocios de color marrón oscuro, mientras que sólo uno no presentó estas estructuras (figura 7).

La Identificación de aislados es a dos niveles taxonómicos: 1) a nivel de género y 2) a nivel de la especie *A. flavus*.

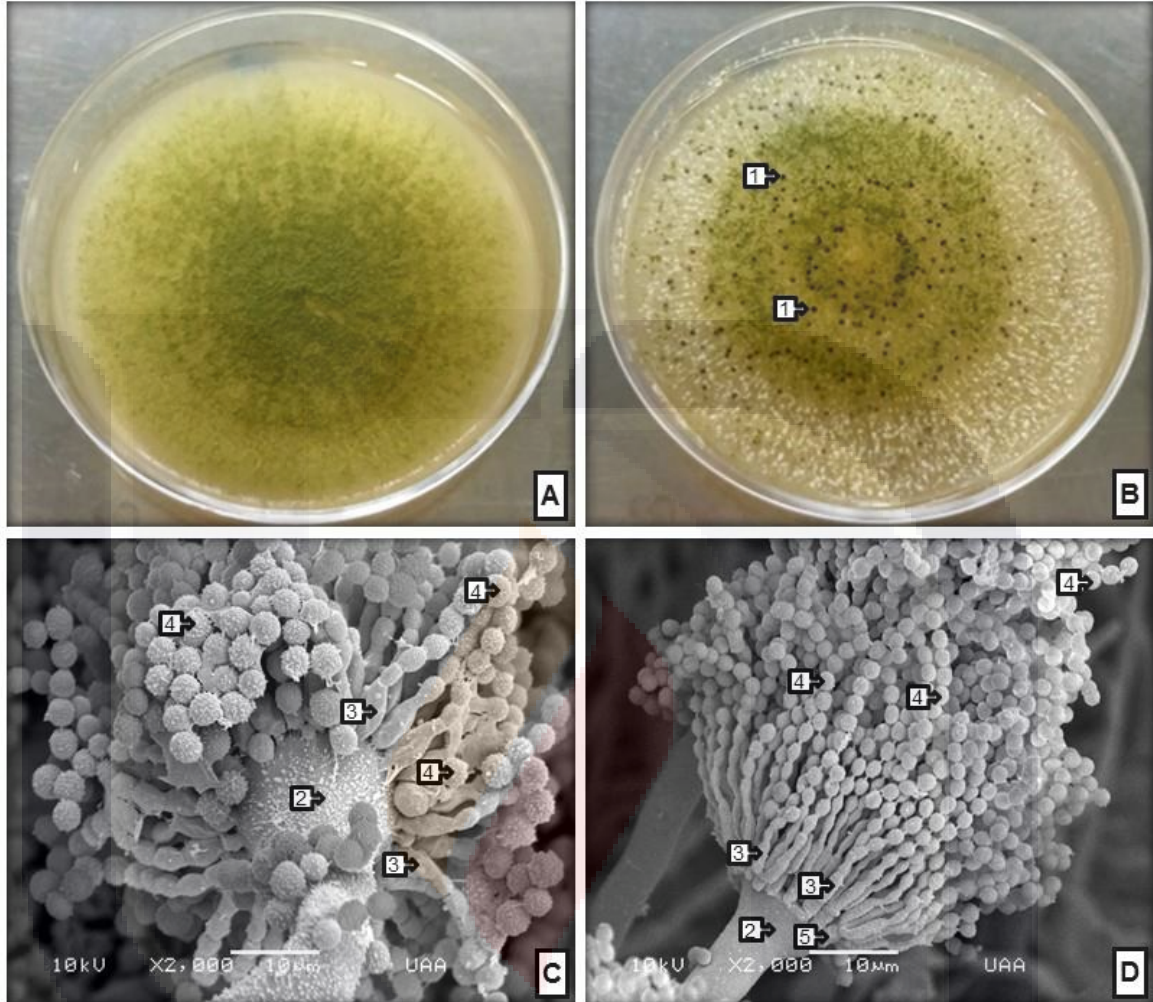


Figura 7. Morfología de los aislamientos de *Aspergillus flavus* en agar dextrosa y papa.

Panel A: características macroscópicas de una colonia color verde olivo. Panel B: Características macroscópicas de una colonia verde olivo con la periferia blanquecina y presencia de esclerocios (1). Panel C: Micrografía electrónica de barrido de un conidióforo uniseriado de *A. flavus*, con vesícula (2), fiálides (3) y conidios (4); 2000X. Panel D: conidióforo biseriado de *A. flavus* que presenta vesícula (2), fiálides (3), conidios (4) y métulas (5); 2000X.

Microscópicamente, los conidióforos de las colonias parecidas a *Aspergillus* presentaron cabezas conidiales irradiadas y uniseriadas, el estípite con paredes rugosas, la vesícula esférica, los conidios tenían forma globosa con irregularidades en la superficie y el micelio septado y blanquecino (Figura 8). Todas estas características coinciden para el género *Aspergillus* según la bibliografía especializada (Barnet y Hunter, 1999).

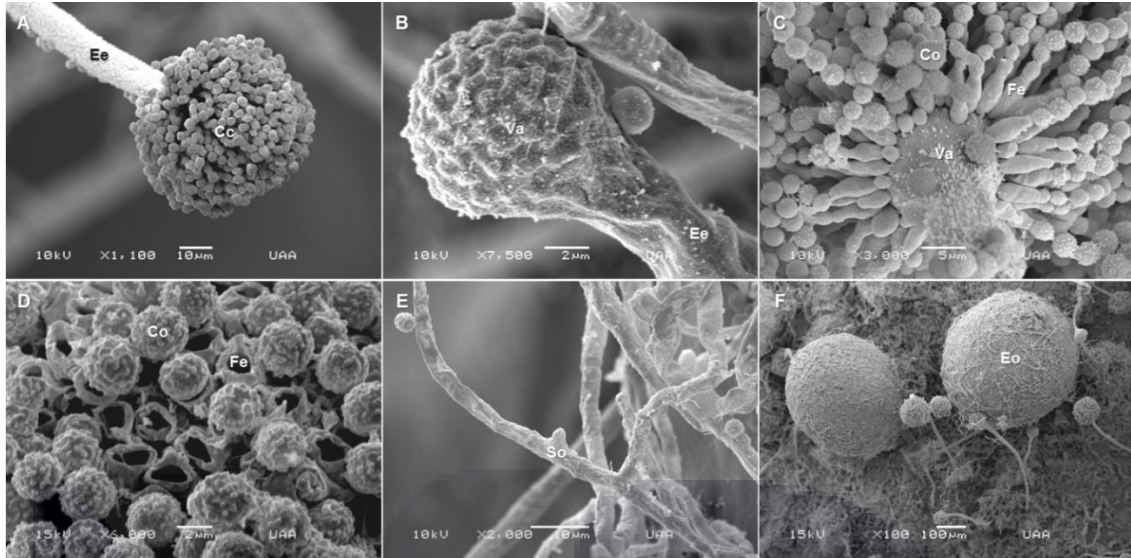


Figura 8. Estructuras morfológicas de *Aspergillus flavus*.

Páneos: A) Cc = cabeza conidial, Ee = estípote. B) Va = vesícula. C) conidióforo. Fe = fiálides, Co = conidio. D) Co = conidio, Fe = fiálide. E) Mo = micelio, So = septo. F) Eo = Esclerocio.

Los seis aislados de *A. flavus* provenientes de alimentos mostraron diferencias significativas en la morfometría de sus estructuras al ser comparadas contra las cepas control (AF-C y AF-T; Tabla 8); aunque estas cepas también mostraron diferencias entre ambas. Estas cepas presentaron cabezas conidiales radiadas, con estípote rugosa, la vesícula de forma esférica, mientras que AF-C sólo presentó fiálides (uniseriadas) y AF-T fiálides y métulas (biseriadas); las conidias de forma globosa con irregularidades en la superficie. Sin embargo, todas estas características coinciden para la especie *A. flavus* según la bibliografía especializada (Klich, 2002). Cuatro aislados se clasificaron como cepas L (esclerocios largos > 400 µm), uno como cepa S (esclerocio corto <400 µm) y otro sin esclerocio.

Tabla 8. Comparación de las dimensiones de las estructuras morfológicas de aislados de *Aspergillus flavus* obtenidos de ensilaje de maíz (EM) y alimento (AC) integral de vacas lecheras, así como de las cepas Cuautitlán (C) y Tamaulipas (T).

Aislado	Estípite			Vesícula			Espora			Esclerocio			Fiálide		
	Media	LI	LS	Media	LI	LS	Media	LI	LS	Media	LI	LS	Media	LI	LS
AF-C	237 ^c	183	291	33.6 ^c	27.5	39.7	3.3 ^b	3.1	3.4	418 ^{cd}	353	483	5.9 ^{ab}	4.9	6.9
AF-T	646 ^a	564	727	76.6 ^a	67.7	85.5	2.8 ^c	2.7	2.9	453 ^{bc}	361	545	6.4 ^{ab}	4.9	7.8
AF-AC1	313 ^{ab}	241	386	54.3 ^b	46.3	62.2	3.1 ^b	3.0	3.3	592 ^{ab}	516	667	5.1 ^b	4.4	5.8
AF-AC2	373 ^{ab}	292	454	58.2 ^b	49.3	67.0	3.0 ^{bc}	2.8	3.1	428 ^{cd}	352	503	5.1 ^b	4.3	5.8
AF-AC3	441 ^{ab}	347	534	47.8 ^{ab}	37.5	58.0	3.1 ^b	2.9	3.3	--	--	--	6.6 ^{ab}	5.5	7.7
AF-EM1	331 ^{ab}	255	407	50.5 ^b	42.1	58.8	3.5 ^a	3.4	3.7	268 ^d	193	344	4.8 ^b	4.1	5.5
AF-EM2	218 ^c	115	320	38.8 ^{ab}	27.6	50.1	3.2 ^b	3.1	3.4	672 ^a	597	748	5.4 ^{ab}	4.1	6.6
AF-EM3	320 ^b	239	401	47.3 ^{ab}	38.4	56.2	3.6 ^a	3.5	3.8	561 ^{ab}	505	617	6.9 ^a	6.0	7.9

-- Sin esclerocio. a-d Medias de columnas con diferente literal muestran diferencias estadísticas significativas ($p < 0.5$). LI, LS Límite inferior y superior de los intervalos de confianza.

5.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

De los 88 aislados identificados morfológicamente como *Aspergillus spp.*, el 49% amplificó para el gen calmodulina con un tamaño de 468 pb (Figura 9).

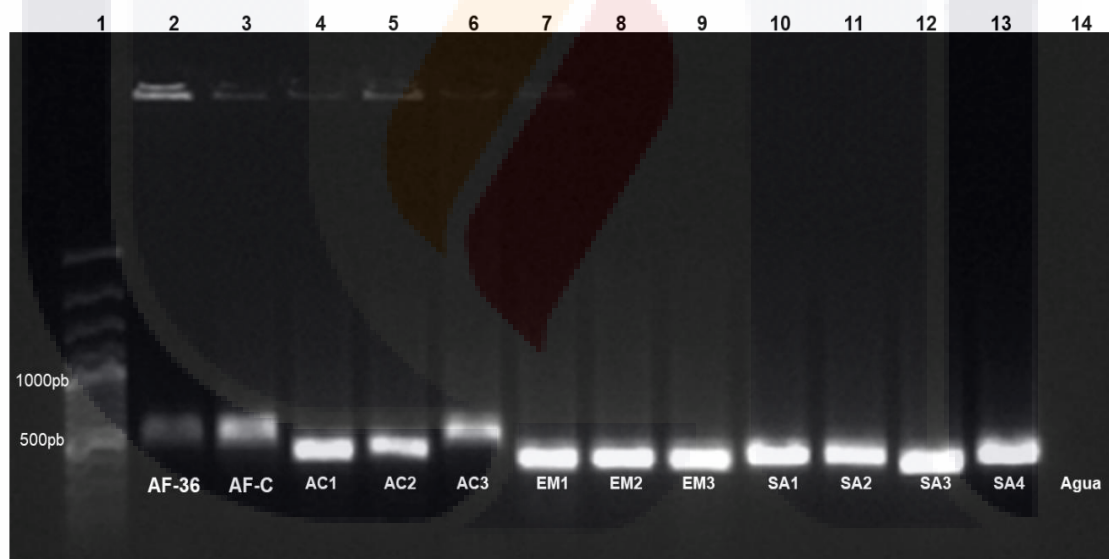


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados del gen Calmodulina.

Carriles: 1) Marcador de peso molecular (100pb). 2) AF-36, *A. flavus* no aflatoxigénico. 3) AF-C, *A. flavus* aflatoxigénico. 4-6) Aislados fúngicos obtenidos de alimento concentrado. 7-9) Aislados fúngicos obtenidos de ensilaje de maíz. 10-13) Aislamientos fúngicos obtenidos de suelo agrícola. 14) Agua.

El 31% de los aislamientos fúngicos amplificó para el ITS en un rango de 600-800 pb (Figura 10). De los aislados obtenidos de alimento concentrado y que amplificaron para ITS; AC1, AC2 y AC3 coincidieron en identidad a cepas de *A. flavus* registradas en las bases de datos del NCBI (Tabla 9).

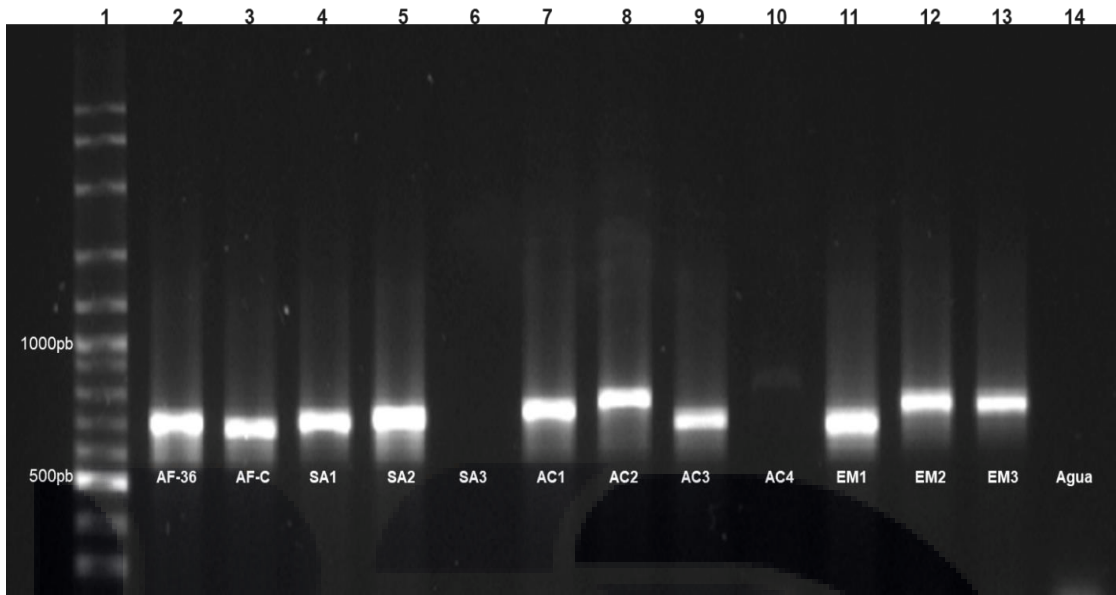


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados para ITS.
 Carriles: 1) Marcador de peso molecular (100pb). 2) de una región ITS. Carriles: 2) AF-36, *A. flavus* no aflatoxigénico. 3) AF-C, *A. flavus* aflatoxigénico. 4-6) Aislados fúngicos obtenidos de Suelo Agrícola. 7-10) Aislados fúngicos obtenidos de alimento concentrado. 11-13) Aislados fúngicos obtenidos de ensilaje de maíz. 14) Agua.

De los seis aislados identificados por sus características morfométricas como *A. flavus*, tres amplificaron el fragmento de 796 pb para el gen *aflR* (Figura 11) y la cepa aflatoxigénica AF-Cuautitlán.



Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados del gen *aflR*.
 Carriles: 1) Marcador de peso molecular (100pb). 2) AF-36: *Aspergillus flavus* no toxigénico. 3) AF-C: *A. flavus* toxigénico. 4-6) AC1, AC2, AC3: aislamientos obtenidos de alimento concentrado. 7-9) EM1, EM2, EM3: aislamientos obtenidos de ensilaje de maíz. 14) Agua.

Se obtuvieron un total de 66 productos de PCR, 31 que amplificaron para el gen de la calmodulina, 30 para una región ITS y 5 para el gen de *aflR*. Cada producto de

PCR se purificó para ser secuenciado en sus dos cadenas (ida “F” y regreso “R”), así, de cada producto amplificado se obtuvieron dos secuencias.

Se obtuvo un total de 132 secuencias, 62 con los iniciadores CMDA7F y CMDA8R empleados para la amplificación del gen de la calmodulina (Figura 12, panel A); 60 con los iniciadores ITS1 e ITS4 para la amplificación de una región ITS (Figura 12, panel B) y 10 con los iniciadores *afIR*-F y *afIR*-R para la amplificación del gen de *afIR* (Figura 12, panel C).

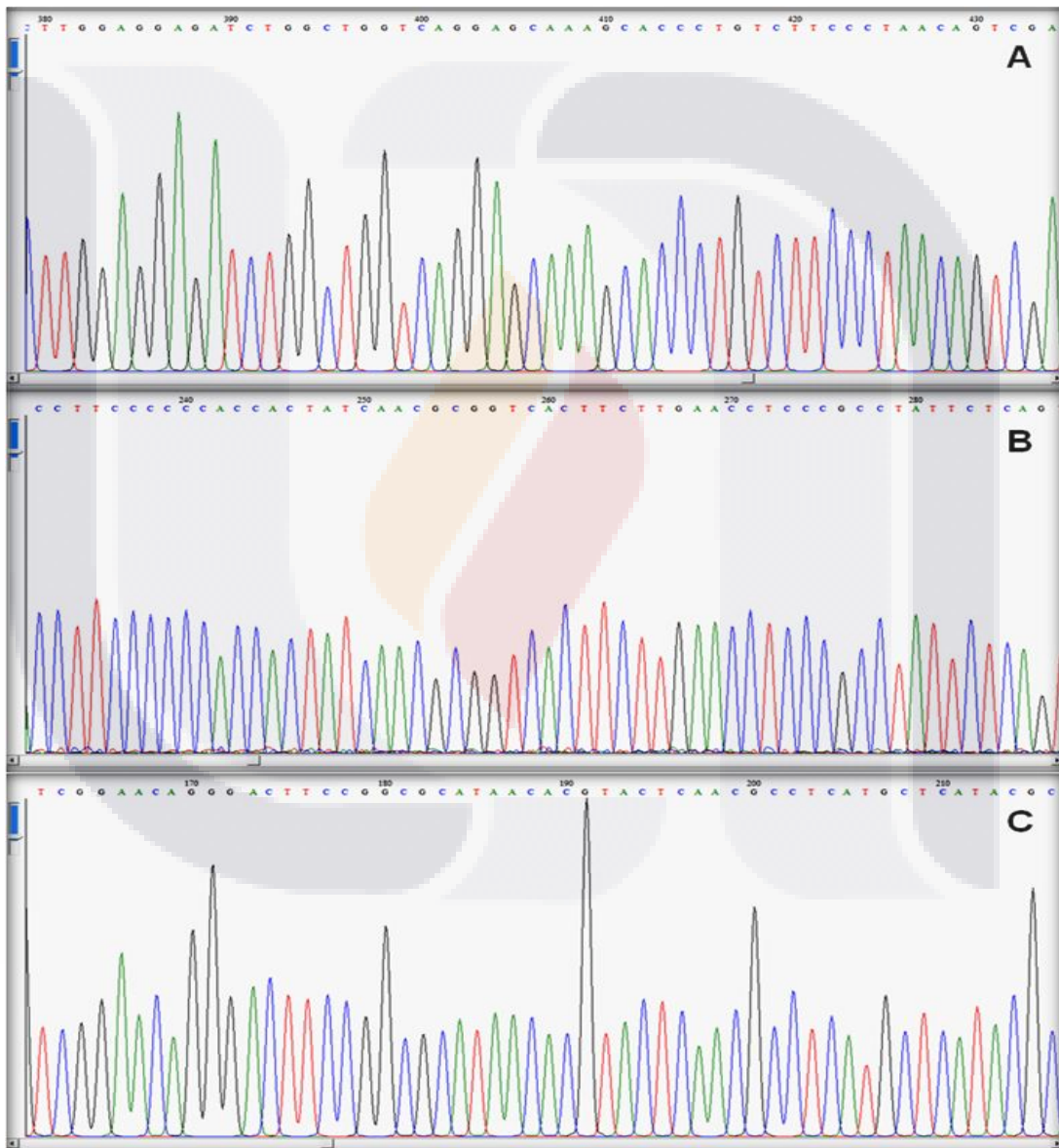


Figura 12. Electroferograma de una sección de nucleótidos (A, C, G, T) de productos de PCR secuenciados.

Panel A) Secuencia obtenida de la amplificación del gen de calmodulina. B) Secuencia obtenida por la amplificación de una región ITS. C) Sección de una secuencia obtenida por la amplificación del gen *afIR*.

De las 132 secuencias obtenidas, 86 (65.2%) mostraron tener un porcentaje de identidad con alguna secuencia registrada en las bases de datos del Centro Nacional

de Información Biotecnológica (NCBI), el resto (34.8%) no presentó coincidencia con los registros (Tabla 9).

Los análisis de las secuencias obtenidas demostraron que las especies identificadas fueron *A. oryzae* (45.5%), *A. niger* (10.2%), *A. ochraceus* (3.4%), *A. pseudodeflectus* (4.5%), *A. ustus* (10.2%), *A. flavus* (6.8%), *A. versicolor* (5.6%), *A. nidulans* (5.6), *A. sublatus* (4.5%) y *A. sydowii* (3.4%).

El análisis de las secuencias de las cepas testigo (AF-36, AF-C y AF-T) y de los seis aislados de *A. flavus* (AF-AC1, AF-AC2, AF-AC3, AF-EM1, AF-EM2 y AF-EM3) mostraron tener un porcentaje de identidad mayor al 90% con aislamientos de *A. flavus* registrados en la base de datos del NCBI (Tabla 9).

Tabla 9. Identidad de los aislados de *Aspergillus spp.* obtenidos de las dietas alimenticias para vacas lecheras, maíz y suelo agrícola en Aguascalientes, México; al compararlos con secuencias existentes en el Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI)*

ID del Aislado	Origen	Iniciador*	ID secuencia	Identidad (%)	Especie coincidente
Control ⁻ AF-36	Control	ITS1	LN482513.1	99	<i>A. flavus</i>
		ITS4	KX550912.1	98	<i>A. flavus</i>
Control ⁺ C	Maíz (Cuatitlán)	ITS1	LC105688.1	100	<i>A. flavus</i>
		ITS4	KT254587.1	99	<i>A. flavus</i>
		AFLRF	FN398160.1	100	<i>A. flavus</i>
		AFLRR	L32576.1	100	<i>A. flavus</i>
		XM_002379905.1	100	<i>A. flavus</i>	
Control ⁺ T	Maíz (Tamaulipas)	ITS4	KF221065.1	99	<i>A. flavus</i>
		ITS1	KX015990.1	100	<i>A. flavus</i>
		AFLRR	AF441435.2	99	<i>A. flavus</i>
		AFLRF	XM_002379905.1	100	<i>A. flavus</i>
		ITS1	KF434090.1	100	<i>A. flavus</i>
AC1	Alimento concentrado	ITS4	KF434090.1	99	<i>A. flavus</i>
		AFLRF	AF441434.1	100	<i>A. flavus</i>
		AFLRR	XM_002379905.1	99	<i>A. flavus</i>
		ITS1	KM285408.1	100	<i>A. flavus</i>
AC2	Alimento concentrado	ITS4	EF409812.1	95	<i>A. flavus</i>
		AFLRF	XM_002379905.1	100	<i>A. flavus</i>
		AFLRR	FN398160.1	93	<i>A. flavus</i>
		ITS1	KF434090.1	99	<i>A. flavus</i>
AC3	Alimento concentrado	ITS4	KT356196.1	97	<i>A. flavus</i>
		AFLRF	AF441435.2	99	<i>A. flavus</i>
		AFLRR	AF441434.1	99	<i>A. flavus</i>
		ITS1	HQ010119.1	99	<i>A. flavus</i>
EM1	Ensilaje de maíz	ITS4	KX641192.1	99	<i>A. flavus</i>
		CMDA7F	AY510451.1	95	<i>A. flavus</i>
		CMDA8R	XM_002374071.1	100	<i>A. flavus</i>
		AFLRF	MH752566.1	100	<i>A. flavus</i>
EM2	Ensilaje de maíz	AFLRR	KY769955.1	100	<i>A. flavus</i>
		ITS4	KT356196.1	98	<i>A. flavus</i>
		ITS1	LN482513.1	100	<i>A. flavus</i>
		CMDA7F	XM_002374071.1	100	<i>A. flavus</i>
EM3	Ensilaje de maíz	CMDA8R	XM_002374071.1	100	<i>A. flavus</i>
		AFLRF	L32577.1	100	<i>A. flavus</i>
		AFLRR	MH752564.1	100	<i>A. flavus</i>
		ITS1	KX572367.1	99	<i>A. flavus</i>
		ITS4	KT356196.1	99	<i>A. flavus</i>
		ITS1	LN482513.1	100	<i>A. flavus</i>

ID del Aislado	Origen	Iniciador*	ID secuencia	Identidad (%)	Especie coincidente
AC4	Alimento concentrado	CMDA7F CMDA8R	NS NS	- -	- -
AC5	Alimento concentrado	CMDA7F CMDA8R	D44468.1 NS	93 -	<i>A. oryzae</i> -
AR2	RTM	CMDA7F CMDA8R	NS NS	- -	- -
EM4	Ensilaje de maíz	CMDA7F CMDA8R	NS NS	- -	- -
AR3	RTM	CMDA7F CMDA8R	NS NS	- -	- -
AC6	Alimento concentrado	CMDA7F CMDA8R	NS NS	- -	- -
AC7	Alimento concentrado	CMDA7F CMDA8R	NS NS	- -	- -
EM5	Ensilaje de maíz	CMDA7F CMDA8R	XM_001820250.2 NS	99 -	<i>A. oryzae</i> -
AC8	Alimento concentrado	CMDA7F	AP007155.1	93	<i>A. oryzae</i>
EM6	Ensilaje de maíz	CMDA8R CMDA7F	NS AP007155.1	- 91	- <i>A. oryzae</i>
AR3	RTM	CMDA8R CMDA7F	NS NS	- -	- -
AR4	RTM	CMDA8R CMDA7F	NS NS	- -	- -
AR5	RTM	CMDA8R CMDA7F	NS NS	- -	- -
AC9	Alimento concentrado	CMDA8R CMDA7F	NS NS	- -	- -
AC10	Alimento concentrado	CMDA8R CMDA7F	NS NS	- -	- -
AR6	RTM	CMDA8R CMDA7F	NS NS	- -	- -
EM7	Ensilaje de maíz	CMDA8R CMDA7F	NS NS	- -	- -
AR7	RTM	CMDA8R CMDA7F	NS NS	- -	- -
AR8	RTM	CMDA8R CMDA7F	NS D44468.1	- 97	- <i>A. oryzae</i>
EM8	Ensilaje de maíz	CMDA8R CMDA7F	NS NS	- -	- -
AC11	Alimento concentrado	CMDA8R CMDA7F	NS NS	- -	- -
AC12	Alimento concentrado	CMDA8R CMDA7F	NS NS	- -	- -
AC13	Alimento concentrado	CMDA8R CMDA7F	NS XM_001820250.2	- 98	- <i>A. oryzae</i>
EM9	Ensilaje de maíz	CMDA8R CMDA7F	NS NS	- -	- -
EM10	Ensilaje de maíz	CMDA8R CMDA7F	NS AP007155.1	- 99	- <i>A. oryzae</i>
EM11	Ensilaje de maíz	CMDA8R CMDA7F	NS AP007155.1	- 99	- <i>A. oryzae</i>
AR9	RTM	CMDA8R CMDA7F	NS NS	- -	- -
AC14		CMDA8R CMDA7F	NS NS	- -	- -

ID del Aislado	Origen	Iniciador*	ID secuencia	Identidad (%)	Especie coincidente
	Alimento concentrado	CMDA8R	NS	-	-
EM12	Ensilaje de maíz	CMDA7F CMDA8R	AP007155.1 D44468.1	99 99	<i>A. oryzae</i> <i>A. oryzae</i>
SA1	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	JN639859.1 KX922857.1	99 98	<i>E. nidulans</i> <i>A. nidulans</i>
SA2	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	KU866684.1 KU866668.1	100 78	<i>A. sublatius</i> <i>A. sublatius</i>
SA4	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	AY373875.1 KU310973.1	99 92	<i>A. ustus</i> <i>A. pseudodeflectus</i>
SA5	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	LT558944.1 LT558948.1	100 97	<i>T. purpureogenos</i> <i>T. purpureogenos</i>
SA6	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	EU273527.1 KJ475815.1	99 88	<i>T. flavus</i> <i>T. flavus</i>
SA7	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	AY373876.1 GQ131879.1	99 97	<i>A. ustus</i> <i>A. parasiticus</i>
SA8	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	AY373875.1 AY373875.1	100 92	<i>A. ustus</i> <i>A. ustus</i>
SA9	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	FJ878630.1 NS	100 -	<i>A. ustus</i> -
SA10	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	KU310973.1 KU310973.1	100 84	<i>A. pseudodeflectus</i> <i>A. pseudodeflectus</i>
SA13	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	NR_135372.1 KU310973.1	100 86	<i>A. pseudodeflectus</i> <i>A. pseudodeflectus</i>
SA15	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	FR733862.1 AY373875.1	100 93	<i>A. calidouustus</i> <i>A. ustus</i>
SA16	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	NR_135372.1 KR135131.1	100 93	<i>A. pseudodeflectus</i> <i>A. pseudodeflectus</i>
SA18	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	KU310973.1 HG931699.1	100 99	<i>A. pseudodeflectus</i> <i>A. calidouustus</i>
SA20	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	KX254916.1 KF381083.1	100 99	<i>A. versicolor</i> <i>A. versicolor</i>
SA21	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	KU866683.1 KX610748.1	100 99	<i>A. sublatius</i> <i>A. nidulans</i>
SA22	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	KU687806.1 LC105698.1	99 99	<i>A. sydowii</i> <i>A. versicolor</i>
SA23	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	KM458831.1 KM458822.1	97 94	<i>T. flavus</i> <i>T. flavus</i>
SA27	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	KX254916.1 KF706673.1	100 98	<i>A. versicolor</i> <i>A. versicolor</i>
SA28	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	AY373875.1 AY373875.1	100 100	<i>A. ustus</i> <i>A. ustus</i>
SA29	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	HQ191279.1 KM458831.1	100 99	<i>T. flavus</i> <i>T. flavus</i>
SA30	Suelo agrícola	ITS1 ITS4	KM458831.1 KM458822.1	100 99	<i>T. flavus</i> <i>T. flavus</i>

* NCBI (National Center for Biotechnology Information): <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

** ITS = espaciadores internos de la transcripción; AFLR = regulador de la ruta biosintética; R = reversa; F = hacia adelante; CMDA = calmodulina; RTM = ración total mezclada; NS= No se encontró semejanza significativa.

5.3. CAPACIDAD AFLATOXICOGÉNICA DE AISLADOS *A. flavus*

Con la técnica de vapores de amonio en agar coco se observó la coloración rosa en las cepas empleadas como testigo positivo a la producción de AF (AF-C y AF-T), por lo que los aislados AC1, AC2, AC3, EM2 y EM3 que también mostraron esta coloración

se interpretaron como positivos a la producción de AF (Figura 12). La cepa AF-36 empleada como testigo negativo a la producción de AF no presentó coloración, este mismo comportamiento se observó en el aislado EM1; con base a lo anterior este aislado se interpretó como negativo a la producción de AF (Figura 13).

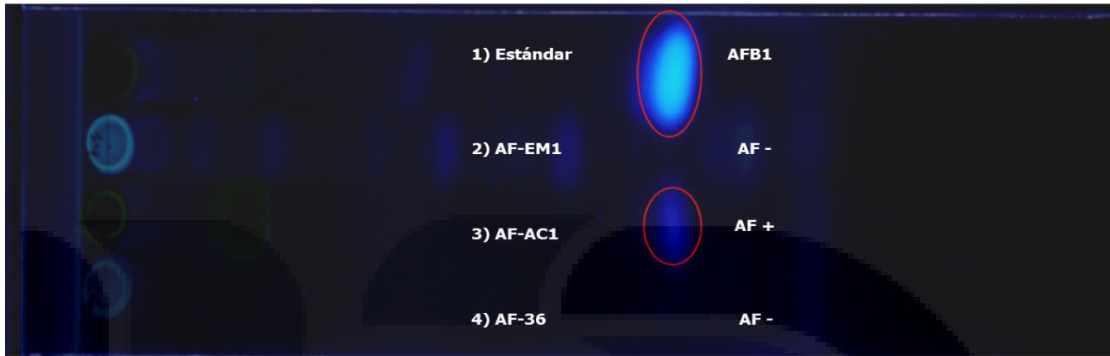


Figura 13. Placa de sílica gel vista en transiluminador.

Carriles: 1) Estándar purificado de AFB₁. 2-4) Aislados *A. flavus* obtenidos del alimento para vacas lecheras (AF⁺).

Con la técnica de vapores de amonio en agar coco se observó la coloración rosa en las cepas empleadas como testigo positivo a la producción de AF (AF-C y AF-T), por lo que los aislados AC1, AC2, AC3, EM2 y EM3 que también mostraron esta coloración se interpretaron como positivos a la producción de AF (Figura 14). La cepa AF-36 empleada como testigo negativo a la producción de AF no presentó coloración, este mismo comportamiento se observó en el aislado EM1; con base a lo anterior este aislado se interpretó como negativo a la producción de AF (Figura 14).

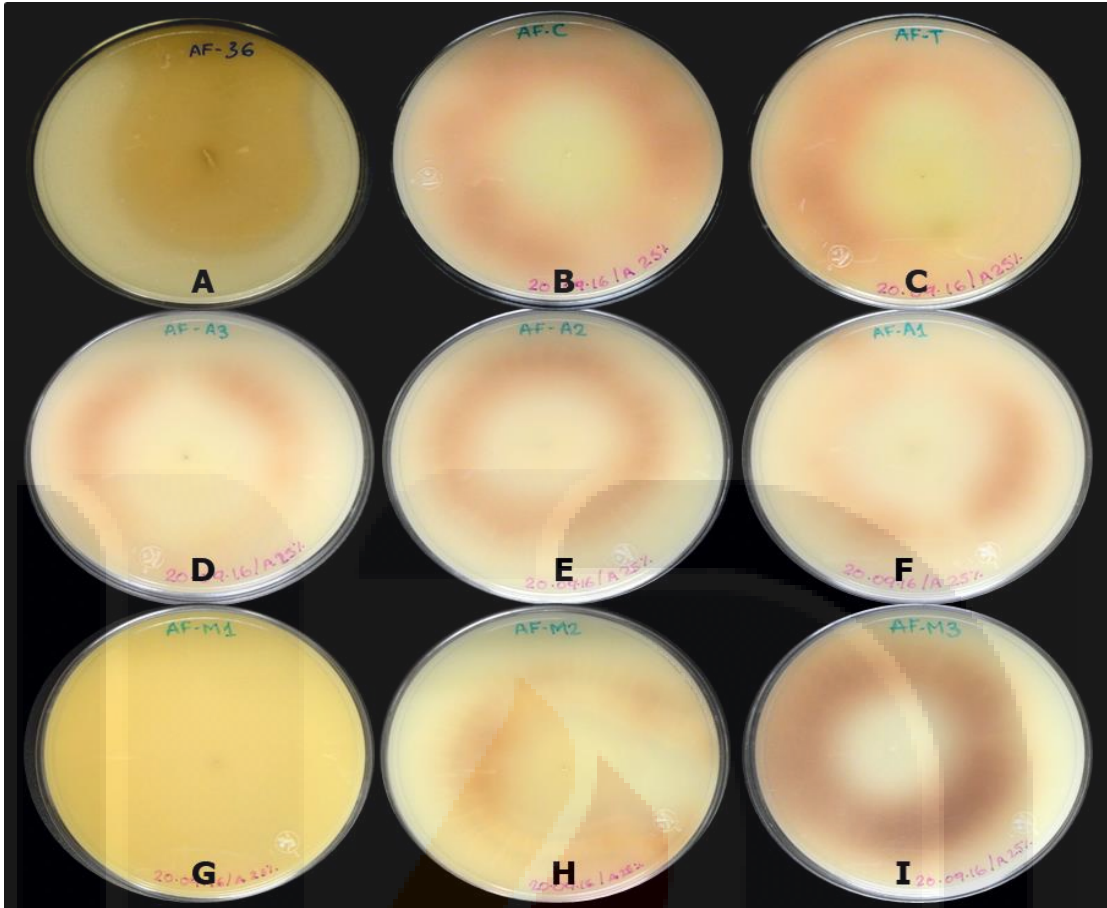


Figura 14. Intensidad de color en agar coco al contacto con vapores de amonio en cepas de *A. flavus*.

Paneles: A) control interno AF⁻ (AF-36); B, C) controles internos AF⁺ (AF-T, AF-C); D, E, F) aislados AF⁺ provenientes de concentrado (AC1, AC2, AC3); G) aislado AF⁻ obtenido de ensilaje de maíz (EM1); H, I) aislados AF⁺ obtenidos de ensilaje de maíz (EM2, EM3).

De los seis aislamientos de *A. flavus*, cinco (AC1, AC2, AC3, EM2 y EM3) tuvieron una reacción positiva a la presencia de AF y el otro (EM1) fue negativo. En ambas técnicas (TLC y VA-CAM) se obtuvieron resultados similares. Estos resultados coincidieron con la amplificaron del fragmento de 796 pb para el gen *aflR* en los aislados AC1, AC2, AC3, EM2 y EM3 (Tabla 10).

Tabla 10. Aislados *Aspergillus flavus* aflatoxigénicos y no aflatoxigénicos.

Id aislados	TLC	VA	ITS	Cmda	Afl-R
AF-36	-	-	+	+	-
AF-T	+	+	+	+	+
AF-C	+	+	+	+	+
AC1	+	+	+	+	+
AC2	+	+	+	-	+
AC3	+	+	+	-	+
EM1	-	-	+	+	-
EM2	+	+	+	-	+
EM3	+	+	+	+	+

5.4. INTERACCIÓN, *in vitro*, DE CEPAS DE *A. flavus* CON Y SIN CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA

Se realizaron ocho enfrentamientos *in vitro*, combinando AF-36 (AF⁻) con el resto de los aislamientos aflatoxigénicos (AF-C, AF-T, AC1, AC2, AC3, EM2 y EM3) en medio agar coco. Cuando se agregaron los vapores de amonio se observó una reducción en la intensidad de color (Figura 15) en comparación al color observado cuando los aislados aflatoxigénicos crecieron solos en la caja de Petri con medio agar coco (Figura 15).

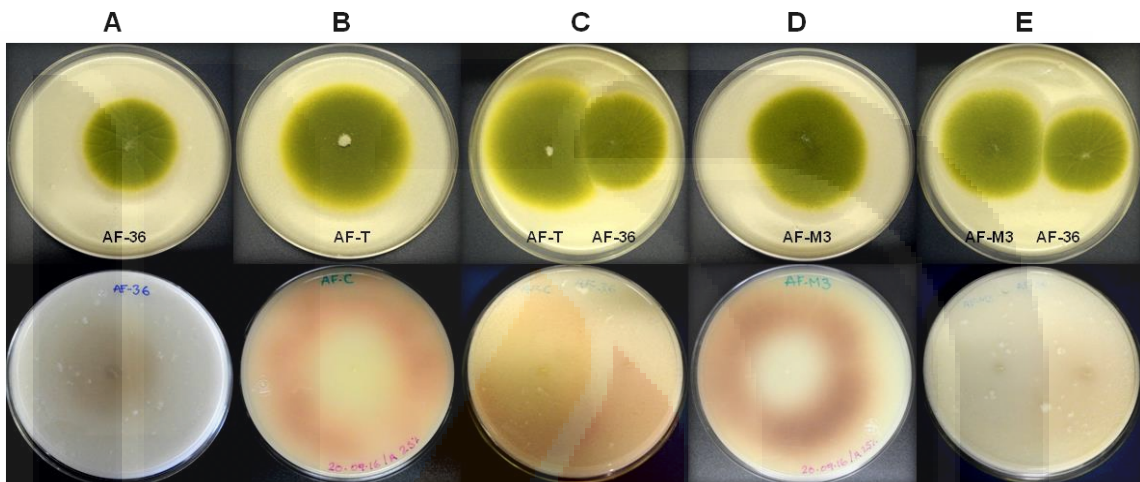


Figura 15. Enfrentamientos *in vitro* en agar coco con vapores de amonio.
Paneles: A) AF-36: Control interno AF⁻; B) AF-T; Control interno AF⁺; C) AF-T + AF-36; D) AF-M3: Aislamiento obtenido de ensilaje de maíz AF⁺; E) AF-M3 + AF36.

El resultado de los enfrentamientos *in vitro* es un indicativo de la capacidad que poseen las cepas no aflatoxigénicas para reducir la producción de AF, cuando crecen en el mismo sustrato que las cepas aflatoxigénicas.

5.5. INTERACCIÓN ENTRE CEPAS CON Y SIN CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA EN ENSILAJE DE MAÍZ

Los ensilajes de maíz que fueron inoculados con los tratamientos sham (sin inóculo) y con esporas de AF-36 (AF⁻) presentaron niveles residuales de AF, 4.7 ± 2.2 y 7.4 ± 0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente. En los ensilajes de maíz inoculados con esporas de cepas altamente aflatoxigénicas (AF-C y AF-T) se detectaron niveles de AF de 541.1 ± 13.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 734.3 ± 16.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. Se observó una diferencia estadística significativa al comparar los promedios de AF detectados entre los ensilajes inoculados con los diferentes tratamientos con y sin interacción de esporas (Figura 16).

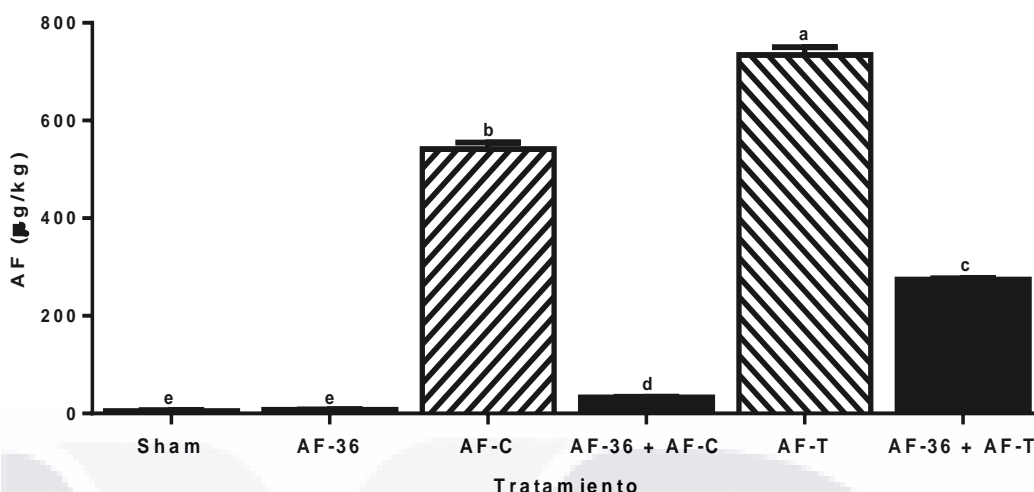


Figura 16. Interacción en ensilaje de maíz entre cepas control de *A. flavus*.

Sham=sin inoculo, AF-36=Control AF⁻, AF-C y AF-T=Control AF⁺. ^{a-b} Literales diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos.

En la interacción entre las cepas testigo AF⁻ (AF-36) y AF⁺ (AF-C y AF-T) se observó una disminución de AF cuando se cuantificó en el ensilaje de maíz, presentando diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) al comparar la concentración de AF entre los diferentes tratamientos (Figura 16). La concentración de AF se redujo hasta en un 93.8% en la interacción con la cepa Cuautitlán (AF-C) y 62.6% en la cepa Tamaulipas (AF-T).

En la figura 17 se observa el efecto de la interacción sobre la concentración de AF detectadas en los ensilajes de maíz inoculados con los diferentes tratamientos, AF-36 mostró eficacia para reducir considerablemente los niveles de AF en los ensilajes inoculados con *A. flavus* aflatoxigénicas.

Las cepas de *A. flavus* AC1, AC2 y AC3 que se aislaron de alimento concentrado mostraron poseer capacidad aflatoxigénica, por lo que en los ensilajes donde se inocularon sus esporas, se pudieron cuantificar concentraciones promedio de AF de 252.6 ± 35.8 , 235.8 ± 12.4 y 167.7 ± 9.8 µg/kg, respectivamente. Cuando se inocularon esporas de AF-36 (AF⁻) interactuando con las esporas de cada una de estas cepas (AC1, AC2 y AC3), la concentración de AF cuantificada fue menor (interacción con: AC1 = 44.8 ± 5.8 , AC2 = 38.8 ± 1.7 y AC3 = 50.4 ± 5.7 , figura 17)

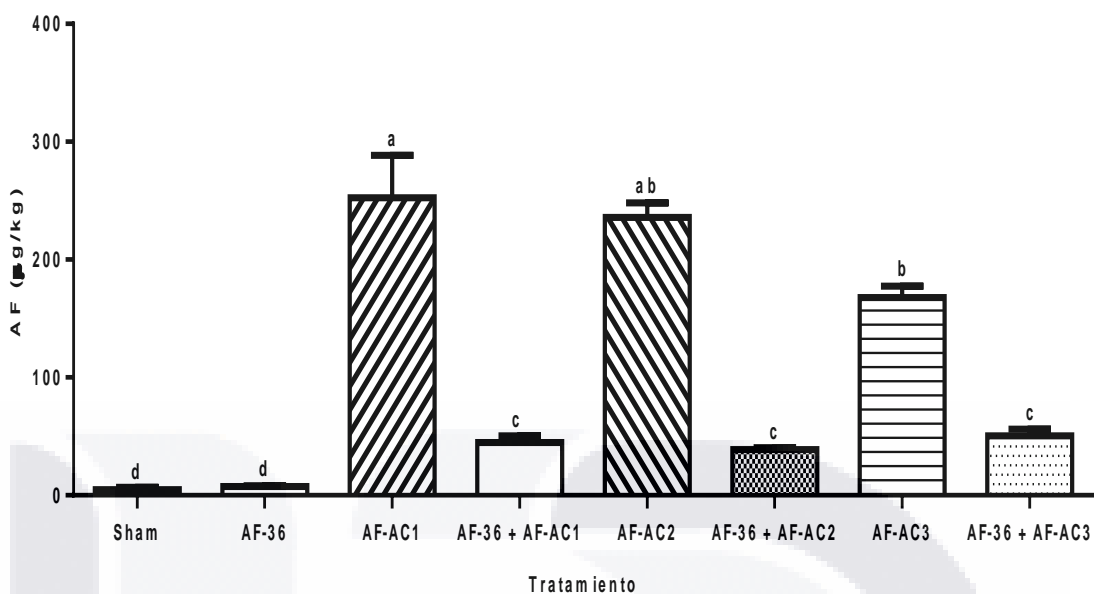


Figura 17. Interacción en ensilaje de maíz entre la cepa control AF-36 (AF⁻) y las cepas *A. flavus* AF⁺ aisladas de alimento concentrado.

Sham=sin inóculo; AF-36=Control AF; AC1, AC2, AC3=*A. flavus* AF⁺, aislados de alimento concentrado. ^{a-b} Literales diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos.

AF-36 mostró poseer la capacidad para reducir la concentración de AF cuando interactuó con estas tres cepas aflatoxigénicas aisladas de alimento concentrado, los porcentajes en los que se redujo la AF en los ensilajes de maíz son los siguientes: Interacción con AC1 = 82.3, AC2 = 83.5 y AC3 = 69.9 % respectivamente.

Se aislaron tres cepas de *A. flavus* de ensilaje de maíz, una cepa no mostró tener capacidad aflatoxigénica (AF⁻): EM1 y dos si mostraron poseer capacidad aflatoxigénica (AF⁺): EM2 y EM3. En los ensilajes inoculados con las cepas aflatoxigénicas EM2 y EM3 se cuantificaron concentraciones de AF de 225.2 ± 3.9 y $271.1 \pm 11.6 \mu\text{g/kg}$, respectivamente (Figura 18). En ensilajes inoculados con la cepa AF-36 interactuando con las cepas aflatoxigénicas EM2 y EM3, se cuantificaron concentraciones menores de AF en comparación a las cuantificadas cuando se inocularon solamente las esporas de cada cepa sin ninguna interacción, las concentraciones de AF fueron de 34.0 ± 0.3 y 37.3 ± 1.4 , respectivamente (Figura 18). Se observó una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre las medias de AF cuantificada en los tratamientos con interacción y sin interacción (Figura 18).

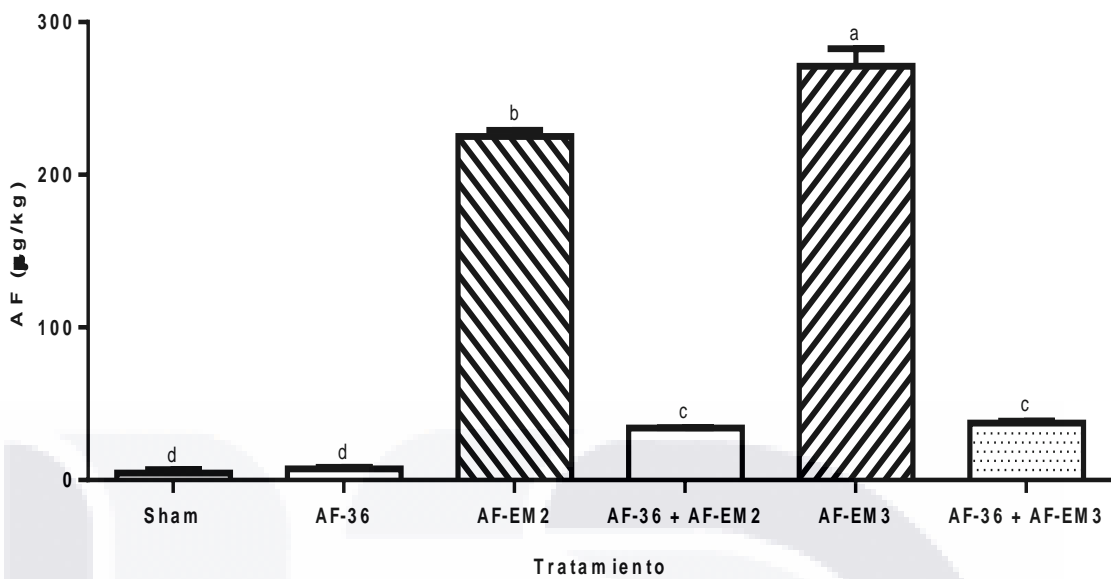


Figura 18. Interacción en ensilaje de maíz entre la cepa control AF-36 (AF⁻) y las cepas *A. flavus* AF⁺ aisladas de ensilaje de maíz.

Sham=sin inóculo; AF-36=Control AF⁻; EM2, EM3= *A. flavus* AF⁺, aislados de Ensilaje de maíz. ^{a-b} Literales diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos.

Las concentraciones de AF se redujeron más del 80% en los ensilajes inoculados con esporas de AF-36 interactuando con las esporas de EM2 y EM3. En la interacción entre AF-36 y EM2 la concentración de AF se redujo hasta un 84.9 %, mientras que en la interacción de AF-36 con EM3 el porcentaje de AF disminuyó en un 86.2%. Nuevamente AF-36 mostró poseer capacidad para reducir la concentración de AF cuando interactúa con cepas aflatoxigénicas en el mismo sustrato.

También se probó la capacidad de la cepa EM1 para reducir la concentración de AF producida por las cepas altamente aflatoxigénicas AF-C y AF-T; por lo cual se inocularon tratamientos con interacción de esporas y se observó una disminución en la concentración de AF cuantificada en los ensilajes (Figura 19). La cepa EM1 mostró tener la capacidad para reducir la concentración de AF producida por AF-C de 547.4 a 84.1 μg/kg y por AF-T de 734.3 a 303.5 μg/kg (Figura 19). Se observó diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre las concentraciones de AF de los diferentes tipos de tratamiento.

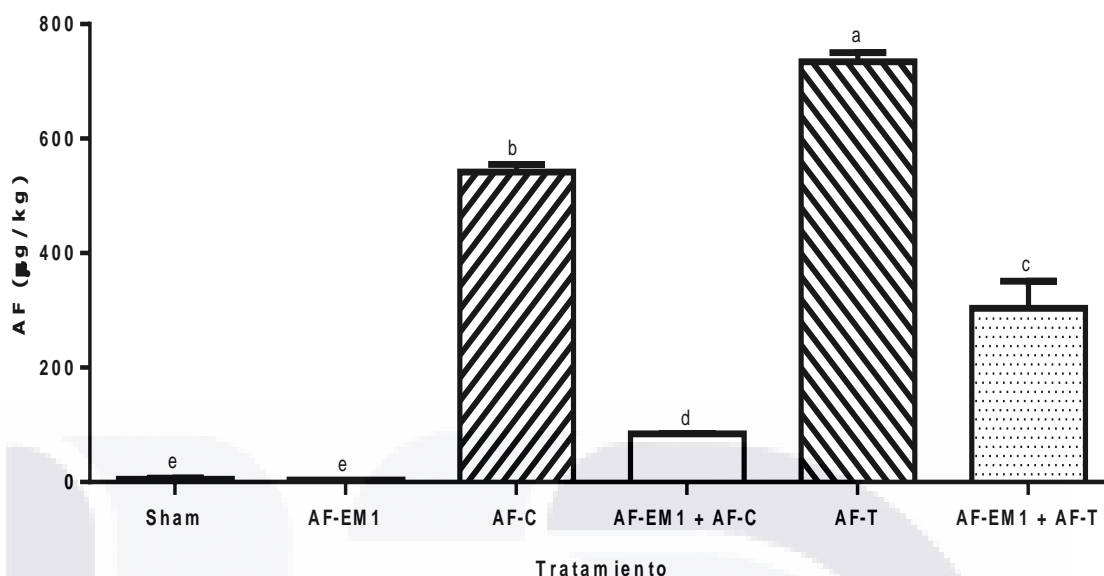


Figura 19. Interacción entre la cepa de *A. flavus* EM1 (AF⁻) y las cepas control (AF⁺). Sham=Sin inóculo; AF-C y AF-T=Control AF⁺; EM1, EM2, EM3=*A. flavus* aislado de ensilaje de maíz. ^{a-b} Literales diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos.

Al interactuar EM1 con AF-C la concentración de AF observó una disminución del 84.5% y en la interacción con AF-T la concentración de AF se redujo un 58.7%; se observó que el mayor efecto de EM1 fue sobre la cepa altamente aflatoxigénica AF-C.

En las interacciones realizadas con las cepas aflatoxigénicas AC1, AC2 y AC3 y la cepa no aflatoxigénica EM1, también se observaron una disminución en la concentración de AF cuando se cuantificó en los ensilajes de maíz inoculados con cada tratamiento, se redujeron las concentraciones en: AC1 de 252.6 a 64.9 µg/kg, AC2 de 235.8 a 77.1 µg/kg y en AC3 de 167.7 a 40.9 µg/kg (Figura 20). Se observó diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre los promedios de AF cuantificada en los diferentes tratamientos.

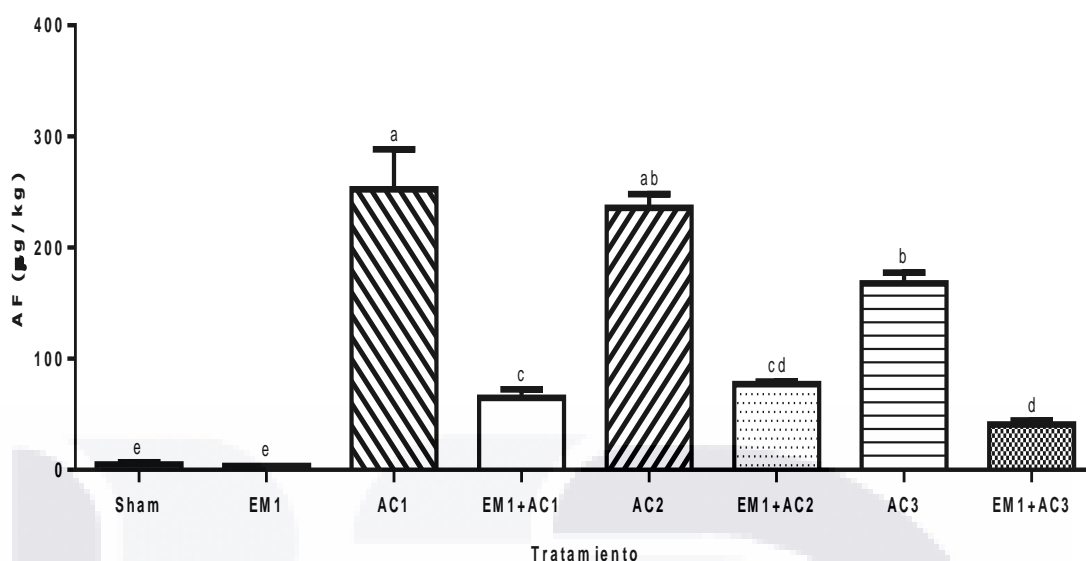


Figura 20. Interacción entre la cepa AF-EM1 (AF⁻) y las cepas *A. flavus* AF⁺ aisladas de alimento concentrado (AC1, AC2, AC3).

Sham= Sin inóculo; EM1= *A. flavus* AF⁻, aislado de ensilaje de maíz; AC1, AC2, AC3= *A. flavus* AF⁺, aislados de alimento concentrado. ^{a-b} Literales diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos.

Cuando EM1 interactuó con AC1, la concentración de AF cuantificada se redujo un 74.3%, en la interacción con AC2 el porcentaje se redujo 67.3 % y en la interacción con AC3 se observó una disminución de un 75.6%. El mayor efecto se observó en la interacción con la cepa aflatoxigénica AC3, que de las cepas aisladas de alimento concentrado fue la que mostro menor capacidad aflatoxigénica.

En las interacciones entre la cepa EM1 (AF⁻) y las cepas aflatoxigénicas EM2 y EM3 también se observó una disminución en la concentración de AF cuantificada en los ensilajes de maíz donde se inocularon sus esporas. En la interacción con EM2 se redujo la concentración de AF de 225.2 a 26.3µg/kg y con EM3 de 271 a 30.3 µg/kg (Figura 21). Se observa una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre las medias de las concentraciones de AF de los diferentes tratamientos.

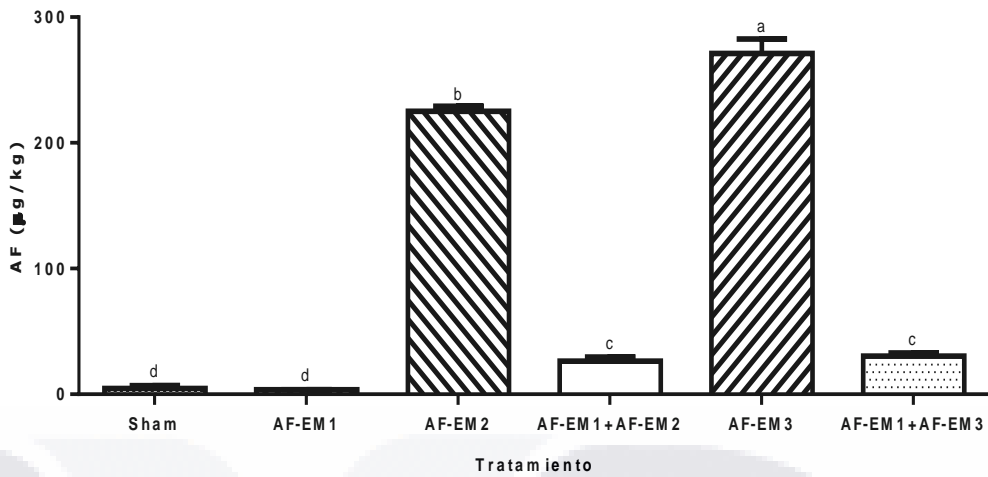


Figura 21. Interacción entre las cepas de *A. flavus* (AF⁻ y AF⁺) aisladas de ensilaje de maíz. Sham=Sin inóculo; EM1= *A. flavus* AF⁻; EM2, EM3= *A. flavus* AF⁺. ^{a-b} Literales diferentes indican diferencia estadística significativa (p<0.05) entre tratamientos.

Quando esporas de EM1 interactuaron con esporas de EM2 se observó una disminución en la concentración de AF de 88.3% y con el tratamiento de interacción con EM3 la disminución de AF fue de 88.8%. La cepa EM1 no aflatoxigénica, aislada de ensilaje de maíz mostró poseer la capacidad de reducir las concentraciones de AF cuando interactuó con cepas aflatoxigénicas en el ensilaje de maíz.

6. DISCUSIÓN

6.1. AISLAMIENTO DE *A. flavus*

Respecto a los aislados obtenidos de muestras de alimento para ganado y suelo, *Aspergillus* fue el género micótico con mayor ocurrencia (31%) seguido de *Penicillium* (13.8 %) y *Fusarium* (12.7 %). Estos géneros ya han sido identificados en maíz amarillo almacenado en el estado de Tamaulipas, México (Hernández *et al.*, 2007); estos autores observaron proporciones similares a las identificadas en este trabajo para *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (50.3, 15.9 y 5.5% respectivamente). También, estos géneros micóticos han sido identificados en híbridos de maíz destinados al consumo humano y animal en el norte del país por Montes *et al.*, 2009 (20.1, 14.7 y 32.6 % respectivamente).

En otro estudio, Ortega-Beltrán *et al.* (2016) identificaron la presencia de *A. flavus* en granos de maíz comercial en los estados de Sonora, Sinaloa, Nayarit y Tamaulipas. Lo anterior sugiere que las poblaciones fúngicas de esta especie se encuentran distribuidas ampliamente en las zonas agrícolas de México. En este sentido, se ha sugerido que es frecuente la presencia de hongos micotoxigénicos en maíz en México; lo cual puede ser debido tanto a la persistencia de la contaminación de los suelos agrícolas, como al manejo inadecuado del cultivo y a la falta de aplicación efectiva de estrategias de control para reducir o evitar la infección por estos hongos; lo cual propicia las condiciones óptimas para el desarrollo de *Aspergillus spp.* y para la producción de sus toxinas (Hernández *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2013).

En el presente trabajo, se aisló *A. flavus* de los alimentos para vacas lecheras en una proporción del 6.8% del total de los *Aspergillus* identificados (6/88). En el presente estudio no se logró identificar esta especie en muestras de suelo agrícola destinado a la producción alterna de maíz forrajero con avena. Sin embargo, en otros estudios realizados en México (Ortega-Beltrán *et al.*, 2015), *A. flavus* ha sido identificado en suelo para cultivos de maíz de grano en la totalidad de 83 muestras colectadas (2006-2008) en cuatro zonas agroecológicas del estado de Sonora, mientras que *A. flavus* se identificó en 62 % de esos aislamientos. Lo anterior sugiere la existencia de una población de *A. flavus* en México compuesta mayoritariamente por cepas aflatoxigénicas, aunque aún no esté caracterizada completamente.

En este estudio, el análisis morfométrico mostró que la tercera parte de los aislados de *A. flavus* contenía abundantes esclerocios cortos (< 400 μ m) por lo que se clasificaron como cepas S, mientras que el resto fueron denominadas como cepas L con escasos esclerocios, pero de tamaño mayor (>400 μ m). Ya se ha señalado la importancia de esta morfología y su asociación con la aflatoxigenicidad de las cepas S,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mientras que las cepas L contienen tanto aislados atoxigénicos como toxigénicos (Cotty, 1989; Probst *et al.*, 2014). En un estudio longitudinal (Ortega-Beltrán *et al.*, 2015) en el estado de Sonora, encontraron un 96% de incidencia de *A. flavus* cepas L y un 4% para *A. flavus* cepas S. Estos datos sugieren que la incidencia de cepas con esclerocios grandes se presenta en proporción de porcentajes similares a las obtenidas. Se ha relacionado el tamaño de los esclerocios con la capacidad aflatoxigénica de las diferentes poblaciones de *A. flavus*.

En los resultados obtenidos en este estudio se encontró un aislado de ensilaje de maíz (EM1) negativo a la producción de aflatoxina, aunque con esclerocios menores a 400 μm y con identificación molecular del gen *afIR*. También, un aislado de alimento concentrado (AC3) se clasificó como positivo a la producción de aflatoxinas, aunque no produjo esclerocios y el resto de los aislados se clasificaron como cepas L y positivos a la producción de aflatoxinas.

Es importante destacar que la capacidad aflatoxigénica de los aislados *A. flavus* identificados en este estudio fue caracterizada con TLC y vapores de amonio en agar coco, las cuales son técnicas cualitativas que nos permite detectar claramente la presencia de aflatoxinas producidas por los cultivos micóticos (Saito and Machida, 1999; Fani *et al.*, 2014).

6.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *A. flavus*

Las 25 secuencias obtenidas de los aislados identificados morfológicamente como *A. flavus* mostraron un gran porcentaje de identidad (> 90%) con secuencias registradas de cepas *A. flavus*. También se obtuvieron fragmentos amplificados para el gen *CaM* de 468 pb, para el gen *afIR* de 796 pb y para los ITS con un rango de 600-800 pb (ITS1-5.8S-ITS2). Se ha señalado que la región rADN de los espaciadores internos de la transcripción es equivalente a un código de barras oficial de ADN para hongos porque es el marcador secuenciado con mayor frecuencia y es una herramienta de gran utilidad para la descripción de especies de *A. flavus* (Samson *et al.*, 2014).

También, se ha referido que el gen *CaM* es capaz de distinguir entre casi todas las especies de *Aspergillus* (Samson *et al.*, 2014). Por otra parte, el gen *afIR* es necesario para la transcripción de la mayoría de los genes involucrados en la activación de las reacciones enzimáticas necesarias para la formación de las aflatoxinas (Yu *et al.*, 2004; Bhatnagar *et al.*, 2006; Amare and Keller, 2014).

6.3. CARACTERIZACIÓN AFLATOXIGÉNICA DE *A. flavus*

Los seis aislados identificados como *A. flavus* se evaluaron con TLC y vapores de amonio en agar coco para identificar su capacidad de producir aflatoxinas, cinco se clasificaron como aflatoxigénicos y uno se clasificó como negativo a la producción de aflatoxinas. Estos resultados mostraron un comportamiento similar a los obtenidos en el estudio de Ortega-Beltrán *et al.* (2015) en el que sólo 4.7 % fueron negativas a la producción de aflatoxinas, ya que de las 405 colonias aisladas de *Aspergillus spp.* 387 mostraron capacidad aflatoxigénica. Los aislamientos de *A. flavus* no aflatoxigénicos estuvieron relacionados genéticamente con *A. flavus* AF-36. Resultados similares han sido obtenidos en otros países (Thathana *et al.*, 2017). Esta cepa AF-36 ha sido empleada en el desarrollo de estrategias de control biológico para reducir la producción de aflatoxinas de cepas aflatoxigénicas en campos productores de algodón (Varga *et al.*, 2011). También se ha logrado aislar e identificar molecularmente nuevas especies aflatoxigénicas de *A. flavus*, en insectos y suelos de EUA (Varga *et al.*, 2011). Adicionalmente, en siete provincias de Irán, Fani y colaboradores (2014) lograron el aislamiento de 681 colonias de *Aspergillus* sección *Flavi* en muestras de pistache (n=205) y suelo (n= 20); de estos aislamientos, 76.9 % fueron identificados como *A. flavus* y en cada provincia de origen, la mayoría (62.5-92.9%) fueron aflatoxigénicos. Lo anterior sugiere que las cepas de *A. flavus* se distribuyen alrededor del mundo y su incidencia es mayor en ecosistemas agrícolas; sin embargo, en México son escasos los reportes oficiales sobre la incidencia y distribución de las diferentes cepas de *A. flavus* y la investigación sobre poblaciones indígenas de hongos aflatoxigénicos se limita a la identificación morfológica de los géneros y a la presencia de aflatoxinas en alimentos.

6.4. INTERACCIÓN ENTRE CEPAS DE *A. flavus* CON Y SIN CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA

En este trabajo la cepa AF-36 mostro capacidad para reducir la concentración de aflatoxina cuando interactúo con cepas aflatoxigénicas en el mismo sustrato, en este caso en el ensilaje de maíz. Se observó hasta un 88 % de reducción en la AF cuantificada.

La cepa atoxigénica AF-36 ha sido empleada para disminuir la contaminación por aflatoxinas en semillas de algodón en Arizona y Texas desde 1999 (Antilla and Cotty, 2002), también se ha empleado para mitigar la contaminación de AF en otros cultivos. En cacahuate, tres grupos estudiados presentaban niveles de AF de 531, 96 y 241 µg/kg antes de ser tratados; después de la inoculación con la cepa no aflatoxigénica, los niveles de AF disminuyeron a concentraciones de 11, 1.0 y 40 µg/kg, respectivamente

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(Dorner *et al.*, 2009). También, Doster *et al.* (2014), aplicaron esta cepa en cultivos de pistacho durante cuatro años (2008-2011); la concentración de AF se redujo en un promedio de 39.9% durante el periodo de observación. En maíz, Dorner *et al.* (2010), aplicaron AF-36 en campos productores de maíz durante 2007 y 2008. En 2007 la concentración de AF disminuyó 85% en el maíz producido en los campos inoculados en comparación al maíz que se produjo en campos no inoculados, mientras que en 2008 se observó una disminución del 88%.

Por lo anterior, se considera que *A. flavus* AF-36 es eficaz para reducir la contaminación por aflatoxinas. Cotty (1990), observó que a las 16 horas posteriores a la inoculación de AF-36 la producción de aflatoxina B₁ comenzó a reducirse en cepas aflatoxigénicas de 66.24 a 6.89 µg/kg. En otro estudio realizado por Cotty y Bhatnagar (1994), AF-36 fue altamente efectiva contra cepas aflatoxigénicas para inhibir la producción de aflatoxinas en cultivos de algodón, reduciendo la concentración de AF hasta un 94% en un primer ensayo y 85% en un segundo ensayo.

En este estudio se aisló una cepa de *A. flavus* no aflatoxigénica (EM1) que también mostró capacidad para reducir la contaminación por AF cuando se inoculó con cepas aflatoxigénicas en ensilaje de maíz, reduciendo la concentración de AF en rangos del 58 al 88%. Otras cepas de *A. flavus* sin capacidad para producir aflatoxina se han probado con la posibilidad de ser empleadas como agentes de control biológico. En Argentina (Zanon *et al.*, 2018) fueron inoculados granos de maíz con nueve cepas no aflatoxigénicas de *A. flavus* que fueron aisladas de suelo y granos de maíz; estas cepas mostraron capacidad para reducir la contaminación por AF en los granos de maíz hasta un 60%. Mallikarjunaiah *et al.* (2017), identificaron dos cepas no aflatoxigénicas de *A. flavus* que redujeron significativamente la población de hongos aflatoxigénicos en suelo y la contaminación de AF en cacahuate se observó disminuida hasta un 50%.

7. CONCLUSIONES

En este estudio se generó evidencia de que cepas de *Aspergillus* se encuentran contaminando la dieta de las vacas lecheras en Aguascalientes. Además, se identificó la presencia de otros hongos productores de micotoxinas tales como *Fusarium* y *Penicillium*. Estos tres géneros se encontraron con mayor frecuencia en las muestras de alimento analizadas. En suelo agrícola no se identificó *A. flavus*, pero sí otras especies del género *Aspergillus* y otros géneros de hongos.

En este estudio se realizó la identificación de cepas de *A. flavus* aflatoxigénicas (AC1, AC2, AC3, EM2 y EM3) y no aflatoxigénicas (EM1). La identificación se realizó por estudios morfométricos con microscopio compuesto óptico y con el microscopio electrónico de barrido.

El análisis morfométrico de los aislados de *A. flavus* reveló que la mayoría de los aislados (66.7%) presentaron esclerocios largos, por lo que pueden ser clasificados dentro del morfotipo de cepas L, mientras que los aislados restantes se pueden clasificar como cepas S.

La identificación también se realizó a nivel molecular. Al respecto, el análisis de las secuencias de las cepas testigo (AF-36, AF-C y AF-T) y de los seis aislados de *A. flavus* (AF-AC1, AF-AC2, AF-AC3, AF-EM1, AF-EM2 y AF-EM3) mostraron tener un porcentaje de identidad mayor al 90% con aislamientos de *A. flavus* registrados en la base de datos del NCBI.

La evaluación de la capacidad aflatoxigénica demostró que cinco aislados son aflatoxigénicos y uno resultó negativo a la presencia de aflatoxina. En nuestro conocimiento la mayoría de los estudios sobre identificación de hongos micotoxigénicos, en nuestro país, se reducen a la identificación de los géneros, este trabajo aporta la identificación morfológica, molecular y aflatoxigénica de *A. flavus*.

Respecto a las cepas de *A. flavus* aisladas, también, se identificó la producción de aflatoxinas (AF-AC1, AF-AC2, AF-AC3, AF-EM2 y AF-EM3) mediante la técnica de agar de coco con vapores de amonio y por cromatografía en capa fina.

El modelo de micro ensilajes diseñado para evaluar la capacidad de aislados de *A. flavus* no aflatoxigénicos para reducir la contaminación por AF, resultó ser eficaz para observar el efecto de la interacción entre cepas aflatoxigénicas y no aflatoxigénicas. La cepa empleada como control biológico, AF-36, mostró poseer alta capacidad para reducir la presencia de AF cuando se desarrolla junto con cepas aflatoxigénicas. Mientras que la cepa AF-EM1, aislada de ensilaje de maíz, también mostró poseer alta capacidad para disminuir la contaminación por AF cuando se inoculó con cepas

aflatoxigénicas en ensilaje de maíz, por lo que podría ser aprovechada como cepa de control biológico en los cultivos agrícolas donde se producen los alimentos destinados a la elaboración de las dietas de las vacas lecheras.



8. GLOSARIO

Abiótico: Para cuestiones biológicas y ecológicas hace referencia a todo aquello que no pertenece a los seres vivos o no es producto de los seres vivos.

Absorción: Proceso por el cual los tóxicos cruzan las membranas celulares y entran en la circulación sanguínea o sistema linfático.

Adsorción: Proceso por el cual átomos, iones o moléculas son atrapados o retenidos en la superficie de algún material en contra posición de la absorción que es un fenómeno de volumen.

Ácido desoxirribonucleico (ADN): Molécula compleja, integrante de los cromosomas, que almacena la información hereditaria en forma de variaciones en la secuencia de las bases de purina y pirimidina; esta información se traduce en la síntesis de las proteínas, por lo que es determinante de todas las características físicas y funcionales de las células y del organismo.

Actividad de Agua: Se refiere a la porción de agua disponible en un sustrato y que puede ser aprovechada por algún microorganismo.

Aflatoxicosis: Intoxicación producida por el consumo de sustancias o alimentos contaminados con aflatoxinas.

Aflatoxinas: Micotoxinas producidas en pequeñas concentraciones por hongos del género *Aspergillus spp.*, principalmente.

Agente oxidante: Agente químico que en reacciones electroquímicas gana electrones, provocando la oxidación de otro agente químico.

Alimento concentrado: Es todo aquel alimento combinado con otro para mejorar el balance nutritivo del producto y que será posteriormente diluido o mezclado para producir un suplemento o un alimento completo.

Ácido ribonucleico (ARN): Ácido nucleíco de cadena sencilla compuesto por los nucleótidos adenina, uracilo, guanina y citosina. En las células sirve como intermediario de la información genética ya que copia ésta del ADN y en el citoplasma dirige la síntesis de proteínas según su secuencia de nucleótidos.

Biótico: Hace referencia a aquello que resulta característico de los organismos vivientes o que mantiene un vínculo con ellos.

Biotransformación: Cualquier transformación química de una sustancia producida por organismos vivos o por preparaciones obtenidas de éstos. Conversión de un químico desde una forma a otra por un organismo biológico.

Carcinogénico: Habilidad de una sustancia para causar cáncer.

Cepa: Conjunto de microorganismos derivados de las múltiples divisiones de una célula inicial.

Citocromo P₄₅₀ (sistema de): Encontrado en la mitocondria adrenal y en los microsomas hepáticos, es una cadena de transporte de electrones en la cual el componente terminal es el citocromo P450; este sistema participa en la destoxificación de sustancias extrañas por alterarlas para aumentar su solubilidad y facilitar la excreción. El término abarca un gran número de isoenzimas que son codificadas por una super familia de genes. *Término relacionado:* mono-oxigenasa, oxidasas de función mixta, reacciones de fase I.

Conidio o espora: Mitosporas asexuales, que se forman a partir de una célula conidiógena o hifa fértil.

Conidióforo: Estructura de los hongos que se encarga de la producción asexual de miles de esporas llamadas conidios. Es una estructura morfológica característica de los hongos imperfectos.

Cuerpo fructífero: Esporocarpio multicelular de los hongos basidiomicetos y ascomicetos, sobre la que se forman otras estructuras y se producen las esporas en el estado reproductivo del ciclo de vida de los hongos.

Cromatografía líquida de alta presión (HPLC): Técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

Dosis letal media (DL50): Dosis, calculada estadísticamente, de un agente químico o físico (radiación) que se espera produzca la muerte del 50% de los organismos de una población bajo un conjunto de condiciones definidas.

ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay): Es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para la cuantificación de la presencia de un antígeno usando una enzima enlazada a un anticuerpo para el antígeno.

Ensilaje: Producto que resulta del proceso de ensilado de varios productos agrícolas y que es destinado a la alimentación del ganado.

Esclerocio: Masa compacta de micelio endurecido que contiene reservas alimenticias, capaces de sobrevivir a condiciones ambientales extremas.

Fiálide: Célula terminal de conidióforo en forma de botella, que se une por su base a la Métula.

Genotipo: Conjunto de genes característicos de cada especie, vegetal o animal, es decir, son los genes en formato de ADN que un animal o vegetal recibe de herencia de parte de sus dos progenitores y que por tanto se encuentra conformado por las dos dotaciones de cromosomas que contienen la información genética del ser en cuestión.

Hifa: Filamento septado o no de tamaño microscópico, que reunido con otros filamentos forma el cuerpo vegetativo de los hongos.

Hepatotóxico: Sustancia nociva para las células del hígado.

Hongo: Organismo eucariota que pertenece al reino fungi.

Inmunosupresor: Sustancia química que produce la supresión del sistema inmunitario.

Metabolismo: Suma de todos los procesos químicos y físicos que tienen lugar en un organismo; en sentido más estricto, cambios físicos y químicos que sufre una sustancia en un organismo. Incluye la incorporación y distribución en el organismo de los componentes químicos, los cambios (biotransformaciones sufridas) y la eliminación de los compuestos y de sus metabolitos. *Término relacionado:* biotransformación.

Metabolito: Cualquier producto intermedio o final resultante del metabolismo. *Término relacionado:* biotransformación.

Métula: Célula de un conidióforo que lleva las fiálides.

Micotoxicosis: Trastornos en la salud de animales y personas producidos por la ingestión o inhalación de una o varias micotoxinas.

Micotoxina: Metabolito secundario tóxico, de composición variada, producidos por organismos del reino fungi; suele referirse a sustancias tóxicas producidas por hongos que afectan a animales vertebrados en bajas concentraciones.

Monooxigenasas, citocromo P₄₅₀: Enzimas que usan O₂ e incorporan un átomo de oxígeno dentro de un sustrato y reducen el otro átomo a agua; importante en la síntesis de hormonas esteroides y tirosina, también conocido en la detoxificación de compuestos xenobióticos.

Mutagénico: Cualquier sustancia que puede inducir cambios heredables (mutaciones) en el genotipo de una célula como consecuencia de alteraciones o de pérdida de genes o de cromosomas o de parte de los mismos. Perturba a la secuencia de bases del ADN y causa una mutación; con frecuencia son químicos, pero pueden también ser fuentes de energía tales como la luz ultravioleta.

Norma Oficial Mexicana: Es una serie de normas cuyo objetivo es asegurar, valores, características y cantidades mínimas y máximas en el diseño, producción o servicio de los bienes entre personas morales y/o físicas.

Ración total mezclada: Producto final que contiene todos los requerimientos nutricionales para la alimentación del ganado y puede ser adicionada con minerales, secuestrantes o vitaminas. Se puede elaborar con forrajes, materias primas, granos y suplementos.

Susceptibilidad: Condición en la que existe una disminución de la resistencia de un individuo frente a determinada enfermedad o intoxicación, y que se experimenta con dosis a exposiciones inferiores a las habitualmente nocivas para el resto de la población.

Teratogénico: Agente que por administración a la madre en periodo prenatal induce malformaciones estructurales o defectos en la descendencia.

Toxicidad: Capacidad para producir daño a un organismo vivo, en relación con la cantidad o dosis de sustancia administrada o absorbida, la vía de administración y su distribución en el tiempo (dosis única o repetidas), tipo y severidad del daño, tiempo necesario para producir éste, la naturaleza del organismo afectado y otras condiciones intervinientes.

Unidad de Producción Agropecuaria: Sistema productivo que se basa en la explotación de ganado productor de leche, cuyos elementos son: tamaño del hato, nivel de capacitación, nivel de producción, nivel de tecnología y eficiencia productiva.



9. REFERENCIAS

- Agrios, G. N. 2006. Fitopatología Agraria. 2ª edición. Editorial México Limusa. pp 101-130.
- Amare, M. G. and Keller, N. P. 2014. Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. *Fungal Genetics and Biology* 66: 11-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2014.02.008>
- Amaike, S. and Keller, N. P. 2011. *Aspergillus flavus*. *The Annual Review of Phytopathology* 49:107–133.
- Antilla, L. and Cotty, P. J. 2002. The ARS-ACRPC partnership to control aflatoxin in Arizona cotton: current status. *Mycopathologia* 155:64
- Astoreca, A.; Vaamonde, G.; Dalcero, A.; Marin, S. and Ramos, A. 2014. Abiotic factors and their interactions influence on the co-production of aflatoxin B₁ and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* isolated from corn. *Food Microbiology* 38: 276-283.
- Barnett, H. L. and Hunter, B., B. 2000. *Illustrated genera of imperfect fungi*, The American Phytopathological Soc. USA. p. 94-95.
- Bhat, R.; Rai, R. and Karim, A. 2010. Mycotoxins in Food and Feed: Present status and future concerns. *Reviews in Food Science and Food Safety, Institute of Food Technologists* 9:57-75.
- Bhatnagar, D., Cary, J.W., Ehrlich, K., Yu, J. and Cleveland, T. E. 2006. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia* 162:155-166.
- Bucio, A. M. and Guzmán de Peña, D. 2001. Aflatoxin synthesis in corn fields in Guanajuato, México. *Revista Iberoamericana de Micología* 18: 83-87.
- Carrillo, L. 2013. Microbiología Agraria. Universidad Nacional de Salta. ISBN 987-9381-16-5, Salta, Argentina.
- Chanda, A., Roze, L. V. and Linz, J. E., 2010. A possible role for exocytosis in aflatoxin export in *Aspergillus parasiticus*. *Eukaryotic Cell* 9: 1724-1727.
- Chanda, A., Roze, L. V., Kang, S., Artkymovich, K. A., Hicks, G. R., Raikhel, N. V., Calvo, A. M. and Linz, J. E., 2009. A key role for vesicles in fungal secondary metabolism. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 106: 19533-19538.
- Cotty, P. J. 1994. Comparison of four media for the isolation of *Aspergillus flavi* group fungi. *Mycopathologia* 125: 157-162.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Cotty, P. J. 2005. Development of *Aspergillus flavus* AF36. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Department of Plant Sciences, University of Arizona, Tucson, AZ.
- Cotty, P. J. and Bayman, P. 1993. Competitive exclusion of a toxigenic strain of *Aspergillus flavus* by an atoxigenic strain. *Phytopathology* 83: 1283-1287.
- Cotty, P. J. and Cardwell, K. F. 1999. Divergence of West African and north American communities of *Aspergillus* section *flavi*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2264-2266.
- Cotty, P. J., Antilla, L., and Wakelyn, P. J. 2007. Competitive exclusion of aflatoxin producers: farmer driven research and development. *Biological control: a global perspective*. pp. 241-253.
- Cruz, H. J. Y. 2006. Relación planta hombre en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. Caracas, Venezuela. pp. 4-20.
- Damann, K. E. 2015. Atoxigenic *Aspergillus flavus* biological control of aflatoxin contamination: what is the mechanism? *World Mycotoxin Journal* 8: 235-244.
- Damann, K. E., De Robertis, C. and Sweany, R., 2010. Mating between *Aspergillus flavus* cryptic species I and II. *Phytopathology* 100 Suppl. 6: S28.
- Davis, N. D., Iyer, S. K. and Diener, U. L. 1987. Improved method of screening for aflatoxina with a coconut agar medium. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 1593-1595.
- De Luna-López, M. C., Valdivia-Flores, A. G., Reyes-Velázquez, W. P. y Bucio-Villalobos, C.M., 2010. Efecto Protector de Etoxicina, *Saccharomyces cerevisiae* y N-acetilcisteína Contra la Intoxicación Alimentaria Crónica por Aflatoxinas en Gallinas de Postura. Tesis de Maestría en Ciencias Pecuarias. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 141 p.
- De Luna, M. C., Valdivia, A., Jaramillo, F., Reyes, J., Ortiz, R. and Quezada, T. 2013. Association between *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin production in immature grains of maize genotypes. *Journal of Food Science and Engineering* 3: 688-698.
- Deshpande, S. S., 2002. Handbook of Food Toxicology. *Fungal Toxins*. Ed. Marcel Dekker, Inc.:New York, Basel. p. 387-456.
- Dorner, J. W. 2009. Biological control of aflatoxin contamination in corn using a non toxigenic strain of *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection* 72: 801-804.
- Dorner, J. W. 2010. Efficacy of a biopesticide for control of aflatoxins in corn. *Journal of food protection* 73: 495-499.

- Dorokhin, D., Haasnoot, W., Franssen, M., Zuilhof, H. and Nielen, M. 2011. Imaging surface Plasmon resonance for multiplex microassay sensing of mycotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400: 3005-3011.
- Doster, M. A., Cotty, P. J., and Michailides, T. J. 2014. Evaluation of the atoxigenic *Aspergillus flavus* strain AF36 in pistachio orchards. *Plant Disease* 98: 948-956.
- Driehuis, F., Spanjer, M. C., Scholten, J. M. and Giffel, M. C. 2008. Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs of Dairy Cows and Estimation of Total Dietary Intakes. *Journal of Dairy Science* 91:4261–4271.
- Edwards, S. G., O'Callaghan, J. and Dobson, A.D.W. 2002. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycological Research* 106: 1005-1025.
- Ehrlich, K.C. 2014. Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxin contamination in crops: advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology* 5:50-9.
- Ehrlich, K. and Cotty, P.J. 2004. An isolate *Aspergillus flavus* used to reduce aflatoxin contamination in cottonseed has a defective polyketide syntase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 473-478.
- Ehrlich, K. and Yu, J. 2010. Aflatoxin-like Gene Clusters and How They Evolved. En Rai, M. and Varma, J. *Mycotoxins In Food, Feed and Bioweapons*. Amravaty University. Maharashtra, India. pp. 65-76.
- EUM-SEMARNAT; Estados Unidos Mexicanos. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2000. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudios, muestreos y análisis. Diario Oficial de la Federación.
- EUM-SE; Estados Unidos Mexicanos. Secretaria de Economía. 2006. Norma Oficial Mexicana NOMX-AA-132-ACFI-2006. Muestreo de suelos para la identificación y la cuantificación de metales y metaloides y manejo de la muestra. Diario Oficial de la Federación.
- EUM-SS; Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002. Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación, Primera Sección (15–10–2002): 22–41. Tomado de la red mundial <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/188ssa12.html> [29 May 2015].
- Frisvad, J. C. and Larsen, T. O. 2015. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99: 7859-7877.

- Geiser, D. M., Pitt, J. I. and Taylor, J. W. 1998. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:388-93.
- Fani, S. R., Moradi, M., Probst, C., Zamanizadeh, H. R., Mirabolfathy, M. Haidukowski, M. and Logrieco, A. F. A critical evaluation of cultural methods for the identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates for aflatoxin mitigation in pistachio orchards of Iran. 2014. *European Journal Plant Pathology* 140: 631-642.
- FAO; Food and Agriculture Organization. Tomado de la red mundial <http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/es/lead/toolbox/Refer/Glossary.htm>
- FAO, Food and Agriculture Organization. 2003. Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de peligros y de puntos críticos en la prevención y control de las micotoxinas. *Estudio FAO Alimentación y Nutrición 73*, Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia.
- Hernández, S., Reyes, L. A., Reyes, A., García, G. y Mayek, N. 2007. Incidencia de hongos potencialmente toxígenos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25: 127-133.
- FAO, Food and Agriculture Organization. 2004. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y las raciones en el año 2003. *Estudio FAO Alimentación y nutrición 81*, Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia. pp. 171
- FAO, Food and Agriculture Organization. 2007. Animal Feed Impact on Food Safety. *Report of the FAO/WHO Expert Meeting*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Headquarters, Rome, 2008.
- Fenelon, L. E., Hamilton, A. J., Figueroa, J. I., Bartholomew, M. A., Allen, M. H., McCarthy, P. and Hay, R. J. 1999. Production of Specific Monoclonal Antibodies to *Aspergillus* Species and Their Use in Immunohistochemical Identification of Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1221-1223.
- Flores, M. J., Sánchez, R. A., Gutierrez, R. y Echeverría, G. 2014. Microsilos: Una alternativa para pequeños productores. SAGARPA-INIFAP-Campo experimental Zacatecas. pp. 18.
- Geiser, D. M., Pitt, J. I. and Taylor, J. W. 1998. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:388-93.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Glass, N. L., and Donaldson, G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1323-1330.
- Glauert, A.M. 1974. Practical Methods in Electron Microscopy. Vol 3. Fixation, Dehydration and Embedding of Biological Specimens. North Holland, Amsterdam.
- Guzman de Peña, D. 2007. La exposición a la Aflatoxina B₁ en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. *Salud Pública de México* 49: 227-235.
- Hernández-Delgado, S. Reyes-López, M. Á. García-Olivares, J. G. Mayek-Pérez, N. Reyes-Méndez, C. A. 2007. Incidencia de hongos potencialmente toxígenos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:127-133.
- Hoffman, C. S. and Wriston, F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autoctonous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57:267-272.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. 2002. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 82. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans II, Press Lyon, France. pp 601.
- Ismail, B., Reuhs, B. L. and Nielsen, S. S., 2010. Analysis of Food Contaminants, Residues, and Chemical Constituents of Concern In: Nielsen, S. S., Food Analysis. *Food Science Texts Series*, pp. 326-328.
- Jiang, W., Wang, Z., Nölke, G., Zhang, J., Niu, L., and Shen, J., 2012. Simultaneous Determination of Aflatoxin B₁ and Aflatoxin M₁ in food Matrices by Enzyme-Lynked Immunosorbent Assay. *Food Analytical Methods* 6:767-774.
- Kabak, B. 2010. Prevention and Management of Mycotoxins in Food and Feed. In: Rai, M. and Varma, J. *Mycotoxins In Food, Feed and Bioweapons*. Amravaty University. Maharashtra, India. pp 208-234.
- Keller, L. A. M., González, M. L. Keller, K. M., Alonso, V. A., Oliveira, A. A., Almeida, T. X., Barbosa, T. S., Nunes, L. M. T., Cavaglieri, L. R., and Rosa, C. A. R. 2013. In: Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and fermentation. *Journal of Stored Products Research* 52:42-47.
- Kumamoto, C. A., 2008. Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing. *Nature Reviews Microbiology* 6: 667-673.
- Klich, M. A., Mendoza, C., Mullaney, E., Keller, N., and Bennett, J. W. 2001. A new sterigmatocystin-producing *Emericella* variant from agricultural desert soils. *Systematic and applied Microbiology* 24:131-138.

- Klich, M. A. 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. First edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht. The Netherlands. p. 166.
- Klich, M. A. 2007. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience* 48:71-80.
- Kralj, I. C. and Prosen, H., 2009. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences* 10: 62-115.
- Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W., H., Dijksterhuis, J., and Wösten, H. A. B. 2013. Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 74:1-29.
- Lazo, R., y Sierra, G., 2008. Investigación del efecto de las micotoxinas en el ser humano. *Revista Iberoamericana de Micología* 25: 7-11.
- Levin, R. E., 2012. PCR detection of aflatoxin producing fungi and its limitations. *International Journal of Food Microbiology* 156: 1-6.
- Linz, J. E., Chanda, A., Hong, S. Y., Whitten, D. A., Wilkerson, C. and Roze, L. V., 2012. Proteomic and biochemical evidence support a role for transport vesicles and endosomes in stress response and secondary metabolism in *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Proteome Research* 11: 767-775.
- López-Archilla, A. I., Gérard, E., Moreira, D. and López-García, P. 2004. Macrofilamentous microbial communities in the metalrich acidic River Tinto, Spain. *FEMS Microbiology Letters* 235: 221-228.
- Mallikarjunaiah, N. H., Jayapala, N., Puttaswamy, H., and Ramachandrapa, N. S. 2007. Characterization of non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agent for the management of aflatoxin contamination in groundnut. *Microbial pathogenesis* 102: 21-28.
- Martínez-Padrón, H. Y., Hernández-Delgado, S. y Vázquez-Carrillo, M. G. 2014. Incidencia de *Aspergillus spp.* y sus micotoxinas en maíz almacenado del norte de Tamaulipas. Trabajo de Tesis. Centro de Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional. pp 44.
- Martínez, H. Y., Hernández, S., Reyes, C. A. y Vázquez, G. 2013. El género *Aspergillus* y sus micotoxinas en el Maíz en México: Problemática y perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31:126-146.
- Mehl, H. L. and Cotty, P. J., 2010. Variation in competitive ability among isolates of *Aspergillus flavus* from different vegetative compatibility groups during maize infection. *Phytopathology* 100: 150-159.

- Montes, G. N., Reyes, M. C. A., Montes, R. N. and Cantu, A. M. A. 2009. Incidence of potentially toxigenic fungi in maize (*Zea mays* L.) grain used as food and animal feed. *CyTA-Journal of Food* 7:119–25.
- Moreno-Martínez, E., Vázquez-Badillo, M., y Facio-Parra, F. 2000. Uso de sales del ácido propiónico para inhibir la producción de aflatoxinas en granos almacenados de maíz. *Agrociencia* 34:477–84.
- Okun, D. O., Khamis, F. M., Muluvi, G. M., Ngeranwa, F. O., Yongo, M. O. and Kenya, E. U. 2015. Distribution of indigenous strains of atoxigenic and toxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize and peanuts agro-ecological zones of Kenya. *Agricultural and Food Security* 4:1-14.
- Ortega-Beltran, A., Jaime, R. and Cotty, P. 2015. Aflatoxin-producing fungi in maize field soils from sea level to over 2000 masl: A three year study in Sonora, Mexico. *Fungal Biology* 119: 191-200.
- Ortega-Beltran, A., Grubisha, L. C., Callicott, K. A. and Cotty, P.J. 2016. The vegetative compatibility group to which the US biocontrol agent *Aspergillus flavus* AF36 belongs is also endemic to Mexico. *Journal Applied in Microbiology* 120:986–98.
- Ortega, P. R. 2003. La diversidad del maíz en México. *In: Esteva G y C Marielle (eds.). Sin Maíz no hay País. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, Dirección General de Culturas Populares e Indígenas México, D. F. pp:123-154.*
- Paterson, M. and Lima, M. 2011. Further mycotoxin effects climate change. *Food Research International* 44: 2555-2566.
- Perng-Kuagn, C. and Sui-Sheng, T. H. 2007. Nonafatoxigenic *Aspergillus flavus* TX9-8 competitivyle prevents aflatoxin accumulation by *A. flavus* isolates of large and small sclerotial morphotypes. *International of Journal Food Microbiology* 114: 275-279.
- Placinta, C., D’Mello, J., and Macdonald, A. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78: 21-37.
- Pitt, J. I. and Hocking, A. D. 2009. The ecology of fungal food spoilage. *In Fungi and food spoilage*. Springer Science. DOI: 10.1007/978-0-387-92207-2.
- Pitt, J. I. and Hocking, A. D. 2009a. *Aspergillus* and related teleomorphs. Pp. 275-337 *In: Pitt, J. I. and Hocking, A. D. Fungi and food spoilage*. Springer Science. DOI: 10.1007/978-0-387-92207-2.
- Pontón, J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología* 25:78-82.

- Quezada-Viay, M. Y., Flores-Olivas, A., Arrúa-Alvarenga, A. A., Vázquez-Badillo, y Moreno-Martínez, E. 2011. Resistencia de plantas de maíz a la infección por *Aspergillus flavus* Link en invernadero. *Revista Agraria-Nueva Epoca* 8: 15-20.
- Rai, M. K., Bonde, S. R., Ingle, A. P. and Gade, A. K., 2012. Mycotoxin: Rapid Detection, Differentiation and Safety. *Journal of Pharmaceutical Education and Research* 3: 22-30.
- Raper, K. B. and Fennell, D. I. 1965. The Genus *Aspergillus*. Baltimore, Maryland, USA. Williams and Wilkins Co. pp 1-686.
- Reyneri, A. 2006. The role of climate condition on micotoxin production in cereal. *Veterinary Research Communications* 30: 87-92.
- Reyes, W. P., Isaías, V. H., Rojo, F., Jiménez, C., de Lucas, E., Hernández, J., and Ramírez, A. 2008. Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, México. *Revista Iberoamericana de Micología* 25: 182-185.
- Reyes, W. P., Martínez, S. P., Espinosa, V. H. I., Nathal-Vera, M. A., De Lucas, E. y Rojo, F. 2009. Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM₁ en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. *Técnica Pecuaria de México* 47:223-230.
- Requena, F., Saume, E., León, A. 2005. Micotoxinas: riesgos y prevención. *Zootecnia Tropical* 23: 393–410.
- Russell, R. and Paterson, M. 2006. Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Process Biochemistry* 41: 1467-1474.
- Roze, L. M., Chanda, A. and Linz, J. E., 2011. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. *Fungal Genetics and Biology* 48: 35-48.
- Saito, M. and Machida, S. 1999. A rapid identification method for aflatoxina producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience*. 40: 205-208.
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsub, S., Szigeti, G., Yaguchi, T. and Frisvad, J. C. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 78:141-173.
- Santibañez, R., Hernández, M., Montañez, O., Tapia, J., Martínez, J., Avellaneda, J. 2011. Identificación y cuantificación de hongos micotoxigénicos en alimento para bovinos. *Ciencia y Tecnología* 4. 19-23.

- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463–5467.
- Schroeckh, V., Scherlach, K., Nützmann, H. W., Shelest, E., Schmidt-Heck, W., Schumann, J., Martin, K., Hertweck, C. and Brakhage, A. A., 2009. Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 106: 14558-14563.
- Shapira, R., Paster, N., Eyal, O., Menasherov, M., Mett, A. and Salomon, R. 1996. Detection of aflatoxinogenic molds in grains by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3270-3273.
- Scott, P.M. 1995. Natural toxins. *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemistry*, 49: 1–30.
- Soares, C., Calado, and T., Venâncio, A. 2013. Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strain isolated from harvested maize in three Portuguese regions. *Revista Iberoamericana de Micología*. 30: 9-13.
- Soares, C., Rodrigues, P., Peterson, S., Lima, N. and Venâncio, A., 2012. Three new species of *Aspergillus* section Flavi isolated from almonds and maize in Portugal. *The Mycological Society of America*. 104: 682-697.
- Soriano del Castillo, J. M. 2007. Micotoxinas en Alimentos. España: Díaz de Santos. ISBN: 978-84-7978-808-7.
- Thathana, M. G., Murage, H., Abia, A. L. K., and Pillay, M. 2017. Morphological characterization and determination of aflatoxin-production potentials of *Aspergillus flavus* Isolated from maize and soil in Kenya. *Agriculture* 7:80.
- Valdivia, A., Ortiz, R., Quezada, T., de Luna, M. C., Martínez, A., Moreno, E. 2010. Aflatoxin production for two Mexican strains of *Aspergillus flavus* in immature corn grains. *Toxicology Letter* 196S:340–1.
- Valdivia, A., Quezada, T., Ortiz, R. y Martínez, A. 2012. Contaminantes ambientales y estrés oxidativo-micotoxinas. En Jaramillo, J. F., Rincón, A.R.S. y Martínez, S.M.C., *Estrés oxidativo y su impacto en la salud*. Ed. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. pp. 133-151.
- Varga, E., Glauner, T., Köppen, R., Mayer, K., Sulyok, M., Schuhmacher, R. Krska, R., and Berthiller, F. 2012. Stable isotope dilution assay for the accurate determination of mycotoxins in mize by UHPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402: 2675-2686.

- Varga, J., Frisvad, J. C. and Samson, R. A. 2011. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology*. 69:57-80.
- Varga, J., Szigeti, G., Barany, N., Kocsubé, S., O’Gorman, C., and Dyer, P. S. 2014. *Aspergillus*: Sex and recombination. *Mycopathologia*. 178: 349-362.
- Wang, N., Tytell, J. D. and Ingber, D. E., 2009. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10: 75-81.
- Wicklow, D. T., Bobell, J. R. and Palmquist, D. E., 2003. Effect of intraspecific competition by *Aspergillus flavus* on aflatoxin formation in suspended disc culture. *Mycological Research* 107: 617-623.
- Windham, G. L., Williams, W. P., Buckley, P. M., and Abbas, H. K. 2003. Inoculation techniques used to quantify aflatoxin resistance in corn. *Journal of Toxicology*, 22:313–25.
- Wynn, W. K. 1976. Appressorium formation over stomates by the bean rust fungus: response to surface contact stimulus. *Phytopathology* 66: 136-146.
- Yu, J., Chang, P. K., Ehrlich, K. C., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Bennett, J. W. 2004. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:1253-1262.
- Yu, J., Nierman, W. C., Bennett, J. W., Cleveland, T. E., Bhatnagar, D., Campbell, D. C., Deand, R. A. and Payne, G. 2010. Genetics and genomic of *Aspergillus flavus*. In Rai, M. and Kövics, G. *Progress in Mycology*. Springer Science. Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- Yu, J. 2012. Current Understanding on Aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxina contamination. *Toxins*. 4: 1024-1057. DOI: 10.3390/toxins/4111024.
- Zanon, M. S. A., Clemente, M. P. and Chulze, S. N. 2018. Characterization and competitive ability of non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolated from the maize agro-ecosystem in Argentina as potential aflatoxin biocontrol agents. *International Journal of food microbiology* 277:58-63.

8. ANEXOS

ANEXO A. PROPUESTA DE ARTÍCULOi



ANEXO A: PROPUESTA ARTÍCULO

Asunto: [RMCP] Decisión del Editor

Fecha: 2019-04-29 18:49

De: Ciencias Pecuarias <cienciaspecuarias@inifap.gob.mx>

Destinatario: Dr Arturo Gerardo Valdivia-Fores <avaldiv@correo.uaa.mx>

Cc: <rodriguez_oscar@prodigy.net.mx>

Dr Arturo Gerardo Valdivia-Fores:

Con referencia al trabajo: "CARACTERIZACIÓN DE ASPERGILLUS FLAVUS Y CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN ALIMENTO Y LECHE CRUDA DE VACAS EN

AGUASCALIENTES, MÉXICO", que tuvo a bien someter a revisión en la Revista

Mexicana de Ciencias Pecuarias; nos permitimos hacer de su conocimiento el siguiente:

Dictamen: Aceptado para su publicación como Artículo.

En su versión final incluir la primera página completa con nombres de autores e instituciones. Considerar los puntos del archivo adjunto.

Enviar información a:

rodriguez_oscar@prodigy.net.mx

Ciencias Pecuarias

cienciaspecuarias@inifap.gob.mx

Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias

<http://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/>

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

CARACTERIZACIÓN DE *ASPERGILLUS FLAVUS* Y CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN PIENSO Y LECHE CRUDA DE VACAS EN AGUASCALIENTES, MÉXICO

CHARACTERIZATION OF *ASPERGILLUS FLAVUS* AND QUANTIFICATION OF AFLATOXINS IN FEED AND RAW MILK OF COWS IN AGUASCALIENTES (MEXICO)

Erika Janet Rangel-Muñoz^a, Arturo Gerardo Valdivia-Flores^{a*}, Onésimo Moreno-Rico^b,
Sanjuana Hernández-Delgado^c, Carlos Cruz-Vázquez^d, María Carolina de-Luna-López^a,
Teódulo Quezada-Tristán^a, Raúl Ortiz-Martínez^a, Netzahualcóyotl Máyek-Pérez^e

^aUniversidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Agropecuarias, km 2.5 carretera La Posta-Jesús María, Jesús María, Aguascalientes, México.

^bUniversidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Básicas, Aguascalientes, Aguascalientes, México.

^cInstituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Reynosa, Tamaulipas, México.

^dInstituto Tecnológico El Llano, Municipio de El Llano, Aguascalientes, México.

^eUniversidad México Americana del Norte A. C. Coordinación de Investigación, Reynosa, Tamaulipas, México.

*Autor de correspondencia: avaldiv@correo.uaa.mx

Resumen

La contaminación de productos agrícolas y pecuarios con aflatoxinas (AF) está distribuida mundialmente. Las AF son tóxicas, inmunodepresoras y carcinogénicas, pero en México es escasa la información sobre *Aspergillus*

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

flavus, principal hongo que las produce. El objetivo fue caracterizar morfológica, molecular y aflatoxigénicamente aislados de *A. flavus* y cuantificar AF en pienso y en leche de vacas Holstein en Aguascalientes (México). Se seleccionó por conveniencia una unidad de producción lechera (2749 vacas) y se recolectaron muestras mensuales (24 meses) de ingredientes alimenticios y ración total mezclada (n=267), leche cruda (n=288) y suelo agrícola (n=40), las cuales se cultivaron (PDA) mediante vaciado en placa con diluciones seriadas. Los hongos se caracterizaron mediante MEB, TLC y vapores de amonio en agar coco; se secuenciaron los genes de calmodulina y regulador de la ruta biosintética de AF, así como la región de los espaciadores internos de la transcripción. Se cuantificaron AF en pienso con HPLC y en leche con ELISA. Se caracterizaron molecularmente 283 aislados fúngicos; 88 resultaron ser *Aspergillus spp.*, de los que 5 fueron *A. flavus* con capacidad aflatoxigénica y uno no aflatoxigénico. El 99.3% de las muestras de alimento y 39.9% de las muestras de leche presentaron niveles detectables de AF (14.8 y 0.021 µg/kg). Las vacas ingirieron diariamente 621 µg de AF y eliminaron el 0.09% como AFM₁ en leche. Lo anterior sugiere que la ocurrencia *A. flavus* aflatoxigénico en el alimento de vacas lecheras conduce una amplia contaminación por AF de las dietas y de la cadena alimenticia.

Palabras clave: Aflatoxinas, *A. flavus*, alimentos lácteos, gen de calmodulina, gen regulador de la ruta biosintética de aflatoxinas.

Abstract

The contamination of agricultural and livestock products with aflatoxin (AF) is worldwide distributed. AF are toxic, immunosuppressive and carcinogenic, but

in Mexico there is little information about *Aspergillus flavus*, the main AF-producing fungus. The objective was (I) to characterize morphological, molecular and aflatoxigenically isolates of *A. flavus*, and (II) to quantify AF in feed and raw milk of Holstein cows in Aguascalientes (Mexico). A large dairy production unit (2749 cows) was selected for convenience and monthly samples (24 months) of feed ingredients and mixed total ration (n=267), raw milk (n=288) and agricultural soil (n=40) were collected, which were cultivated (PDA) via serial dilution plate technique. The isolates were characterized by MEB, TLC and ammonium vapors in coconut agar; genes of calmodulin and AF biosynthetic pathway-regulatory were sequenced, as well as internal transcribed spacers of the nrDNA. AF were quantified in cows' feed with HPLC and in milk with ELISA. A total of 283 fungal isolates were molecularly characterized, of which 88 were *Aspergillus* spp, 6 *A. flavus* and 5 aflatoxigenics *A. flavus*. 99.3% of the feed samples and 39.9% of the milk samples showed detectable levels of FA (14.8 and 0.021 $\mu\text{g}/\text{kg}$). The cows daily intaked 621 μg of AF and eliminated 0.09% as AF-M₁ in milk. These results suggests that the aflatoxigenic *A. flavus* occurrence in dairy cows' feed leads to extensive AF contamination of diets and the food chain.

Key words: Aflatoxins, *A. flavus*, dairy food, regulatory gene for aflatoxin biosynthesis, calmodulin gene.

Introducción

México es un país en desarrollo con dependencia alimentaria de leche de bovino; ya que sus unidades de producción lechera (UPL) logran aportar solamente un 78% de la demanda nacional de este alimento que es de 14,876

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Mton⁽¹⁾. La lechería mexicana se desarrolla especialmente en el Altiplano Central Mexicano, el cual se ha considerado una sola provincia biogeográfica⁽²⁾. En el interior de esta región se concentra el 23% del total de la producción nacional en los estados de Aguascalientes, Jalisco y Guanajuato⁽³⁾. Además de la falta de producción, las UPL enfrentan problemas de rentabilidad económica y de inocuidad⁽⁴⁾. Dentro de los problemas de inocuidad se ha resaltado la presencia de aflatoxinas (AF) porque ocasionan un fuerte impacto económico asociado a la contaminación de las cosechas agrícolas, al deterioro de la salud de los animales, la disminución de su productividad, así como a la contaminación de alimentos de origen animal^(5,6). Las AF tienen propiedades hepatotóxicas, nefrotóxicas e inmunosupresoras y son consideradas como los carcinógenos naturales más potentes que se conocen⁽⁷⁾. Las AF se han cuantificado en leche y productos lácteos destinados para la alimentación de la población humana mexicana^(8,9,10). Lo cual sugiere que la presencia de AF en el pienso de las vacas es un problema usual en las UPL lo cual induce la contaminación de los metabolitos de AF en la leche⁽¹¹⁾. Cuando las vacas lecheras ingieren productos agrícolas contaminados con AF, los mecanismos enzimáticos bioactivan la micotoxina mediante la formación de un epóxido que reacciona con las estructuras celulares y ácidos nucleicos dañando su integridad. El epóxido reactivo puede también neutralizarse mediante su conjugación con glutatión o su excreción como un metabolito que se elimina en la leche principalmente como aflatoxina M₁ (AFM₁); también AFM₁ es considerada como un agente tóxico y carcinogénico para los humanos^(7,12). Por estos motivos se han establecido normas para reducir el riesgo de la población humana a la exposición alimentaria a AF⁽⁶⁾.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Las AF son metabolitos secundarios de varios hongos filamentosos del género *Aspergillus*, los cuales se encuentran distribuidos mundialmente y contaminan una gran variedad de productos agrícolas, especialmente los cereales⁽¹³⁾.

También *A. flavus* ha sido identificado en México, tanto en suelo agrícola y como en grano de maíz^(14,15).

La taxonomía del género *Aspergillus* ha sido descrita anteriormente; inicialmente se describieron 18 grupos de especies, basados en las características culturales y morfológicas⁽¹⁶⁾; más tarde estos grupos se han seguido reclasificando en base a estudios moleculares de secuencias de ARN ribosomal y el término grupo se cambió por el de sección⁽¹⁷⁾; por lo que la sección Flavi agrupa a las especies productoras de AF⁽¹⁸⁾.

La reproducción asexual del género *Aspergillus* ha sido descrita previamente^(18,19). El ciclo inicia a partir de conidios o esporas asexuales, las que dan origen a una red de filamentos o hifas, que en conjunto forman el micelio; de éste surgen los conidióforos (Figura 1, panel A). Los conidióforos tienen tres partes bien definidas: la vesícula es el extremo apical ensanchado, el estípite es la sección cilíndrica que le da soporte y la célula pie que lo une con el micelio. Sobre la vesícula emergen las fiálides, que son células en forma de botella donde se forman los conidios (Figura 1, panel^(20,13) B); en algunos conidióforos, las fiálides se encuentran soportadas por células denominadas métulas (Figura 1, panel C). Las cabezas conidiales uniseriadas sólo presentan fiálides y las biseriadas poseen fiálides y métulas.

Las características morfológicas distintivas de *A. flavus* ya han sido descritas; sus colonias suelen tener un color verde oscuro, verde oliva o verde brillante según el medio donde se haya purificado. El micelio es blanquecino y puede

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

presentar esclerocios de color café oscuro a negro y de tamaños variables (Figura 2). Microscópicamente presenta cabezas conidiales radiadas o columnares, estípites de paredes rugosas, vesículas esféricas a elongadas, uniseriadas o biseriadas y conidias de forma globosa a elipsoidal con paredes lisas o finamente rugosas (Figura 3).

Aspergillus flavus es considerado la especie con mayor capacidad de producción de aflatoxinas⁽²¹⁾. Aunque hay cepas de *A. flavus* sin capacidad aflatoxigénica, también otras especies de *Aspergillus* producen AF, como *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudonomius*, *A. arachidicola*, *A. bombycis*, *A. pseudotamarii*, *A. minisclerotigenes* y *A. togoensis*⁽²²⁾. La capacidad aflatoxigénica se expresa principalmente bajo condiciones de estrés ambiental^(23,24), siempre y cuando su genotipo incluya la información involucrada en la cadena metabólica de producción de AF^(25,26,27). Una estrategia para la identificación molecular de las diferentes especies del género *Aspergillus* es el empleo del gen de la calmodulina (CaM), los fragmentos correspondientes a la región de los espaciadores internos de la transcripción (ITS) y el gen regulador de la ruta biosintética de aflatoxinas (*afIR*)^(13,28,29). El objetivo de este trabajo fue caracterizar morfológica, molecular y aflatoxigénicamente aislados de *Aspergillus flavus* obtenidos de unidades de producción lechera del Altiplano Central Mexicano.

Material y métodos

Lugar de estudio

El estudio fue realizado con un diseño descriptivo, longitudinal y no experimental.

Se seleccionó una unidad de producción lechera con el método no probabilístico

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

por conveniencia y se le dio seguimiento por 24 meses. La UPL se ubicó en el Altiplano Central Mexicano (21°48'N, 102°03' O; 1986-2008 msnmm), con clima templado-seco y semicálido-semiseco, con lluvias en verano, temperatura promedio de 18.4 ° C, precipitación pluvial anual: 518.4 mm y altitud máxima de 2300 msnm.

En el periodo de observación, la UPL contó con un promedio de 2749 vacas de la raza Holstein, alojadas en estabulación libre dentro de corrales limitados con cercas metálicas, áreas sombreadas y comederos al libre acceso. El proceso de ordeño de las vacas se realizó con equipo automatizado obteniendo una producción promedio diario por vaca de 28.1 litros. La producción láctea se destinó a plantas procesadoras y transformadoras de la región. Las dietas alimenticias se elaboraron como una ración total mezclada (RTM) en una fábrica de piensos, donde el ensilaje de maíz y el concentrado se incorporaron en carros mezcladores. La RTM se formuló para satisfacer los requerimientos nutricionales de las vacas lecheras. El maíz para ensilaje se obtuvo directamente de las áreas agrícolas de la UPL, mientras que el concentrado proteico-energético se adquirió en la Asociación Local de Ganaderos Lecheros de Aguascalientes; empleando como principales ingredientes canola, soya, maíz rolado, sorgo, pasta de soya, grano de maíz seco destilado, semilla de algodón, heno de alfalfa y avena, así como premezcla de vitaminas y minerales.

Obtención y manejo de muestras

Mensualmente se obtuvieron muestras (1.0 kg) de alimento mediante la técnica establecida por la normatividad oficial mexicana⁽³⁰⁾. Las muestras de ración total mezclada (RTM), alimento concentrado y ensilaje de maíz se tomaron directamente del pesebre donde se alimentaban las vacas, del almacén y de la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

superficie de corte del silo, respectivamente. Se obtuvieron un total de 288 muestras de alimento y se secaron en una estufa con circulación forzada de aire (OF-22G JEOI-TECH, Lab Companion, Corea). Las muestras se pulverizaron en un molino universal de funcionamiento continuo (MF series 10 Basic, IKA®-Werke, Alemania) hasta obtener el tamaño de partícula deseado (500-800 μm) y se almacenaron en refrigeración (4-5 °C) dentro de bolsas con cierre hermético hasta su procesamiento (< 7 d).

Durante el ordeño (matutino y vespertino) se obtuvieron un total de 288 muestras de leche cruda, directamente del tanque recolector (500 ml), por cada lote productivo (altas, medias y bajas). Las muestras se transportaron en refrigeración en frascos previamente identificados y se conservaron en congelación a -20°C hasta su procesamiento (< 7 d).

Con ayuda de un sacabocado para suelo se muestrearon 5 parcelas agrícolas, eligiendo 4 puntos de muestreo sobre la superficie de cada parcela y tomando 5 sub-muestras de 100 g en cada punto, a 3-30 cm de profundidad. Las cinco sub-muestras se reunieron en una bolsa con cierre hermético debidamente identificada. Finalmente se pasaron por una serie de tamices (500-800 μ) y se conservaron en refrigeración hasta su procesamiento.

Cuantificación de aflatoxinas

Las muestras de alimento se analizaron de acuerdo con el método oficial 990.33 de la AOAC⁽³¹⁾, para lo cual se mezcló cada muestra (50 g) con metanol:agua (8:2 v/v), luego se eluyeron en columnas de fase sólida (SPE; Supelclean™ LC-18 SPE tube, Sigma-Aldrich, EUA) usando ácido acético (0.5%). Las SPE se lavaron con tetrahidrofurano (THF) y hexano. El eluato se obtuvo con cloruro de metileno:THF y se evaporó a sequedad total bajo corriente de nitrógeno. Las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

muestras se derivatizaron usando ácido trifluoroacético. El eluato extraído se analizó mediante HPLC (Límite mínimo de detección 2 µg/kg) con detector de fluorescencia (Bomba binaria Varian Pro Star; FP detector 2020, Varian Associates Inc., Victoria, Australia), columna C18 y guarda columna (LC-18 y LC-18; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA); temperatura 25°C ± 2°C; fase móvil acetonitrilo:metanol:agua (1:1:2, v/v/v); velocidad de flujo 1.0 ml/min; λ_{ex} : 360 nm, λ_{em} : 460 nm; volumen de inyección 20 µl. Los datos de cuantificación se obtuvieron a través del software Galaxie (Ver. 1.9.302.530) y las concentraciones de AF se calcularon mediante curvas estándar de AF purificadas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

La AFM₁ se cuantificó en la leche cruda con la técnica de ELISA competitivo empleando un kit comercial con un rango de detección de 0.005 a 0.08 µg/kg (Ridascreen fast® aflatoxin M₁ R-1121, R-Biopharm, Alemania). De acuerdo a las instrucciones del fabricante, las muestras se homogeneizaron y se centrifugaron para retirar la grasa. En cada pocillo de las microplacas se agregaron diversos reactivos (anticuerpo, estándares, muestras, conjugado de enzima y substrato cromógeno) con lavados e incubación en oscuridad a temperatura ambiente (20-25°C) entre cada paso. Finalmente, se agregó la solución de frenado y la absorbancia se midió a 450 nm en un lector de microplacas de ELISA (BioTek Instruments, Inc., USA). Los resultados se interpretaron con base a la curva de calibración realizada con AFM₁ purificada (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Aislamiento y caracterización fúngica

Los hongos se aislaron empleando la técnica de vaciado en placa con cuatro diluciones seriadas en agua peptonada estéril⁽³²⁾; las muestras se sembraron en los siguientes tipos de agar: papa y dextrosa (PDA), extracto de malta con rosa

de Bengala y Czapeck; se incubaron (28°C) en oscuridad durante 7 días. Se aislaron y purificaron las colonias y se identificaron las características morfológicas microscópicas congruentes con la descripción del género⁽²⁰⁾. Los aislados congruentes con *A. flavus*⁽³³⁾ se sometieron al proceso de fijación con glutaraldehído (2%), deshidratación con alcoholes graduales y acondicionamiento con un secador de punto crítico (Samdri 795, Tousimis Research Rockville, Maryland) y un metalizador (Desk II, Denton Vacuum, EUA) para proceder a su digitalización en un microscopio electrónico de barrido (JSM-5900 LV, JEOL, EUA). Se realizaron diez mediciones de cada estructura (estípite, vesícula, espora, esclerocio y fiálide) mediante un software (JEOL Scanning Electron Microscope). Las estructuras morfológicas de los aislados identificados se compararon contra cepas conocidas de *A. flavus*^(21,34), denominadas AF-36, AF-Cuatitlán (AF-C) y AF-Tamaulipas, (AF-T). Estas cepas control, así como las obtenidas en este estudio fueron registradas en el NCBI y las claves de acceso se muestran en el cuadro 3.

La capacidad aflatoxigénica de los aislados se caracterizó mediante cromatografía en capa fina (TLC), siguiendo el método oficial 972.26 de la AOAC y la técnica de vapores de amonio en agar coco^(35,36). Para la realización de la cromatografía, las placas de sílica gel sin indicador de fluorescencia (Z265829, Sigma-Aldrich, EUA) se activaron (110°C 30 min) en una estufa de alta temperatura (OF-22G JEOI-TECH, Lab Companion, Corea). En las placas con (40 µL) de cada muestra y estándares de AF purificadas (5 µL; A6636-50MG, Sigma Aldrich, EUA) se colocaron dentro de una cámara cromatográfica con fase móvil cloroformo:acetona:isopropanol (85:10:5, v/v/v) durante hora y media. Las placas se secaron (100°C 10 min) y se visualizaron en un transiluminador.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

En la técnica de vapores de amonio en agar coco se utilizaron las cepas testigo señaladas (AF-36, AF-C y AF-T). El coco seco rallado (200 g) humedecido con agua destilada (1.0 L) se homogeneizó (5 min) y se filtró. Se agregó agar (20 g) y se ajustó el pH a 6.5; se esterilizó (15 min, 15 libras de presión) y se vació en cajas Petri. Se inocularon los aislados monospóricos de *A. flavus* y se dejaron incubar en oscuridad (30°C, 5-7 d). Posteriormente, se agregó hidróxido de amonio (200 µl; J.T. Baker, México) al 25% en la tapa de las cajas Petri y se observó la amplitud y la intensidad del color. La presencia de color se tomó como indicativo de producción de AF.

Análisis molecular

La extracción de ADN genómico de los cultivos monospóricos de *Aspergillus* spp. se realizó siguiendo métodos estandarizados⁽³⁷⁾. La calidad de ADN obtenido se visualizó con electroforesis (45 min a 85 volts) en gel de agarosa (1%) con amortiguador TAE 1X; para la cuantificación se utilizaron como referencia concentraciones conocidas de ADN de fago λ (Thermo Fisher Scientific, MA USA). La visualización del ADN se realizó en un fotodocumentador (Bio-Rad Molecular Imagen®- Gel Doctm XR, CA EUA) con el software Quantity One versión 4.6.7.

Se realizó la amplificación de un fragmento correspondiente a la región de espaciadores internos de la transcripción (ITS; ITS1-5.8S-ITS2 RNAr) con los iniciadores universales ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATG -3'); se amplificó el gen de la calmodulina (CaM) con los iniciadores CMDA7F (5'-GCCAAAATCTTCATCCGTAG-3') y CMDA8R (5'-ATTTTCGTTTCAGAATGCCAGG-3'), y se amplificó el gen regulador de la ruta biosintética de aflatoxinas (*afIR*) empleando los iniciadores *afIR*-F (5'-

GGGATAGCTGTACGAGTTGTGCCAG-3') y *afIR*-R (5'-TGGKGCCGACTCGAGGAAYGGGT-3') de Eurofins Genomics, Louisville KY, USA, siguiendo los protocolos de^(25,38,39) respectivamente. Para la amplificación fue utilizada la enzima Go-Taq polimerasa (Promega, Madison, WI USA) y un termociclador (modelo 9700 Applied Biosystems). Los productos de PCR obtenidos se separaron por electroforesis en gel de agarosa (1%); para observar los productos de PCR (*ITS*, *calmodulina* y *afIR*) se emplearon como intercalantes los reactivos SYBR® Gold y Orange DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, MA USA) y las bandas resultantes se observaron en un fotodocumentador de imágenes (BIO-RAD Molecular Imagen®- GEL DOCTM XR CA, EUA) con el software Quantity One (versión 4.6.7.). Se incluyeron escaleras marcadoras de peso molecular (Axygen Biosciences, CA, EUA). Los productos de PCR se purificaron con el reactivo ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup (Afflymetrix, Thermo Fisher Scientific Inc. Santa Clara, California, EUA). Los productos de PCR purificados se secuenciaron en cadenas forward y reverse con el método dideoxi⁽⁴⁰⁾. Las muestras se inyectaron en un secuenciador (ABI 3730XL Genetic Analyzers) y las secuencias resultantes se registraron en un electroferograma. Los electroferogramas fueron visualizados con el software Chromas Lite y se compararon con los registros del NCBI (National Center for Biotechnology Information) usando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Análisis estadístico

Los datos de cantidad de ración total mezclada, producción lechera, concentración de AF en pienso y leche, así como de las mediciones de las estructuras de cada aislado se sometieron a un análisis de varianza de una vía

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(ANOVA) considerando separadamente como factores la época del año y el nivel de producción de leche (alta, media o baja) en el cual se tuvieron lotificadas las vacas (Cuadro 4). Para determinar las diferencias entre las medias y los intervalos de confianza al 95% se realizó el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de la prueba de Tukey. $P < 0.05$ fue considerado como significativo para todos los análisis estadísticos.

Resultados

Frecuencia de *Aspergillus spp.*

Se identificaron un total de 283 aislados fúngicos, 56.8 % provinieron de muestras del pienso de las vacas lecheras y el resto de suelo agrícola (Cuadro 1). Un total de 88 aislamientos (31.1%) mostraron características morfológicas correspondientes a las descritas para el género *Aspergillus*⁽²⁰⁾; En la figura 1 se observan los conidióforos, los conidios y las métulas características. También se encontraron aislamientos con morfología compatible con los géneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Curvularia* y *Bipolaris*. Las proporciones respectivas de cada género se muestran en el Cuadro 1.

Solamente seis aislamientos mostraron una morfología coincidente con *A. flavus* y provinieron del alimento concentrado (AC1, AC2 y AC3) y del ensilaje de maíz (EM1, EM2, EM3); al ser cultivados en APD, mostraron una coloración verde olivo con la periferia blanquecina. La mayoría de los aislados (5/6) mostraron presencia de esclerocios de color marrón oscuro, mientras que sólo uno no presentó estas estructuras.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Microscópicamente, los conidióforos de *A. flavus* presentaron cabezas conidiales irradiadas y uniseriadas, el estípote con paredes rugosas, la vesícula esférica, los conidios tenían forma globosa con irregularidades en la superficie y el micelio septado y blanquecino (Figura 2).

Los seis aislados de *A. flavus* provenientes de pienso mostraron diferencias significativas en la morfometría de sus estructuras al ser comparadas contra las cepas control (AF-C y AF-T; Cuadro 2); aunque estas cepas también mostraron diferencias entre ambas. Estas cepas presentaron cabezas conidiales radiadas, con estípote rugosa, la vesícula de forma esférica, mientras que AF-C sólo presentó fiálides (uniseriadas) y AF-T fiálides y métulas (biseriadas); las conidias de forma globosa con irregularidades en la superficie; cuatro aislados se clasificaron como cepas L (esclerocios largos > 400 µm), uno como cepa S (esclerocio corto <400 µm) y otro sin esclerocio.

Análisis molecular

De los 88 aislados identificados morfológicamente como *Aspergillus spp.*, el 49% amplificó para el gen calmodulina con un tamaño de 468 pb y el 31% amplificó para el ITS en un rango de 600-800 pb (Figura 4). Los análisis de las secuencias obtenidas demostraron que las especies identificadas fueron *A. oryzae* (45.5%), *A. niger* (10.2%), *A. ochraceus* (3.4%), *A. pseudodeflectus* (4.5%), *A. ustus* (10.2%), *A. flavus* (6.8%), *A. versicolor* (5.6%), *A. nidulans* (5.6%), *A. sublatus* (4.5%) y *A. sydowii* (3.4%).

Los cinco aislados identificados como *A. flavus* aflatoxigénico amplificaron el fragmento de 796 pb para el gen *aflR*. El análisis de las secuencias de las cepas testigo (AF-36, AF-C y AF-T) y de los seis aislados de *A. flavus* (AF-AC1, AF-AC2, AF-AC3, AF-EM1, AF-EM2 y AF-EM3) mostraron tener un porcentaje de

identidad mayor al 90% con aislamientos de *A. flavus* registrados en la base de datos del NCBI (Cuadro 3).

Los aislados identificados como *A. flavus* se analizaron por la técnica de TLC y de vapores de amonio en agar coco para identificar la presencia de aflatoxina (Figura 3). Cinco aislamientos (AF-AC1, AF-AC2, AF-AC3, AF-EM2 y AF-M3) tuvieron una reacción positiva a la presencia de AF y el otro (AF-EM1) fue negativo a la producción de aflatoxina en ambas técnicas. Estos resultados coincidieron con la amplificaron del fragmento de 796 pb para el gen *aflR*.

Aflatoxinas detectadas en pienso y en leche

De las 288 muestras obtenidas de alimento, 286 (99.3%) presentaron niveles detectables de AF ($18.5 \pm 3.7 \mu\text{g}/\text{kg}$); de las cuales el 10.4% sobrepasaron los límites máximos permisibles por la legislación mexicana ($20 \mu\text{g}/\text{kg}$). En las 183 muestras de leche cruda, la presencia de AFM₁ ($0.021 \mu\text{g}/\text{kg}$) se detectó en el 39.9% y el 12.0 % rebasó el límite máximo permisible utilizado como norma por la industria local de lácteos ($0.050 \mu\text{g}/\text{kg}$). La mayor incidencia de AF en pienso se presentó en verano y otoño ($P < 0.01$) en comparación con primavera e invierno ($17.4^{\text{a}} \pm 3.2$ y $14.8^{\text{ab}} \pm 1.6$ vs $8.1^{\text{bc}} \pm 0.5$ y $5.9^{\text{c}} \pm 0.5$, $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente). A su vez, la concentración de AFM₁ se correlacionó de manera directa con la concentración de AF en la RTM en un modelo doble cuadrado ($P < 0.01$; $R^2 = 30.5\%$). También la presencia de AFM₁ en leche se correlacionó significativamente con el nivel de producción de leche y con el consumo de RTM; en promedio, las vacas consumieron diariamente $621 \mu\text{g}$ de aflatoxinas en 42 kg de RTM, produjeron diariamente 26.2 L de leche con una carga total de $0.603 \mu\text{g}$ de AFM₁, lo que representó una gran capacidad de las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

vacas lecheras para metabolizar las AF y solamente eliminaron una fracción mínima (0.09%; Cuadro 4).

La cantidad de RTM proporcionada a cada lote productivo presentó variaciones en la cantidad suministrada, por lo que los animales de cada lote se expusieron a diferente consumo total de AF (Cuadro 4); en general, los lotes productivos de vacas con alta producción se expusieron a la ingestión de mayores cantidades de AF (658 $\mu\text{g}/\text{vaca}/\text{día}$) y la presencia y eliminación de AFM₁ en la leche de las vacas altas productoras fue mayor al lote de vacas de mediana y de baja producción (0.22 $\mu\text{g}/\text{vaca}/\text{día}$).

Discusión

En este estudio longitudinal de dos años de duración se demostró la presencia de *Aspergillus flavus* en pienso de las vacas lecheras del Altiplano Central Mexicano. Estos aislados mostraron características morfológicas, toxicológicas y moleculares congruentes con las cepas que poseen la capacidad de producir aflatoxinas. Además, se corroboró la acumulación de AF en el pienso y en la leche que produjeron las vacas. Aunque ya se contaba con información de la existencia en México de poblaciones indígenas de *A. flavus* con y sin capacidad de producir aflatoxinas, en nuestro conocimiento, este estudio agrega por primera vez la identificación molecular, toxicológica y morfométrica de *A. flavus* a la cuantificación de aflatoxinas en la lechería, lo cual es de importancia para la producción animal y la salud pública.

Frecuencia de *Aspergillus spp.* y *A. flavus*

Aspergillus fue el género micótico con mayor ocurrencia en la UPL (31%) seguido de *Penicillium* (13.8 %) y *Fusarium* (12.7 %). Estos géneros ya han

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sido identificados en México, en el estado de Tamaulipas⁽¹⁴⁾; estos autores observaron proporciones similares al presente estudio de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (50.3, 15.9 y 5.5% respectivamente) en maíz amarillo almacenado. Estos mismos géneros micóticos han sido identificados en híbridos de maíz destinados al consumo humano y animal en el norte del país⁽⁴¹⁾ (20.1, 14.7 y 32.6 % respectivamente). En este sentido, se ha sugerido que la presencia frecuente de hongos micotoxigénicos en maíz en México es debida al manejo inadecuado del cultivo y a la falta de aplicación efectiva de estrategias de control para reducir o evitar la infección por estos hongos; lo cual propicia las condiciones óptimas para el desarrollo de *Aspergillus spp.* y para la producción de sus toxinas^(8,42).

En este estudio, *A. flavus* se aisló de pienso para vacas lecheras en una proporción del 6.8% del total de los *Aspergillus* identificados (6/88). En suelo agrícola destinado a la producción alterna de maíz forrajero con avena no se identificó esta especie. En México, *A. flavus* ha sido identificado en suelo para cultivos de maíz de grano⁽¹⁵⁾, se identificaron *Aspergillus* sección *Flavi* en la totalidad de 83 muestras colectadas (2006-2008) en 4 zonas agroecológicas del estado de Sonora; mientras que *A. flavus* se identificó en 62 % de esos aislamientos.

En otro estudio⁽⁴³⁾, se identificó *A. flavus* en granos de maíz comercial en los estados de Sonora, Sinaloa, Nayarit y Tamaulipas. Lo anterior sugiere que las poblaciones fúngicas de esta especie se encuentran distribuidas ampliamente en las zonas agrícolas de México.

En este estudio, el análisis morfométrico mostró que la tercera parte de los aislados de *A. flavus* contenía abundantes esclerocios cortos (< 400 μ m) por lo

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

que se clasificaron como cepas S, mientras que el resto fueron denominadas como cepas L con escasos esclerocios, pero de tamaño mayor ($>400 \mu\text{m}$). Ya se señalado la importancia de esta morfología y su asociación con la aflatoxigenicidad de las cepas S, mientras que las cepas L contienen tanto aislados atoxigénicos como toxigénicos^(44,45).

En el presente estudio se aislaron con mayor frecuencia (83%) cepas L en comparación con cepas S (16.3 %), en relación con el total de *A. flavus* identificados. En un estudio longitudinal⁽¹⁵⁾ en varias zonas productoras de maíz del estado de Sonora, encontraron un 96% de incidencia de *A. flavus* cepas L y un 4% para *A. flavus* cepas S. Estos datos sugieren que la incidencia de cepas con esclerocios grandes se presenta en proporción de porcentajes similares a las obtenidas. Se ha relacionado el tamaño de los esclerocios con la capacidad aflatoxigénica de las diferentes poblaciones de *A. flavus*.

En los resultados obtenidos en este estudio se encontró un aislado de ensilaje de maíz (EM1) negativo a la producción de aflatoxina, aunque con esclerocios menores a $400 \mu\text{m}$ y con identificación molecular del gen *afIR*. También, un aislado de alimento concentrado (AC3) se clasificó como positivo a la producción de aflatoxinas, aunque no produjo esclerocios y el resto de los aislados se clasificaron como cepas L y positivos a la producción de aflatoxinas.

Es importante destacar que la capacidad aflatoxigénica de los aislados *A. flavus* identificados en este estudio fue caracterizada con TLC y vapores de amonio en agar coco, las cuales son técnicas cualitativas que nos permite observar la presencia de aflatoxinas incorporadas por los cultivos micóticos^(35,36).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Análisis molecular

Todas las 25 secuencias obtenidas de los aislados identificados morfológicamente como *A. flavus* mostraron un gran porcentaje de identidad (> 90%) con secuencias registradas de cepas *A. flavus*. También se obtuvieron fragmentos amplificados para el gen *CaM* de 468 pb, para el gen *aflR* de 796 pb y para los ITS con un rango de 600-800 pb (ITS1-5.8S-ITS2). Se ha señalado que la región rADN de los espaciadores internos de la transcripción es el código de barras oficial de ADN para hongos porque es el marcador secuenciado con mayor frecuencia y es una herramienta de gran utilidad para la descripción de especies de *A. flavus*⁽¹³⁾. También se ha referido que el gen *CaM* es capaz de distinguir entre casi todas las especies de *Aspergillus*⁽¹³⁾. Por otra parte, el gen *aflR* es necesario para la transcripción de la mayoría de los genes involucrados en la activación de las reacciones enzimáticas necesarias para la formación de las aflatoxinas^(46,47,48). Con base a lo anterior este trabajo integra la identificación molecular a la identificación morfológica de seis aislamientos de *A. flavus* obtenidos de la cadena productiva lechera en la región del Altiplano Central Mexicano.

Capacidad aflatoxigénica

Los 6 aislados identificados como *A. flavus* se evaluaron con TLC y vapores de amonio en agar coco para identificar su capacidad de producir aflatoxinas, 5 se clasificaron como aflatoxigénicos y uno se clasificó como negativo a la producción de aflatoxinas. Estos resultados mostraron un comportamiento similar a los obtenidos en un estudio realizado en Sonora, México⁽¹⁵⁾; de las 405 colonias aisladas de *Aspergillus spp.* 387 mostraron capacidad aflatoxigénica y sólo 4.7 % fueron negativas a la producción de aflatoxinas.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Esta proporción de cepas no toxigénicas coincide con otro estudio⁽⁴³⁾ realizado en la región norte de México en la que identificaron aislamientos de *A. flavus* relacionados genéticamente con *A. flavus* AF-36. Esta cepa no aflatoxigénica ha sido empleada en el desarrollo de estrategias de control biológico para reducir la producción de aflatoxinas de cepas aflatoxigénicas en campos productores de algodón⁽²²⁾. Lo anterior sugiere la existencia de una población de *A. flavus* en México compuesta mayoritariamente por cepas aflatoxigénicas, aunque aún no esté caracterizada completamente. En otros países se ha logrado la identificación de nuevas especies aflatoxigénicas de *A. flavus*, en insectos y suelos de EUA⁽²⁸⁾ se lograron aislar e identificar molecularmente dos nuevas especies de *Aspergillus* aflatoxigénico

En siete provincias de Irán⁽³⁵⁾ se logró el aislamiento de 681 colonias de *Aspergillus* sección Flavi en muestras de pistache (n=205) y suelo (n= 20); de estos aislamientos, 76.9 % fueron identificados como *A. flavus* y la mayoría (62.5-92.9%) fueron aflatoxigénicos, según la provincia de origen.

Lo anterior sugiere que las cepas de *A. flavus* se distribuyen alrededor del mundo y su incidencia es mayor en ecosistemas agrícolas; sin embargo, en México son escasos los reportes oficiales sobre la incidencia y distribución de las diferentes cepas de *A. flavus* y la investigación sobre poblaciones indígenas de hongos aflatoxigénicos se limita a la identificación morfológica de los géneros y a la presencia de aflatoxinas en alimentos.

Aflatoxinas detectadas en pienso y en leche

El 99.3% (286/288) de las muestras de alimento de las vacas lecheras presentaron niveles detectables de AF ($18.5 \pm 3.7 \mu\text{g}/\text{kg}$) de las cuales el 10.4% sobrepasaron los límites máximos permisibles por la legislación

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mexicana (20 µg/kg). En establos de Jalisco y Aguascalientes⁽⁴⁹⁾, encontraron que el 92% de las 43 muestras analizadas estaban contaminadas con AF y las concentraciones promedio detectadas de aflatoxinas en la ración total mezclada promediaron 10.8 ± 5.8 µg/kg; el 9.3% de las muestras sobrepasaron los límites máximos permisibles (20 µg/kg).

En muestras de alimento de origen asiático⁽⁵⁰⁾, encontraron concentraciones de AF (14.7-11.4 µg/kg), en las cuales no se encontró presencia de hongos *Aspergillus* aflatoxigénicos. En 133 muestras de piensos balanceados producidos en México⁽⁸⁾ se detectaron concentraciones de aflatoxina en el 45.1% de las muestras.

En este estudio, el 39.9% (73/183) de las muestras de leche cruda mostraron la presencia de AFM₁. En México se han reportado la incidencia de AFM₁ en el 80% de las muestras analizadas de leche cruda de vaca⁽⁹⁾. En otro estudio⁽¹⁰⁾ se reportó que todas las muestras analizadas tenían niveles detectables de AFM₁. En diversos países también se han identificado altas incidencias de AFM₁ en la leche destinada al consumo humano, en Cataluña, España⁽⁵¹⁾ detectaron AFM₁ en el 94.4% de las muestras de leche analizadas; en Brasil se reportó una incidencia del 95.2% en el año 2009⁽⁵²⁾ y del 67% en el 2011⁽⁵³⁾. La contaminación de alimento por aflatoxinas destinado al consumo humano y animal se ha convertido en una de las mayores problemáticas de salud pública a nivel mundial⁽⁵⁴⁾.

En este estudio se mostró una asociación del nivel de producción de leche de las vacas con la cantidad y de la concentración de AFM₁ eliminada en la leche, de tal forma que las vacas altas productoras consumieron una mayor cantidad de alimento y se expusieron a cantidades más grandes de aflatoxinas en su

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

pienso; por consiguiente, fue mayor la cantidad total, así como la concentración en la leche cruda ($P < 0.05$). Se ha señalado que la tasa de eliminación de AFM₁ en leche se ve influenciada por la cantidad de RTM ingerida al día por cada animal, la cantidad de leche que produce al día y la etapa de lactación en la que se encuentra⁽⁵⁵⁾.

Conclusión

En este estudio se demostró morfológica, toxicológica y molecularmente la ocurrencia de *A. flavus* en ensilaje de maíz y en la ración total mezclada, lo cual condujo a la contaminación por aflatoxinas de casi la totalidad de las dietas de las vacas lecheras, así como a la presencia residual de AFM₁ en la leche cruda. Las vacas lecheras lograron metabolizar y eliminar por vías diferentes a la leche más del 99% de las aflatoxinas presentes en su dieta.

Agradecimientos.- Se reconoce el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (Proyecto Ciencia Básica: 178546 y Beca 514818) y de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (proyecto PIP / SA 15-1). Se agradece el apoyo técnico de Araceli Adabache Ortiz y Marcelo Silva Briano.

Declaración de los autores.- Los autores declaran que no existe ningún conflicto de interés potencial con respecto a la presente investigación, autoría y / o publicación de este artículo.

Referencias

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

- 1.OECD-FAO. Organisation for Economic Co-operation and Development /Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agricultural Outlook 2015. Paris, OECD Publishing, 2015.
- 2.Domínguez-Domínguez O, Pérez-Ponce de León G. ¿La mesa central de México es una provincia biogeográfica? Análisis descriptivo basado en componentes bióticos dulceacuícolas. Rev Mex Biodivers 2009;80(3):835–52.
- 3.INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Perspectiva Estadística Aguascalientes. Aguascalientes, México; 2011.
- 4.Romo CE, Valdivia AG, Carranza RG, Camara J, Zavala MP, Flores E, et al. Brechas de rentabilidad económica en pequeñas unidades de producción de leche en el altiplano central mexicano. Rev Mex Cienc Pecu 2014;5(3):273–89.
- 5.Rahimi E, Bonyadian M, Rafei M, Kazemeini HR. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. Food Chem Toxicol 2010;48(1):129–31.
- 6.FAO. Food and Agriculture Organization. Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de peligros y de puntos críticos en la prevención y control de las micotoxinas. Estudio FAO Alimentación y Nutrición 73. Roma, 2003.
- 7.IARC. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 82. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans II. Lyon, Press, 2002.
- 8.Flores CM, Hernández LB, Vázquez J. Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003. Rev Mex Cienc Pecu 2006;44(2):247–56.

9. Pérez J, Gutiérrez R, Vega S, Díaz G, Urbán G, Coronado M, et al.

Ocurrencia de aflatoxina M1 en leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica producidas y comercializadas en el Altiplano Mexicano. *Rev Salud Anim* 2008;30(2):103–109.

10. Landeros P, Noa M, López Y, González DG, Noa E, Real M, et al. Niveles de aflatoxina M1 en leche cruda y pasteurizada comercializada en la zona metropolitana de Guadalajara, México. *Rev Salud Anim* 2012;34(1):40–45.

11. Reyes-Velázquez WP, Espinoza VHI, Rojo F, Jiménez-Plasencia C, Palacios EDL, Hernández-Góborra J, et al. Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, Mexico. *Rev Iberoam Micol* 2008;25(3):182–5.

12. Gross-Steinmeyer K, Eaton DL. Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B1. *Toxicology* 2012;299(2-3):69–79.

13. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* 2014;78:141–173.

14. Hernández-Delgado S, Reyes-López MÁ, García-Olivares JG, Mayek-Pérez N, Reyes-Méndez CA. Incidencia de hongos potencialmente toxígenos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Rev Mex Fitopatol* 2007;25(2):127–133.

15. Ortega-Beltrán A, Jaime R, Cotty PJ. Aflatoxin-producing fungi in maize field soils from sea level to over 2000 masl: A three year study in Sonora, Mexico. *Fungal Biol-Uk* 2015;119(4):191–200.

16. Raper KB, Fennell DI. *The Genus Aspergillus*. Baltimore, USA: Williams & Wilkins;1965.

17. Peterson SW. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* 2008;100(2):205–26.
18. Frisvad JC, Larsen TO. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. *Appl Microbiol Biot* 2015;99(19):7859–77.
19. Varga J, Szigeti G, Baranyi N, Kocsubé S, O’Gorman CM, Dyer PS. *Aspergillus*: sex and recombination. *Mycopathologia* 2014;178(5-6):349–362.
20. Klich MA. Identification of common *Aspergillus* species. First edition. Louisiana, USA: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands; 2002.
21. Bayman P, Cotty PJ. Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: association with aflatoxin production and morphology. *Can J Bot* 1993;71(1):23–31.
22. Ehrlich KC, Cotty PJ. An isolate of *Aspergillus flavus* used to reduce aflatoxin contamination in cottonseed has a defective polyketide synthase gene. *Appl Microbiol Biot* 2004;65(4):473–8.
23. Cotty PJ, Jaime-Garcia R. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *Int J Food Microbiol* 2007;119(1-2):109–15.
24. Cheli F, Campagnoli A, Dell’Orto V. Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. *Anim Feed Sci Tech* 2013;183(3):1–16.
25. Geiser DM, Pitt JI, Taylor JW. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *P Natl Acad Sci USA* 1998;95(1):388–93.
26. Ehrlich KC, Montalbano BG, Cotty PJ. Sequence comparison of aflR from different *Aspergillus* species provides evidence for variability in regulation of aflatoxin production. *Fungal Genet Biol* 2003;38(1):63–74.

27. Reis TA, Baquião AC, Atayde DD, Grabarz F, Corrêa B. Characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from organic Brazil nuts using a polyphasic approach. *Food Microbiol* 2014;42:34–9.
28. Varga J, Frisvad JC, Samson RA. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Stud Mycol* 2011;69:57–80.
29. Yu J. Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins* 2012;4(11):1024–1057.
30. EUM-SS; Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002. Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. *Diario Oficial de la Federación, Primera Sección* (15–10–2002): 22–41. 2002.
31. Scott PM. Natural toxins. *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemistry*. 1995;49: 1–30.
32. Iheanocho HE, Njobeh PB, Dutton FM, Steenkamp PA, Steenkamp L, Mthombeni JQ, et al. Morphological and molecular identification of filamentous *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolated from compound feeds in South Africa. *Food Microbiol* 2014;44:180–4.
33. Kumar V, Singh GP, Babu AM. Surface ultrastructural studies on the germination, penetration and conidial development of *Aspergillus flavus* Link: Fries infecting silkworm, *Bombyx mori* Linn. *Mycopathologia* 2004;157(1):127–35.
34. de Luna-López MC, Valdivia-Flores AG, Jaramillo-Juárez F, Reyes JL, Ortiz-Martínez R, Quezada-Tristán T. Association between *Aspergillus flavus*

colonization and aflatoxins production in immature grains of maize genotypes
J Food Sci Eng. 2013;3(12):688–98.

35. Fani SR, Moradi M, Probst C, Zamanizadeh HR, Mirabolfathy M, Haidukowski M, et al. A critical evaluation of cultural methods for the identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates for aflatoxin mitigation in pistachio orchards of Iran. *Eur J Plant Pathol* 2014;140(4):631–42.
36. Saito M, Machida S. A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience* 1999;40(2):205–208.
37. Hoffman CS, Winston F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 1987;57(2-3):267–272.
38. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal Ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ editors. *PCR protocols: a guide to methods and application* New York, USA. Academic Press;1990:315–322.
39. Shapira R, Paster N, Eyal O, Menasherov M, Mett A, Salomón R. Detection of aflatoxinogenic molds in grains by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1996;62: 3270-3273.
40. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(12): 5463–5467.
41. Montes GN, Reyes MCA, Montes RN, Cantu AMA. Incidence of potentially toxigenic fungi in maize (*Zea mays* L.) grain used as food and animal feed. *CyTA-J Food* 2009;7(2):119–25.

42. Martínez HY, Hernández S, Reyes CA, Vázquez G. El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Rev Mex Fitopatol* 2013;31(2):126–146.
43. Ortega-Beltran A, Grubisha LC, Callicott KA, Cotty PJ. The vegetative compatibility group to which the US biocontrol agent *Aspergillus flavus* AF36 belongs is also endemic to Mexico. *J Appl Microbiol* 2016;120(4):986–98.
44. Cotty PJ. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology* 1989;79(7):808–14.
45. Probst C, Bandyopadhyay R, Cotty PJ. Diversity of aflatoxin-producing fungi and their impact on food safety in sub-Saharan Africa. *Int J Food Microbiol* 2014;174:113–22.
46. Yu J, Chang PK, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, et al. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(3):1253–1262.
47. Bhatnagar D, Cary JW, Ehrlich K, Yu J, Cleveland TE. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia* 2006;162(3):155–66.
48. Amare MG, Keller NP. Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. *Fungal Genet Biol* 2014;66(3):11–8.
49. Reyes W, Martínez SP, Isaías VH, Nathal MA, De Lucas E, Rojo F. Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM1 en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. *Rev Mex Cienc Pecu* 2009;47(2):223–30.

50. Ruadrew S, Craft J, Aidoo K. Occurrence of toxigenic *Aspergillus* spp. and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin sourced in the West of Scotland. *Food Chem Toxicol* 2013;55:653–658.
51. Cano-Sancho G, Marin S, Ramos AJ, Peris-Vicente J, Sanchis V. Occurrence of aflatoxin M1 and exposure assessment in Catalonia (Spain). *Rev Iberoam Micol* 2010;27:130–5.
52. Shundo L, Navas SA, Lamardo LCA, Ruvieri V, Sabino M. Estimate of aflatoxin M1 exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control* 2009;20(7):655–657.
53. Iha MH, Barbosa CB, Okada IA, Trucksess MW. Occurrence of aflatoxin M1 in dairy products in Brazil. *Food Control* 2011;22(12):1971–4.
54. Alonso VA, Pereyra CM, Keller LAM, Dalcero AM, Rosa CAR, Chiacchiera SM, et al. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *J Appl Microbiol* 2013;115:637–43.
55. Masoero F, Gallo A, Diaz D, Piva G, Moschini M. Effects of the procedure of inclusion of a sequestering agent in the total mixed ration on proportional aflatoxin M1 excretion into milk of lactating dairy cows. *Anim Feed Sci Tech* 2009;150(1-2):34–45.

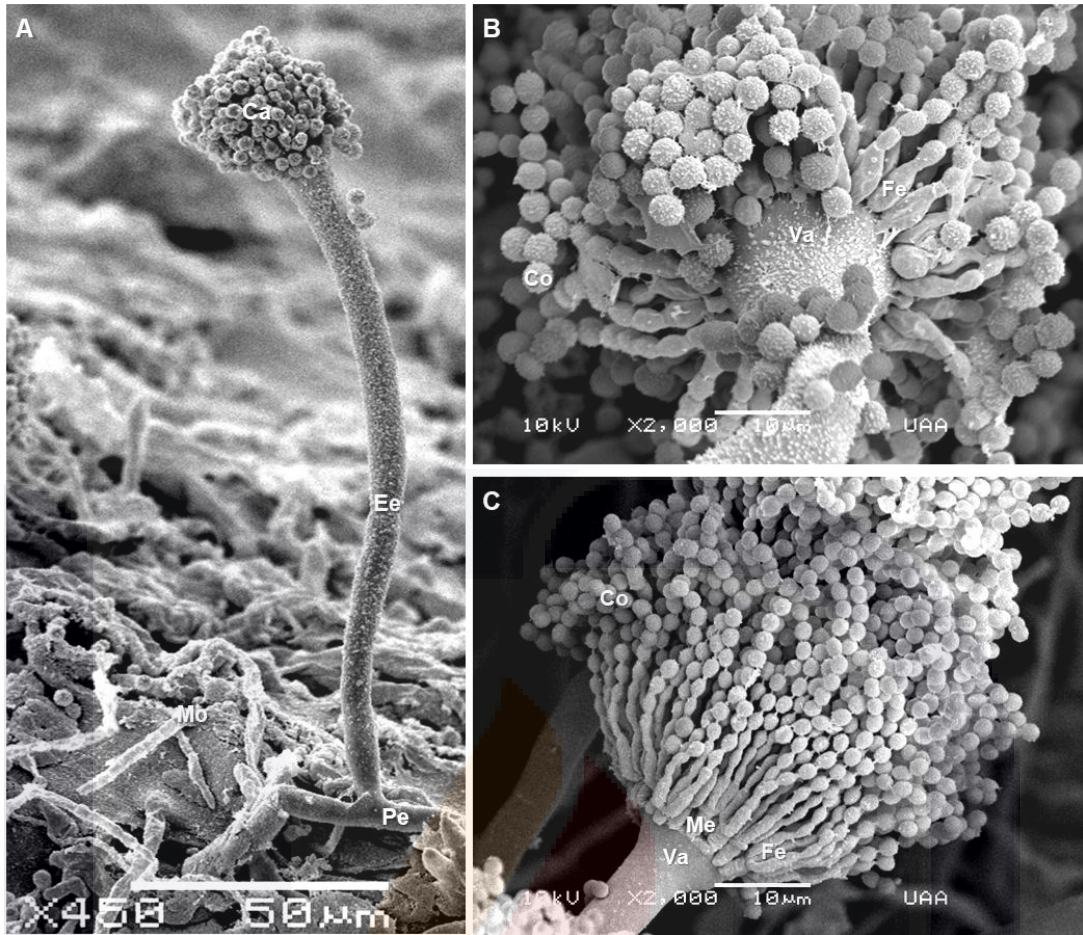


Figura 1: Estructuras morfológicas del género *Aspergillus*. Páneos: **A)** Conidióforo: Cc = Cabeza conidial, Ee = Estípite, Pe = Célula pie, Mo = Micelio. **B)** Cabeza conidial uniseriada: Co = Conidio o espora; Fe = Fiálide, Va = Vesícula. **C)** Cabeza conidial biseriada: Co = Conidio, Fe = Fiálide, Va = Vesícula, Me = Métula.

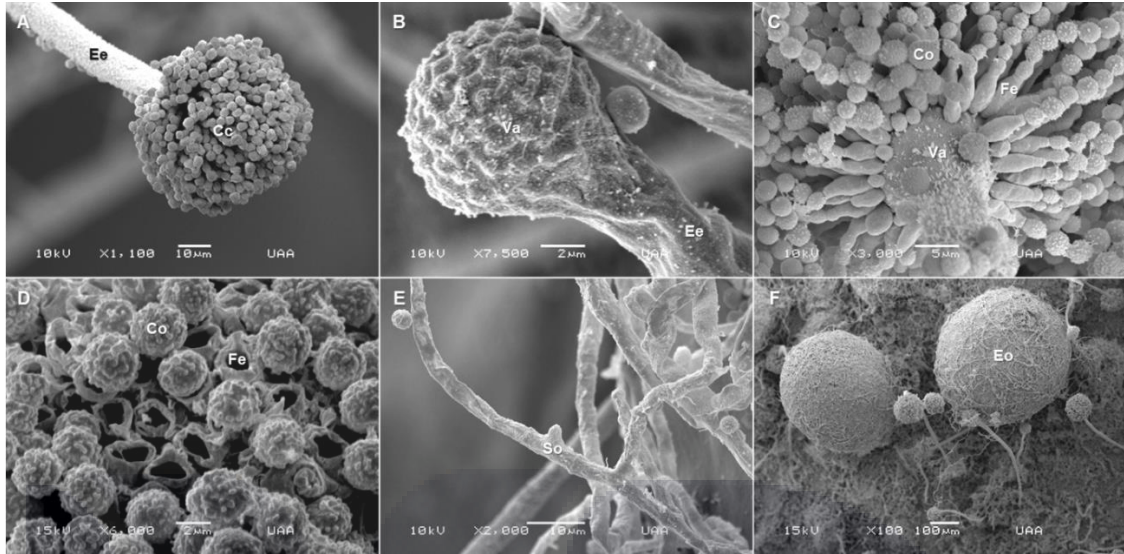


Figura 2: Estructuras morfológicas de *Aspergillus flavus*. Páneles: **A)** Cc = cabeza conidial, Ee = estípite. **B)** Va = vesícula. **C)** conidióforo. Fe = fiálides, Co = conidio. **D)** Cc = conidio, Fe = fiálide. **E)** Mo = micelio, So = septo. **F)** Esclerocio = Eo.

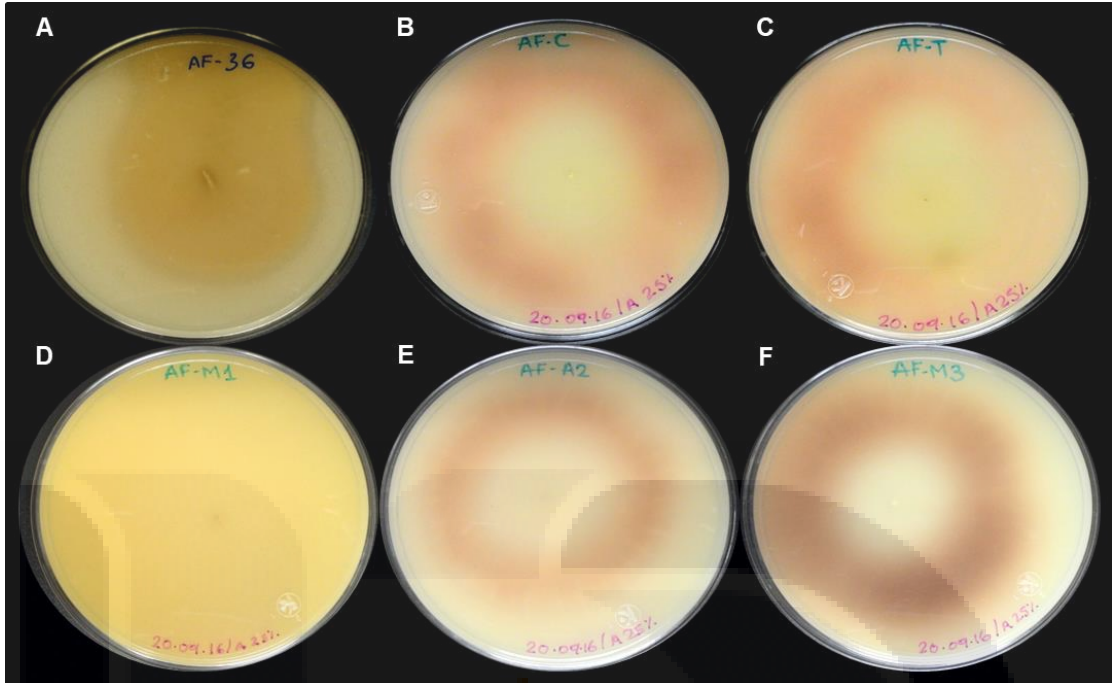


Figura 3: Intensidad de color en medio agar coco al contacto con vapores de amonio de aislamientos *Aspergillus flavus* a los 4 días de crecimiento. Panel: **A)** AF-36, no aflatoxigénico (AF⁻). **B)** AF-Cuatitlán y **C)** AF-Tamaulipas, aflatoxigénico (AF⁺). **D)** AF-EM1, AF⁻ aislado de ensilaje de maíz. **E)** AF-AC2, AF⁺ aislado de alimento concentrado. **F)** AF-EM3, AF⁺ aislado de ensilaje de maíz.

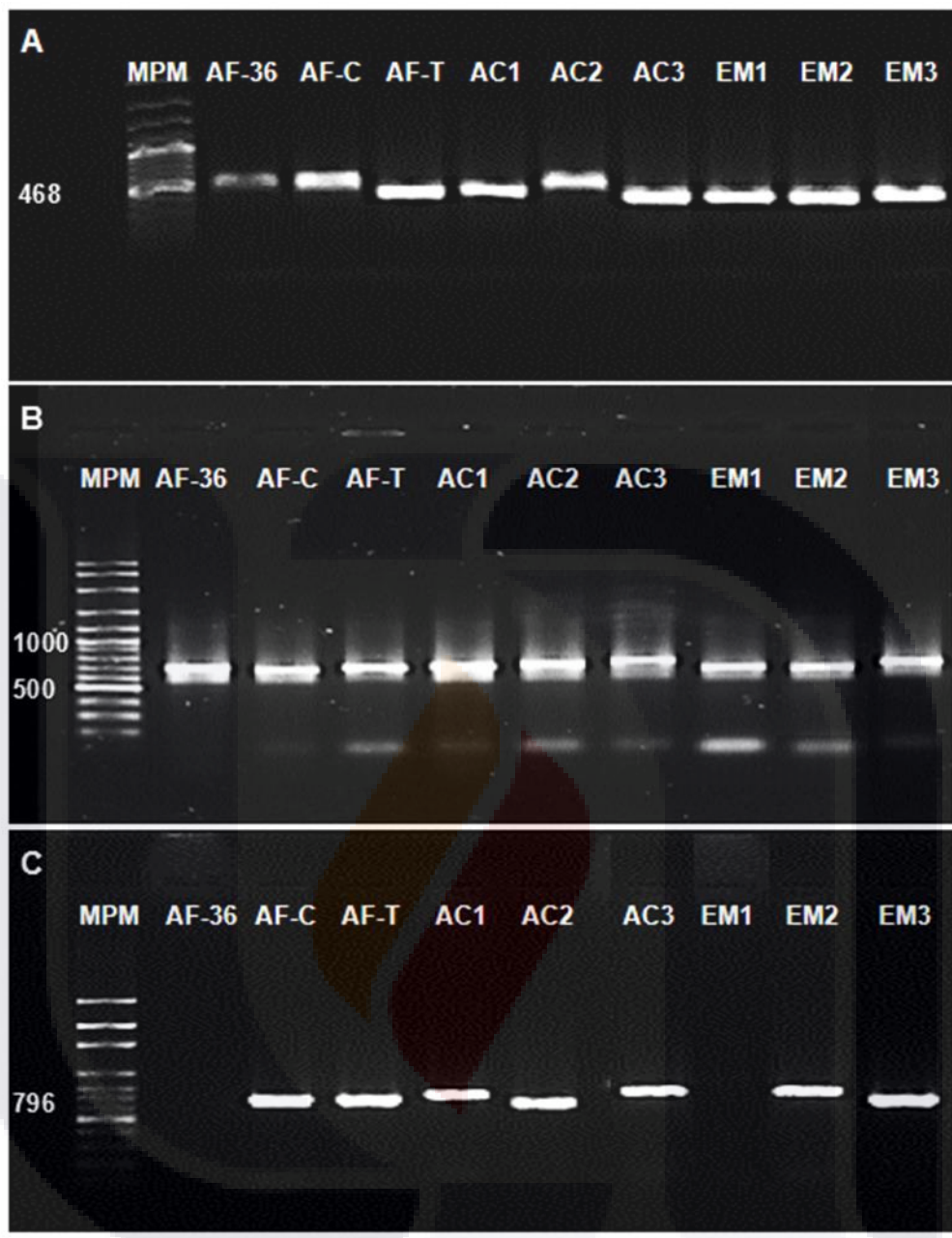


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados del gen calmodulina (Panel A), región de espaciadores internos de la transcripción 5.8S rDNA-ITS2 (Panel B) y gen regulador de la ruta biosintética de aflatoxinas, *aflR* (Panel C). Carriles: MPM) Marcador de peso molecular (100pb). Controles: A. *flavus* no aflatoxigénico (AF-36) y aflatoxigénicos (Cuautitlán, AF-C; Tamaulipas, AF-T). A. *flavus* aislados de ensilaje de maíz (EM1, EM2 y EM3) y de alimento concentrado (AC1, AC2 y AC3) destinado a las vacas lecheras.

Cuadro 1: Géneros fúngicos identificados en muestras mensuales * de una Unidad Productora Lechera en el Altiplano Central Mexicano

Género	Suelo		Ensilaje de maíz		Alimento concentrado		Ración total mezclada		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Muestras	40	--	96	--	96	--	96	--	328	--
<i>Aspergillus</i>	30	24.6	16	42.1	19	32.8	23	35.4	88	31.1
<i>Penicillium</i>	23	18.9	3	7.9	4	6.9	9	13.8	39	13.8
<i>Fusarium</i>	20	16.4	3	7.9	11	19.0	2	3.1	36	12.7
<i>Rhizopus</i>	15	12.3	4	10.5	7	12.1	8	12.3	34	12.0
<i>Mucor</i>	15	12.3	6	15.8	4	6.9	9	13.8	34	12.0
<i>Cladosporium</i>	5	4.1	4	10.5	10	17.2	10	15.4	29	10.2
<i>Trichoderma</i>	10	8.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0	10	3.5
<i>Alternaria</i>	4	3.3	2	5.3	1	1.7	2	3.1	9	3.2
<i>Curvularia</i>	0	0.0	0	0.0	2	3.4	1	1.5	3	1.1
<i>Bipolaris</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	1.5	1	0.4
Total	122	100	38	100	58	100	65	100	283	100

* Muestras de ingredientes alimenticios: 24 meses, por cuadruplicado. Muestras de suelo: 5 parcelas, por cuadruplicado, 2 temporadas.

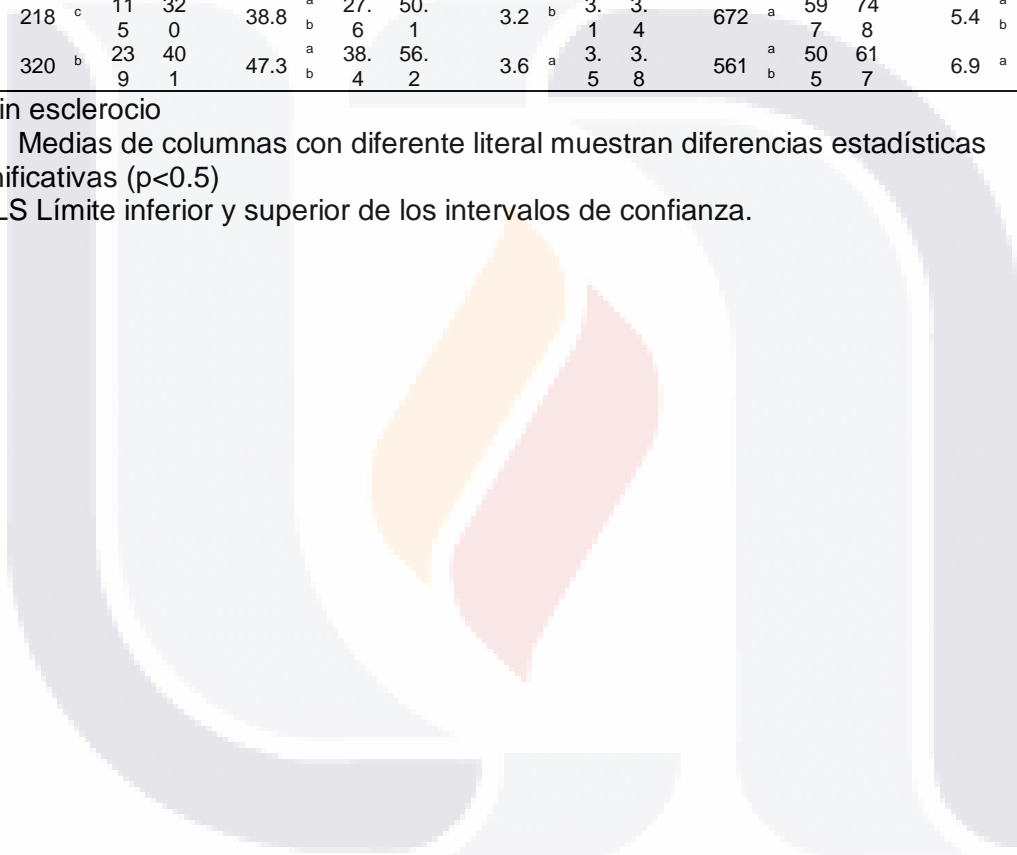
Cuadro 2: Comparación de las dimensiones de las estructuras morfológicas de aislados de *Aspergillus flavus* obtenidos de ensilaje de maíz (EM) y alimento (AC) integral de vacas lecheras, así como de las cepas Cuautitlán (C) y Tamaulipas (T).

Aislado	Estípote			Vesícula			Espora			Esclerocio			Fiálide		
	Medi a	LI	LS	Medi a	LI	LS	Medi a	LI	LS	Medi a	LI	LS	Medi a	LI	LS
AF-C	237 ^c	18 3	29 1	33.6 ^c	27. 5	39. 7	3.3 ^b	3. 1	3. 4	418 ^c	35 3	48 3	5.9 ^a	4. 9	6. 9
AF-T	646 ^a	56 4	72 7	76.6 ^a	67. 7	85. 5	2.8 ^c	2. 7	2. 9	453 ^b	36 1	54 5	6.4 ^a	4. 9	7. 8
AF- AC1	313 ^a	24 1	38 6	54.3 ^b	46. 3	62. 2	3.1 ^b	3. 0	3. 3	592 ^a	51 6	66 7	5.1 ^b	4. 4	5. 8
AF- AC2	373 ^b	29 2	45 4	58.2 ^b	49. 3	67. 0	3.0 ^b	2. 8	3. 1	428 ^c	35 2	50 3	5.1 ^b	4. 3	5. 8
AF- AC3	441 ^a	34 7	53 4	47.8 ^b	37. 5	58. 0	3.1 ^b	2. 9	3. 3	--	--	--	6.6 ^a	5. 5	7. 7
AF- EM1	331 ^b	25 5	40 7	50.5 ^b	42. 1	58. 8	3.5 ^a	3. 4	3. 7	268 ^d	19 3	34 4	4.8 ^b	4. 1	5. 5
AF- EM2	218 ^c	11 5	32 0	38.8 ^b	27. 6	50. 1	3.2 ^b	3. 1	3. 4	672 ^a	59 7	74 8	5.4 ^a	4. 1	6. 6
AF- EM3	320 ^b	23 9	40 1	47.3 ^b	38. 4	56. 2	3.6 ^a	3. 5	3. 8	561 ^a	50 5	61 7	6.9 ^a	6. 0	7. 9

-- Sin esclerocio

a-d Medias de columnas con diferente literal muestran diferencias estadísticas significativas ($p < 0.5$)

LI, LS Límite inferior y superior de los intervalos de confianza.



Cuadro 3: Identidad de los aislados de *Aspergillus flavus* obtenidos de las dietas alimenticias para vacas lecheras en Aguascalientes, México, al compararlos con secuencias existentes en el Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI)^a

ID del Aislado	Origen	Iniciador ^b	Clave de accesoión	Coincidencia (%)
Control ⁻ AF-36	Control	ITS1	LN482513.1	99
		ITS4	KX550912.1	98
Control ⁺ C (AHY255)	Maíz (Cuatitlán)	CMDA7F	AY974341.1	98
		CMDA8R	AY974340.1	96
		ITS1	LC105688.1	100
		ITS4	KT254587.1	99
		AFLRF	FN398160.1	100
		AFLRR	L32576.1	100
Control ⁺ T (AHY256)	Maíz (Tamaulipas)	ITS1	KX015990.1	100
		ITS4	KF221065.1	99
		AFLRF	XM_002379905.1	100
		AFLRR	AF441435.2	99
		ITS1	KF434090.1	100
		ITS4	KF434090.1	99
AC1 (AHY257)	Alimento Concentrado	AFLRF	AF441434.1	100
		AFLRR	XM_002379905.1	99
		CMDA7F	AY974341.1	99
		ITS4	XM_002379905.1	99
AC2 (AHY258)	Alimento Concentrado	ITS1	KM285408.1	100
		ITS4	EF409812.1	95
		AFLRF	XM_002379905.1	100
		AFLRR	FN398160.1	93
AC3 (AHY259)	Alimento Concentrado	CMDA7F	XM_002374071.1	99
		CMDA8R	XM_002379905.1	99
		ITS1	KF434090.1	99
		ITS4	KT356196.1	97
		AFLRF	AF441435.2	99
		AFLRR	AF441434.1	99
EM1 (AHY195)	Ensilaje de Maíz	CMDA7F	AY510451.1	95
		CMDA8R	XM_002374071.1	100
		ITS1	HQ010119.1	99
		ITS4	KX641192.1	99
EM2 (AHY203)	Ensilaje de Maíz	AFLRF	MH752566.1	100
		AFLRR	KY769955.1	100
		ITS4	KT356196.1	98
		ITS1	LN482513.1	100
EM3 (AHY204)	Ensilaje de Maíz	CMDA7F	XM_002374071.1	100
		CMDA8R	XM_002374071.1	100
		AFLRF	L32577.1	100
		AFLRR	MH752564.1	100
		ITS1	KX572367.1	99
		ITS4	KT356196.1	99

^a NCBI (National Center for Biotechnology Information): <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

^b **CMDA** = calmodulina; **ITS** = espaciadores internos de la transcripción; **AFLR** = regulador de la ruta biosintética; **R** = reversa; **F** = hacia adelante.

Cuadro 4: Exposición promedio (\pm EE) de las vacas lecheras a la contaminación natural por aflatoxinas en la ración total mezclada (RTM y ingestión promedio de AFM₁ por lote productivo

Lote	Vacas (No)	Producción de leche (kg/vaca/día)	RTM (kg/vaca/día)	Ingestión AF (μg/vaca/día)	Eliminación AFM ₁		
					(μg/kg)	(μg/vaca/día)	(%)
Altas	1760	32.0 ^a	44.7 ^a	658 ^a \pm 97.0	0.024 _a \pm 0.005	0.72	0.11
Medias	606	20.2 ^b	36.4 ^c	546 ^a \pm 83.4	0.022 _a \pm 0.005	0.44	0.08
Bajas	388	14.8 ^c	38.4 ^b	568 ^a \pm 82.6	0.015 _b \pm 0.004	0.22	0.04
Total	2754	28.0	42.0	621 \pm 92.0	0.021 \pm 0.005	0.58	0.09

^{a-b} Literales diferentes indican diferencia significativa entre lotes productivos P<0.05.

