



CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRONÓMICAS Y VETERINARIAS

Tesis:

**MODELO DE MICROENSILAJE PARA LA EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LA  
CONTAMINACIÓN DEL ENSILAJE DE MAÍZ CON AFLATOXINAS**

Presenta:

**ING. ALBERTO RANGEL MUÑOZ**

Para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

Comité Tutoral:

**DR. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES (TUTOR)**

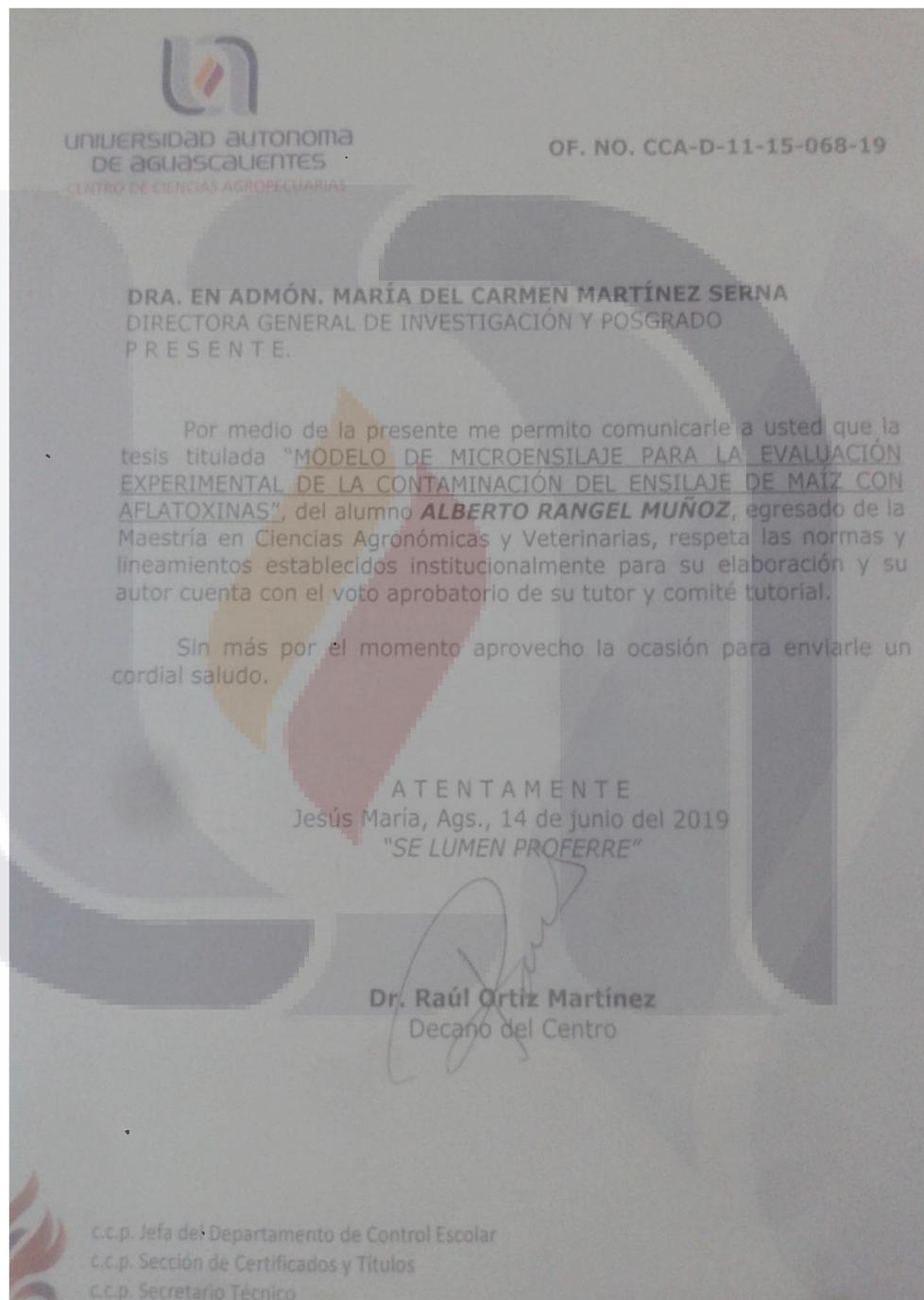
**DR. TEÓDULO QUEZADA TRISTÁN**

**M. C. AMALIO PONCE MONTOYA**

**DR. JOSÉ DE JESÚS LUNA RUIZ**

**Aguascalientes, Ags, 5 de junio del 2019**

**AUTORIZACIONES**





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**Dr. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ**  
DECANO DEL CENTRO DE AGROPECUARIAS  
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del egresado **ALBERTO RANGEL MUÑOZ** con ID 217616, quien realizó la tesis titulada: **MODELO DE MICROENSILAJE PARA LA EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LA CONTAMINACIÓN DEL ENSILAJE DE MAÍZ CON AFLATOXINAS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir mi **VOTO APROBATORIO**, para que él 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 junio de 2019

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'AG'.

**Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores**  
Tutor de tesis

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





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**Dr. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ**  
DECANO DEL CENTRO DE AGROPECUARIAS  
P R E S E N T E

Por medio del presente como integrante del Comité Tutorial designado del egresado **ALBERTO RANGEL MUÑOZ** con ID 217616, quien realizó la tesis titulada: **MODELO DE MICROENSILAJE PARA LA EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LA CONTAMINACIÓN DEL ENSILAJE DE MAÍZ CON AFLATOXINAS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir mi **VOTO APROBATORIO**, para que él 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 junio de 2019

**DR. TEÓDULO QUEZADA TRISTÁN**  
Integrante del Comité Tutorial de tesis

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





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**Dr. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ**  
DECANO DEL CENTRO DE AGROPECUARIAS  
P R E S E N T E

Por medio del presente como integrante del Comité Tutorial designado del egresado **ALBERTO RANGEL MUÑOZ** con ID 217616, quien realizó la tesis titulada: **MODELO DE MICROENSILAJE PARA LA EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LA CONTAMINACIÓN DEL ENSILAJE DE MAÍZ CON AFLATOXINAS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir mi **VOTO APROBATORIO**, para que él 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 junio de 2019

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'José de Jesús Luna Ruiz'.

**DR. JOSÉ DE JESÚS LUNA RUIZ**  
Integrante del Comité Tutorial de tesis

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





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**Dr. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ**  
DECANO DEL CENTRO DE AGROPECUARIAS  
P R E S E N T E

Por medio del presente como integrante del Comité Tutorial designado del egresado **ALBERTO RANGEL MUÑOZ** con ID 217616, quien realizó la tesis titulada: **MODELO DE MICROENSILAJE PARA LA EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LA CONTAMINACIÓN DEL ENSILAJE DE MAÍZ CON AFLATOXINAS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir mi **VOTO APROBATORIO**, para que él 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 junio de 2019

**M. C. AMALIO PONCE MONTOYA**  
Integrante del Comité Tutorial de tesis

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



## 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. TEÓDULO QUEZADA TRISTÁN (Centro de Ciencias Agropecuarias, UAA)
- Dr. JOSÉ DE JESÚS LUNA RUIZ (Centro de Ciencias Agropecuarias, UAA)
- M. C. AMALIO PONCE MONTOYA (Centro de Ciencias Agropecuarias, UAA)

Por su asesoría para la realización de las técnicas analíticas:

- Dra. María Carolina de Luna López, (Laboratorio de Investigación, Centro de Ciencias Agropecuarias, UAA)
- M. en C. Erika Janet Rangel Muñoz (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).
- Dr. Carlos Cruz Vázquez (Instituto Tecnológico El Llano)
- Dr. Teóduo Quezada Tristán (Centro de Ciencias Agropecuarias, UAA).
- Dr. Raúl Ortíz Martínez (Centro de Ciencias Agropecuarias)
- 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.

## DEDICATORIA

A Dios, que me permitió realizar este trabajo y me puso en el camino de la investigación.

Con todo mi amor, gratitud y admiración a las dos personas más 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 todo mi amor y gratitud a mi esposa e hijo: ***Shaira María Y Roberto***

Con un cariño único y eterno, a mis hermanos: ***Juan José, Víctor Hugo, Gerardo, Maribel, Erika Janet, María Guadalupe, 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.*** Porque le dan alegría fresca a la familia, mantienen encendida la luz de la esperanza y me refrescan la vida con su paz.

## Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	15
DEDICATORIA .....	16
RESUMEN.....	20
ABSTRACT .....	23
INTRODUCCIÓN.....	24
1. ANTECEDENTES.....	26
1.1. EL MAÍZ .....	26
1.1.1. <i>Ciclo de vida</i> .....	26
1.1.2. <i>Condiciones ambientales</i> .....	27
1.1.3. <i>Producción nacional y local</i> .....	27
1.1.4. <i>Fenología del maíz</i> .....	28
1.1.5. <i>Ensilaje</i> .....	29
1.1.6. <i>Fases del ensilaje</i> .....	30
1.1.7. <i>Microsilos</i> .....	31
1.1.8 EXAMEN BROMATOLÓGICO DE ENSILAJES DE MAÍZ.....	32
1.1.8.1. <i>Humedad y materia seca</i> .....	32
1.1.8.2 <i>Extracto etéreo o grasa cruda</i> .....	33
1.1.8.3 <i>Determinación de proteína cruda</i> .....	33
1.1.8.4 <i>Determinación de cenizas o materia inorgánica</i> .....	33
1.1.8.5 <i>Determinación de fibra cruda o bruta</i> .....	33
1.2. LA GANADERÍA LECHERA .....	34
1.2.1. <i>La actividad lechera en México</i> .....	35
1.2.2. <i>Estados productores de leche</i> .....	36
1.2.3. <i>Alimentación del ganado lechero</i> .....	36
1.2.4. <i>Dieta para el ganado lechero</i> .....	38
1.3. HONGOS AFLATOXICOGÉNICOS .....	41
1.3.1. <i>Género Aspergillus</i> .....	41
1.3.2. <i>Aspergillus sección flavi</i> .....	43
1.3.3. <i>Aspergillus flavus</i> .....	43
1.3.4. <i>Condiciones para el crecimiento de hongos Aspergillus</i> .....	43
1.3.4.1. <i>Actividad de agua (aw)</i> .....	44
1.3.4.2. <i>Concentración de iones hidrógeno (pH)</i> .....	44
1.3.4.3. <i>Temperatura</i> .....	44

1.4. AFLATOXINAS .....	45
1.4.1. <i>Importancia de las aflatoxinas en el ámbito agropecuario</i> .....	47
1.6. NIVELES MÁXIMOS PERMISIBLES DE AFLATOXINAS EN ALIMENTO .....	48
1.6.1 <i>Legislación de la Unión Europea (UE) Alimentos para animales</i> .....	48
1.6.2 <i>Norma Oficial Mexicana (NOM-188-SSA1-2002)</i> .....	48
1.7. MÉTODOS DE CONTROL PARA AFLATOXINAS.....	48
1.7.1 <i>Métodos físicos</i> .....	49
1.7.2. <i>Métodos químicos</i> .....	50
1.7.3. <i>Métodos biológicos</i> .....	50
1.7.4 ANTECEDENTES DEL CONTROL BIOLÓGICO DE AFLATOXINAS .....	51
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	52
2.1 HIPÓTESIS.....	52
2.2 OBJETIVOS.....	52
2.2.1 <i>Objetivo General</i> .....	52
2.2.1 <i>Objetivos específicos</i> .....	52
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
3.1. UBICACIÓN DEL ESTUDIO .....	53
3.2 DISEÑO DEL ESTUDIO .....	53
3.3 PRODUCCIÓN DE MAÍZ EN INVERNADERO .....	54
3.4. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE <i>A. FLAVUS</i> .....	56
3.4. INOCULACIÓN DEL PATÓGENO <i>IN SITU</i> .....	57
3.5 INOCULACIÓN DE GRANOS INMADUROS DE MAÍZ IN VITRO .....	57
3.6. ELABORACIÓN DE MICRO-ENSILAJES .....	58
3.7 MUESTREO DE MICRO-ENSILAJES DE MAÍZ .....	59
3.8 IDENTIFICACIÓN DE <i>UFC</i> .....	59
3.8.1 .MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS (técnica de vaciado en placa por diluciones) .....	59
3.9 EXAMEN BROMATOLÓGICO DE ENSILAJES DE MAÍZ.....	60
3.9.1 Humedad y materia seca .....	60
3.9.2 <i>Extracto etéreo o grasa cruda</i> .....	61
3.9.3 <i>Determinación de proteína cruda</i> .....	62
3.9.4 <i>Determinación de cenizas o materia inorgánica</i> .....	63
3.9.5 <i>Determinación de fibra cruda o bruta</i> .....	64

3.10. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS.....	65
3.10.1. Cromatografía en Capa Fina (TLC).....	65
3.10.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	66
3.10.3. Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).....	67
4. RESULTADOS .....	69
4.1 PRODUCCIÓN DE MAÍZ EN INVERNADERO .....	69
4.1 EXAMEN BROMATOLÓGICO DE ENSILAJES DE MAÍZ.....	69
4.1.1. Humedad y materia seca .....	70
4.1.2 Extracto etéreo o grasa cruda .....	70
4.1.3 Determinación de proteína cruda.....	71
4.1.4 Determinación de cenizas o materia orgánica.....	71
4.1.5 Determinación de fibra cruda o bruta .....	72
4.2 CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS TOTALES .....	73
4.2.1 Concentración de aflatoxinas totales inoculados in situ.....	73
4.2.2 Concentración de aflatoxinas totales inoculados in vitro .....	73
4.2.3 Concentración de aflatoxinas totales inoculados granos inmaduros in vito.....	74
5. DISCUSIÓN .....	76
5.1. REDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS .....	76
5.2. CALIDAD BROMATOLÓGICA .....	77
6. CONCLUSIONES .....	78
7. GLOSARIO .....	79
8. BIBLIOGRAFÍA .....	83
INDICE DE ANEXOS.....	91

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Estadios vegetativos y reproductivos de una planta de maíz..... 28

*Tabla 2. Duración de cada estadio fenológico (días).* ..... 29

Tabla 3. Producción forrajera en México. .... 38

Tabla 4. Principales hongos que producen micotoxinas..... 45

Tabla 5. Legislación de la Unión Europea (UE) ..... 48

Tabla 6. Formación de bloques experimentales y combinación de tratamientos utilizados para inocular esporas de *A. flavus*. ..... 54

Tabla 7. Medias de las variables fenológicas en estudio..... 69

Tabla 8. Base materia seca (M S%) en ensilajes de maíz contaminados in situ con aislados de *Aspergillus flavus* aflatoxigénicos (AF+) o no aflatoxigénicos (AF-) ..... 70

Tabla 9. Grasa cruda (%) en ensilajes de maíz contaminados in situ con aislados de *Aspergillus flavus*. ..... 70

Tabla 10. Proteína cruda (%) en ensilajes de maíz contaminado in situ con aislados de *Aspergillus flavus*..... 71

*Tabla 11. Cenizas % en ensilajes de maíz contaminado in situ con aislados de Aspergillus flavus.* ..... 72

*Tabla 12. Fibra cruda (%) en ensilajes de maíz contaminado in situ con aislados de Aspergillus flavus.* ..... 72

*Tabla 13. Micro-ensilajes in situ. Medias de aflatoxinas totales (AF; µg/kg).* ..... 73

*Tabla 14. Micro-ensilajes in vitro Medias de aflatoxinas totales (AF; µg/ kg).*..... 74

Tabla 15. Cultivo de *Aspergillus flavus* en granos inmaduros de maíz. Medias de aflatoxinas totales (AF; µg\_kg)..... 74

## ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Proyección de producción de leche mundial. Fuente: (Secretariados de la OCDE y de la FAO.2014). .....	35
Figura 2. Estructura morfológica del genero Aspergillus. Cabeza conidial biseriada: Co = Conidio, Fe = Fiálide, Va = Vesícula, Me = Métula (datos tomados de Méndez, 2015).....	42
Figura 3. Ciclo de vida del hongo aspergillus (A. flavus) en maíz, estadio saprofitas y patogénicas. Fuente (Lakkireddy et al., 2014). .....	46
Figura 4. Área Agrícola del Centro de Ciencias Agropecuarias de la.....	53
Figura 5. a y b) Selección de la semilla p3055w, c) prueba de germinación d) prueba de inocuidad. ....	55
Figura 6 secuencia de la temperatura y precipitación durante el ciclo del cultivo del maíz forrajero.....	56
Figura 8. a) Aislados de Aspergillus flavus (-), b) aislado de Aspergillus flavus (+), c y d) obtención de esporas .....	56
Figura 9 a) Preparación del inóculo, b) aplicaciones inóculo, c) colocación de la bolsa de papel.....	57
Figura 10 a) ensilaje de maíz b) prototipo de micro-silo, c) extracción del oxígeno d) 1.5 kg f y g) almacenamiento tambos. ....	58
Figura 11. Evaluación ensilajes de maíz. a) Muestra de ensilaje, b) Evaluación de olor y color, c) Evaluación de textura, d) secado de la muestra .....	59
Figura 12. Medición de humedad y materia seca. a) Peso del crisol, b) identificación del crisol, c) crisoles dentro de la mufla con la muestra, d) secado mufla. ....	61
Figura 13. Medición del extracto etéreo o grasa cruda. a) Dedal con la muestra, b) Método Goldfish c) vaso con la grasa obtenida, d) balanza analítica. ....	62
Figura 14. Medición de proteína cruda. a) peso de la muestra, b) acomodo de las capsulas con la muestra, c) inserción de la capsula para su medición, d) obtención de proteína de la muestra (%).....	63
Figura 15 Determinación de cenizas o materia inorgánica. a) Identificación los crisoles b) peso de los crisoles c) combustión de la muestra d) peso del crisol con las cenizas.....	64
Figura 16 Determinación de fibra cruda o bruta. a) Filtros ANKOM F57 b) filtros c) filtros sellados con la muestra d) filtros en el Tray-e) Equipo Digestor/Analizador ANKOM 200/220 f) solución de ácido sulfúrico. g) Digestión alcalina, h) crisol. ....	65
Figura 17 curva de calibración .....	66
Figura 18. Kit de ELISA (Ridascreen® Fast Aflatoxin).....	67
Figura 22. Método de vaciado en placas adaptado por( Camacho et al 2009).....	99

## RESUMEN

Las aflatoxinas (AF) son metabolitos secundarios tóxicos y carcinogénicos producidos por hongos del género *Aspergillus*, principalmente *A. flavus*, *A. nomius* y *A. parasiticus*; éstos contaminan naturalmente los productos agrícolas deteriorando su valor nutritivo y poniendo en riesgo la salud humana y animal. Se ha demostrado que los tipos de *A. flavus* no aflatoxigénicos son capaces de interactuar con tipos aflatoxigénicos inhibiendo la producción de AF. El objetivo de este trabajo fue evaluar en un modelo experimental, la eficacia de aislados locales de *A. flavus* no aflatoxigénicos para disminuir la contaminación con aflatoxinas del ensilaje de maíz empleado en la dieta de vacas lecheras. Se obtuvieron aislados endémicos de Aguascalientes a partir de alimento concentrado (AF-AC1, AF-AC2 y AF-AC3) y de ensilaje de maíz (AF-EM1, AF-EM2 Y AF-EM3). Las esporas ( $6 \times 10^5$ ) se inocularon *in situ* (planta en invernadero) e *in vitro* (granos inmaduros en frascos microbiológicos) sobre un genotipo de maíz (p3055w Pioneer) susceptible a la contaminación por AF. En un diseño de bloques incompletos, cada aislado se inoculó separadamente o de forma conjunta a un control negativo (AF-36) o dos positivos (Cuautitlán y Tamaulipas). Se formaron los bloques I) Control II) AF<sup>+</sup>, III) AF<sup>-</sup> y IV) AF<sup>+</sup> vs AF<sup>-</sup>. Se evaluaron parámetros fenológicos, bromatológicos (análisis químico proximal) y la concentración de AF pre y post-fermentación (ELISA y HPLC). En la inoculación *in situ* se observó una reducción significativa ( $P < 0.05$ ) de 68% entre el grupo AF<sup>+</sup> y la interacción AF<sup>-</sup> vs AF<sup>+</sup> (6425 vs 2106  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Este resultado se repitió en la inoculación *in vitro* en el que el grupo AF<sup>+</sup> tuvo mucho mayor concentración de AF que cuando se cultivó en conjunto con cepas no toxigénicas, tanto en la etapa pre-fermentación (70.3%, 6635 y 1971  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) como post-fermentación (69.6%, 5301 y 1611  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). El grupo control y el AF<sup>-</sup> mantuvieron producción residual de AF (0.0-40.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Las variaciones fenológicas y bromatológicas mostraron una pequeña pero significativa utilización de nutrientes en el grupo de interacción AF<sup>-</sup> vs AF<sup>+</sup> especialmente grasa y proteína del grano y del ensilaje. Estos resultados sugieren que es posible evaluar, en un modelo experimental, la eficacia de aislados de *A. flavus* no aflatoxigénicos para disminuir la contaminación con aflatoxinas del ensilaje de maíz empleado en la dieta de vacas lecheras.

**PALABRAS CLAVES:** *Aspergillus Flavus*, Aflatoxina, Control biológico,

## ABSTRACT

Aflatoxins (AF) are toxic and carcinogenic secondary metabolites produced by *Aspergillus* genus fungi, mainly *A. flavus*, *A. nomius* and *A. parasiticus*. AF naturally contaminate agricultural products, deteriorating their nutritional value and put in risk the human and animal health. It has been demonstrated that non-aflatoxigenic *A. flavus* types are able to interact with aflatoxigenic types inhibiting AF production. The objective of this work was to evaluate, in an experimental model, the efficacy of non-aflatoxigenic *A. flavus* local isolates to reduce the AF contamination of corn silage used in dairy cows diet. Endemic isolates from Aguascalientes were obtained from concentrated feed (AF-AC1, AF-AC2 and AF-AC3) and maize silage (AF-EM1, AF-EM2 and AF-EM3). The spores ( $6 \times 10^5$ ) were inoculated *in situ* (greenhouse) and *in vitro* (immature grains in microbiological flasks) on a maize genotype (Pioneer p3055w) susceptible to AF contamination. In an incomplete block design, each isolate was inoculated separately or together with a negative control (AF-36) or two positive strains (Cuautitlán and Tamaulipas). Blocks I) Control II), AF<sup>+</sup>, III) AF<sup>-</sup> and IV) AF<sup>+</sup> vs AF<sup>-</sup> were formed. We evaluated phenological, bromatological (proximal chemical analysis) parameters and the concentration of AF pre and post-fermentation (ELISA and HPLC). In *in situ* inoculation, a significant reduction of AF in corn silage ( $P < 0.05$ ) of 68% was observed between the AF<sup>+</sup> group and the AF<sup>-</sup> vs AF<sup>+</sup> interaction (6425 vs 2106  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). This result was repeated in the *in vitro* inoculation in which the AF<sup>+</sup> group had much higher AF concentration than when it was cultivated in conjunction with non-toxicogenic strains, both in the pre-fermentation stage (70.3%, 6635 and 1971  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) as post-fermentation (69.6%, 5301 and 1611  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). The control group and AF<sup>-</sup> maintained residual AF production (0.0-40.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). The phenological and bromatological variations showed a small but significant utilization of nutrients in the interaction group AF<sup>-</sup> vs AF<sup>+</sup> compared with the control group, especially crude fat and protein from the grain and from the silage. These results suggest that it is possible to evaluate, in an experimental model, the efficacy of non-aflatoxigenic *A. flavus* isolates to reduce aflatoxin contamination of corn silage used in the diet of dairy cows.

KEYWORDS: *Aspergillus Flavus*, Aflatoxin, Biological Control,

## INTRODUCCIÓN

El ensilaje de maíz es una de las principales dietas del ganado lechero, es la técnica de conservación del forraje verde, que es el proceso de fermentación de los carbohidratos solubles del forraje por medio de bacterias que producen ácido láctico en condiciones anaeróbicas, a través de este proceso el forraje es almacenado en tiempos de cosecha conservando la calidad y palatabilidad, lo cual permite tener forraje en buenas condiciones nutricionales durante la época de escases (INIFAP, 2014).

El ensilaje de maíz es el forraje que se conserva más frecuente por su alto contenido de carbohidratos por tal razón es uno de los alimentos más usados en el mundo, por su alto contenido de grano y fibra digestible, es uno de los principales alimentos para la alimentación de rumiantes (Ruiz *et al.*, 2009). Por lo tanto, la incidencia de hongos que generan micotoxinas deterioran la calidad y el valor nutricional de los ensilajes de maíz que son utilizados en las dietas del ganado lechero, esto genera grandes pérdidas económicas que afectan a la salud humana y animal, además, las condiciones de manejo, transporte y almacenamiento son unos de los factores de contaminación por aflatoxinas (FA) en los alimentos.

Se sabe que los ensilajes contienen una gran cantidad de carga micótica o contaminación, la presencia de hongos filamentosos conocidos como moho en los que destaca el género *Aspergillus* principalmente *A. flavus* y *A. parasiticus* que son los que producen las principales aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>).

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 1983), las cuatro sustancias principales se distinguen por sus colores fluorescentes B, correspondiente al color azul, y el G, correspondiente al verde, con subíndices que indican la movilidad cromatográfica relativa (Requena *et al.*, 2005). Siendo la AFB<sub>1</sub> la de más importancia económica ya que de esta se deriva la AFM<sub>1</sub> que es sintetizada por las vacas y es desechada en la leche. *A. flavus* en condiciones apropiadas es capaz de infectar los granos de maíz, en condiciones de campo, cosecha y almacenamiento (Scarpari *et al.*, 2014). La composición de la semilla que está constituida principalmente de lípido, que afectan la susceptibilidad de infección de hongos productores de micotoxinas.

En México se reporta reportando la presencia de aflatoxinas (AF), principalmente en granos y algunos productos elaborados a base de maíz y leche (Alvarenga *et al.*, 2012).

Por lo que se están buscando estrategias de control de aflatoxinas en plantas de maíz con los métodos: biológicos, químicos y físicos

Unas de las principales acciones que se están realizando es la de combatir cepas de *A. flavus* toxigénicas contra no toxigénicas control biológico (Cotty y Bayman 1993), utilizando de cepas de *A. flavus* no aflatoxicogénica antes de la siembra en suelos donde se producen los principales productos agrícolas, para reducir la presencia de AF en los productos cosechados y tener un índice menor de presencia de AF en piensos.

Se considera que alrededor del 25% de las cosechas anuales están contaminadas con algún tipo de micotoxinas y que esos valores pueden ser aún mayores, del orden del 80% e incluso del 100%, y corresponden a aquellas regiones cuyos cultivos estuvieron sometidos a condiciones de estrés hídrico, ataque de insectos o fueron cosechados y/o almacenados en condiciones inapropiadas (Romagnoli y Silva, 2009)

La contaminación de alimento por micotoxinas, destinado al consumo humano y animal se ha convertido en una de las mayores problemáticas de salud pública a nivel mundial, lo que permite realizar investigaciones para conocer las concentraciones de AF que pueden estar presentes en los componentes de las dietas destinadas al consumo del ganado lechero.

Según la FAO, el maíz está clasificado como el segundo cultivo de mayor producción mundial, después del trigo, con una producción estimada hasta el 2012 de 872,8 millones de toneladas en el mundo (Londoño y Martínez, 2017), el maíz y sus derivados son muy propensos a la contaminación por hongos que producen micotoxinas principalmente AF.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. EL MAÍZ

El cultivo del maíz (*Zea mays* L.) es el cultivo más importante para la población de México, debido a que junto con el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) constituyen la base de la alimentación de millones de mexicanos (SIAP, 2006, Aguirre y García, 2012). En México se consumen anualmente poco más de 20 millones/ton, de maíz, dadas las variaciones en los volúmenes de producción del grano, en ocasiones se importa de otros países, principalmente de los Estados Unidos de América.

El maíz se originó en Mesoamérica. La primera evidencia de la planta de maíz como alimento humano proviene de un lugar de México de habitantes que habitaban cuevas en donde se encontró una mazorca pequeña con antigüedad estimada en más de 5000 años. El maíz se considera como la primera planta que se cultivó por los agricultores antiguos (Acosta, 2009). El maíz es de suma importante para los mexicanos que lo cultivan de dos formas (riego y temporal). En la producción mediante el riego se pretende alcanzar los niveles más altos de producción con los insumos externos que son las semillas mejoradas, fertilizantes, sólidos y líquidos, químicos y maquinaria tecnificada. Para obtener esos rendimientos y una producción de calidad, se tiene que estudiar y entender su ciclo fenológicos de la planta de maíz.

#### 1.1.1. Ciclo de vida

La planta de maíz es una de las plantas de inflorescencia monoica con inflorescencia masculina y femenina separadas dentro de la misma planta. La espiga (masculina) aparece en la parte superior de la planta, y produce un 2-5 millón de polen. Estos granos de polen salen a la deriva y el aire las transporta hasta que hagan contacto con un estilo (femenina) que sea parte de otra planta de maíz. En la misma planta, unos días más tarde, aparece la inflorescencia femenina, en algún lugar en medio de la madre. Esta parte femenina se compone de hasta 1,000 óvulos, que pueden ser fecundados por el polen cuando se pone en contacto con el estilo. Normalmente sólo una o dos mazorcas se desarrollan por planta, aunque algunas variedades muy prolíficas, normalmente híbridas, pueden producir varias mazorcas (Winch, 2006).

### **1.1.2. Condiciones ambientales**

El maíz se adapta a una amplia gama de ambientes agroecológicos, pero es fundamentalmente un cultivo de clima cálido, se cultiva en las regiones tropicales y subtropicales. El maíz requiere una temperatura media diaria de al menos 20°C para el crecimiento y desarrollo adecuado, y las temperaturas diurnas cálidas de 25-30°C y noches frescas para crecimiento y desarrollo óptimo. Las temperaturas superiores a 35°C reducen los rendimientos; temperaturas por debajo de 8°C y superiores a 40°C son extremadamente perjudiciales, provocando el cese del crecimiento. El estrés de alta temperatura impone impacto adverso en el crecimiento (Lim, 2013).

### **1.1.3. Producción nacional y local**

En los últimos años las actividades humanas han modificado los ecosistemas con mayor rapidez debido al sobrepastoreo y cambio de uso de suelo. En la región Norte-Centro de México (Aguascalientes, Durango y Zacatecas), las siembras de maíz de temporal constituyen una actividad importante en la agricultura social, debido que el maíz es destinado principalmente para el autoconsumo. En los ciclos agrícolas 2005 y 2006 se sembraron más de medio millón de hectáreas (555,822), de las cuales por efectos de sequía fueron siniestrados el 33% (210, 727), con una producción de 325, 474 t ha y un rendimiento promedio de 822 kg ha. Estos bajos rendimientos fueron debidos principalmente a la errática precipitación a suelos delgados infértiles y a la utilización de variedades nativas de ciclo precoz (INIFAP-CONABIO, 2010).

En el estado de Aguascalientes los usos del suelo son variados, entre los que sobresalen la agricultura y la ganadería. El 43% de la superficie del Estado (243 402 ha) se dedica a la agricultura; de este porcentaje, 21% corresponde a la agricultura de temporal y 22%, a la agricultura de riego. La agricultura de riego se desarrolla principalmente en el “corredor” que abarca de la ciudad de Aguascalientes hacia el norte, hasta llegar a los límites con el estado de Zacatecas, mientras que la agricultura de temporal se practica en terrenos de menor aptitud y que carecen de infraestructura para riego, principalmente en los municipios de El Llano, Asientos y Tepezalá. En las zonas de temporal las prácticas agrícolas están enfocadas, por lo general, al autoconsumo de granos básicos (maíz, frijol y algunas hortalizas), así como a la venta local (elote, frijol, entre otros) (INEGI, 2008).

En el mundo, México es uno de los países más consumidores de maíz, con una producción total de 10,2 millones de toneladas anuales para consumo humano y 5

millones para consumo animal e industrias no relacionadas con productos alimenticios (Robledo, *et al* 2001).

### 1.1.4. Fenología del maíz

La planta de maíz se constituye de diferentes etapas fenológicas con secuencia ordenada que van desde la germinación hasta la floración y después a la formación de fruto como se muestra en la (tabla 1), se denomina en dos fases: vegetativo y reproductivo (Fassio *et al.*, 1998).

Tabla 1. Estadios vegetativos y reproductivos de una planta de maíz.

Vegetativos		Reproductivos	
VE	Emergencia	R1	Barbas
V1	Primera hoja	R2	Ampolla
V2	Segunda hoja	R3	Lechoso
V3	Tercera hoja	R4	Pastoreo
V4	Cuarta hoja	R5	Dentado
V5	Quinta hoja	R6	Madurez fisiológica
V(n)	N hoja		
VT	Maduración de la espiga		

Fuente:(Fassio *et al.*, 1998)

Un buen crecimiento y desarrollo del cultivo de maíz, dependen principalmente de su nutrición que la planta requiere para satisfacer las necesidades de su estado fenológico, el metabolismo de la planta se ve influida por varios factores entre los que sobresale la radiación solar, la disponibilidad de agua, los nutrientes del suelo (Fassio *et al.*, 1998). Por lo cual es importante conocer y entender los estados vegetativos y reproductivos de la planta de maíz para obtener un buen desarrollo y rendimiento en la producción (tabla. 2) para saber cuál es la etapa perfecta para ensilar el maíz forrajero que va destinado al ganado lechero.

Tabla 2. Duración de cada estadio fenológico (días).

Etapa de crecimiento	Días aproximados después de la emergencia	Significado
V3	8-10	Determinar el número de hojas y brotes. Las inundaciones podrían matar el maíz, por lo que debe evitarse que estas condiciones persistan durante algunos días.
V6 – V8	21-36	Determinar el crecimiento sobre el suelo. Las plantas son susceptibles al daño por el viento y el granizo. Se debe prevenir la humedad y el estrés nutricional.
V12 – V17	36-60	Se determina el tamaño del elote y el número de filas por elote. La humedad y el estrés nutritivo pueden dar lugar a granos vacíos.
VT – R1	54-62	Espiga y elotes visibles. En esta etapa puede existir una pérdida considerable de rendimiento por el estrés hídrico.
R2	66 – 74	Etapa de ampolla. La humedad de los granos es de alrededor del 85 por ciento. La mazorca alcanza su tamaño completo.
R3	76 – 86	Estado lechoso. La humedad del grano es del 80%. El estrés en este punto puede aún reducir los rendimientos.
R4	84– 88	Estado masoso. La humedad del grano es del 70%. Los granos tienen acumulado cerca de la mitad de su peso seco maduro.
R5	90 – 100	Estado dentado. La humedad del núcleo es de alrededor del 55 %. El estrés puede reducir el peso del grano.
R6	105 – 120	Madurez fisiológica. Se ha formado una cubierta gruesa. Los granos alcanzaron su peso seco máximo.

Fuente: (Duncan et al., 2007)

### 1.1.5. Ensilaje

El ensilaje es un método de conservación de forrajes en el que se inhibe el crecimiento de microorganismos degradadores de la materia orgánica, llevado a un depósito de dimensiones y forma variable denominado silo, en el que se dispone en capas uniformes eliminando el aire mediante compresión y cubriéndolo finalmente es una práctica que se implementa más en la alimentación del ganado lechero, y está en estado de crecimiento en muchos países ya que permite utilizar forraje como fuente de alimentación sobre un período prolongado y en tiempo que el forraje es escaso. Esta práctica permite conservar el forraje a través de la fermentación láctica espontánea bajo condiciones anaeróbicas. En tal ambiente, el pH desciende a un nivel en el cual el crecimiento de microorganismos de

descomposición (incluyendo la mayoría de los hongos) se inhibe (*Garcés et al., 2004*; *González et al., 2008*).

En ensilaje se utiliza para conservar el forraje verde en almacenes conocidos como silos. Mediante los procesos de fermentación anaerobia controlada, se mantiene estable la composición del material ensilado durante largo tiempo a través de la acidificación del medio (*Castillo, et al., 2011*). Las bacterias de ácido lácticas (BAC) fermentan los carbohidratos hidrosolubles (CHS) del forraje produciendo ácido láctico y en menor cantidad, ácido acético. Al generarse estos ácidos, el pH del material ensilado baja a un nivel que inhibe la presencia de microorganismos que inducen la putrefacción. Una vez que el material fresco ha sido almacenado, compactado y cubierto para excluir el aire, el proceso del ensilaje se puede dividir en cuatro etapas (*FAO 2001, Garcés et al., 2004*).

El ensilado de maíz es una alternativa muy buena para la conservación de alimento por su alto contenido de almidón en el grano, el contenido energético es de mayor cantidad que cualquier otro forraje, siendo un excelente material para la elaboración de un ensilado, obteniendo un valor nutricional alto para la alimentación animal (*Weinberg y Muck, 1996*)

Un ensilaje de buena calidad de obtener las siguientes características: bien picado en trozos de 2 a 3 cm, pH ácido (3.5-5), alta proporción de grano, sin hongos o enmohecimientos, olor agradable, color café olivo, de 60 y 70% de humedad y un buen sabor, (dulce, no agrio) para que el ganado lo consuma (*Chaverra y 2000*), un ensilaje consta de 4 fases.

### **1.1.6. Fases del ensilaje**

#### **1.1.6.1 Fase Aérobica**

En esta fase, dura pocas horas, el oxígeno atmosférico presente en la masa vegetal disminuye rápidamente debido a la respiración de los materiales vegetales y a los microorganismos aerobios y anaeróbicos, como las levaduras y las entero bacterias. Además, hay una actividad importante de varias enzimas vegetales como las proteasas y las carbohidrasas, que mantienen siempre el pH fluctuando en el rango normal para el jugo del forraje fresco (pH 6.5-6.0) (*FAO 2011, Garcés et al., 2004*).

#### **1.1.6.2 Fase Fermentación**

Esta fase comienza al producirse un ambiente anaeróbico. Dura de varios días hasta varias semanas, dependiendo de las características del material ensilado y de las

condiciones en el momento del ensilaje; si la fermentación se desarrolla con éxito, prolifera la actividad de las bacterias ácido láctico y se convierte en la población predominante. A causa de la producción de ácido láctico y otros ácidos orgánicos el pH bajara entre 3.8-5.0 (Elferink y Driehuis, 2011).

#### **1.1.6.3 Fase Estable**

Mientras se mantenga el ambiente sin aire ocurren pocos cambios. La mayoría de los microorganismos de la fase 2 lentamente reducen su presencia. Algunos microorganismos acidófilos sobreviven este periodo en estado inactivo; otros como Clostridios y Bacilos, sobreviven en forma de esporas. Sólo algunas proteasas, carbohidrasas y microorganismos especializados como *Lactobacillus buchneri* que toleran ambientes ácidos, continúan activos, pero a menor ritmo (FAO 2011, Garcés et al., 2004).

#### **1.1.6.4 Fase Deterioro Aeróbico**

Esta fase comienza con la apertura del silo y la exposición del ensilaje al aire. Esto es inevitable cuando se requiere extraer y distribuir el ensilaje, pero puede ocurrir antes de iniciar la extracción por daño de la cobertura del silo (p. ej. roedores, pájaros) el periodo de deterioro puede dividirse en dos etapas. La primera se debe al inicio de la degradación de los ácidos orgánicos que conservan el ensilaje, por acción de levaduras y ocasionalmente por bacterias que producen ácido acético. El ácido acético induce una disminución en el valor del pH, lo que permite el inicio de la segunda etapa de deterioro. En ella se constata un aumento de la temperatura y la actividad de microorganismos que deterioran el ensilaje, como algunos bacilos. Sin embargo, la tasa de deterioro depende de la concentración y actividad de los organismos que causan este deterioro en el ensilaje (Honig y Woolford, 1980).

#### **1.1.7. Microsilos**

Los micro-silos son estructuras de menor tamaño que el silo normal, esto depende de la cantidad de alimento que se desea almacenar, entre estos se encuentran tanques de plástico, madera o lámina y/o bolsas de plástico. La ventaja de usar bolsas para los micro-silos es que son de bajo costo y de fácil manejo, evitas perdidas por filtración y exposición al aire, son flexibles para su almacenamiento, son fáciles de manipular, también hay desventajas con el uso de silos bolsa, se pueden fácilmente perforarse, cuando se almacenan debe estar el lugar libre de residuos y objetos puntiagudos, evitar el contacto

con roedores e insectos por que pueden romper la bolsa y contaminar el ensilado (Schroeder, 2004). Las bolsas utilizadas en los silos pueden variar en tamaño, precio, y calidad, siendo una alternativa para los pequeños ganaderos de producción lechera.

### **1.1.8 EXAMEN BROMATOLÓGICO DE ENSILAJES DE MAÍZ**

La nutrición como ciencia basa su aplicación en el conocimiento de las demandas nutricionales de los animales en cada uno de sus estados fisiológicos y en la oferta de los nutrimentos para satisfacer estas necesidades en las cantidades y calidad adecuadas (De Gracia, 2011).

La Bromatología es la disciplina científica que estudia integralmente los alimentos. Permite conocer su composición cualitativa y cuantitativa; el significado higiénico y toxicológico de las alteraciones y contaminaciones, de qué manera y por qué ocurren y cómo evitarlas; cuál es la tecnología más apropiada para tratarlos y cómo aplicarla; cómo legislar y fiscalizar para proteger los alimentos y al consumidor; qué métodos analíticos aplicar para establecer su composición y determinar su calidad. Las variables a considerar son: materia seca, fibra curda, grasa cruda, proteína cruda y cenizas.

#### **1.1.8.1. Humedad y materia seca**

Es común que la gran mayoría de los alimentos utilizados en la alimentación animal cuando son utilizados para la formulación de raciones posean cierto nivel de humedad. Este nivel de humedad varía aún dentro de un mismo tipo de material debido a las condiciones donde se obtuvo. Así tenemos que, en los forrajes, de acuerdo a su madurez fisiológica van perdiendo humedad y se encuentra pastos con contenidos elevados de humedad cuando jóvenes y con muy poca humedad cuando viejos. En los subproductos agroindustriales, de acuerdo al procesamiento al cual son sometidos los materiales, la pérdida de agua varía de acuerdo al método de extracción o secado. Igual sucede con el almacenamiento de granos que, aunque se estandarizan, no todo el tiempo poseen el mismo grado de humedad.

Porcentaje de Materia Seca es lo que queda del material una vez que sacamos el agua. A medida que la planta madura, disminuye el porcentaje de agua que la constituye. La digestibilidad de un alimento se puede definir como la proporción del mismo que no es excretada con las heces y que se supone ha sido absorbida. A medida que aumenta el estado de madurez del forraje, disminuye la digestibilidad, como consecuencia de cambios químicos en los componentes del material vegetativo.

#### **1.1.8.2 Extracto etéreo o grasa cruda**

Los ácidos grasos insaturados se han descrito con frecuencia como reguladores de la ruta de resistencia de la planta para el ataque de patógenos, a pesar de que su perfil está fuertemente influenciado por las condiciones ambientales que está expuesta la plantas durante toda la temporada de crecimiento (Scarpari *et al.*, 2014).

Se refiere a la cantidad de grasa en una muestra de alimento sometida al análisis químico proximal o a análisis bromatológico. Es la cantidad de grasa que contiene un alimento, se expresa en porcentaje y es el resultado que arroja el análisis químico proximal de una muestra. El contenido total de lípidos en los alimentos es comúnmente determinado por extracción con solventes orgánico como se observa en la figura 13 En los alimentos es el residuo no volátil que queda después de evaporar en estufa el extracto obtenido por la acción del éter sobre el alimento.

#### **1.1.8.3 Determinación de proteína cruda**

La proteína cruda es denominada “cruda” ya que no es una medición directa de la proteína sino una estimación de la proteína total basada en el contenido en nitrógeno del alimento ( $\text{Nitrógeno} \times 6.25 = \text{proteína cruda}$ ). La proteína cruda incluye la proteína verdadera y el nitrógeno no proteico tales como el nitrógeno ureico y el amoniacal. El valor de proteína cruda no suministra información acerca de la composición en aminoácidos, la digestibilidad intestinal de la proteína o cuan aprovechable es en el rumen.

#### **1.1.8.4 Determinación de cenizas o materia inorgánica**

La ceniza es el residuo remanente luego que toda la materia orgánica presente en una muestra es completamente incinerada, por lo tanto  $100 - \text{cenizas} = \text{materia orgánica}$ . Consiste de toda la materia inorgánica (o minerales) del alimento, así como los contaminantes inorgánicos, tales como la tierra y la arena como se muestra en la figura 15. Esta determinación se basa en someter la muestra de alimento a combustión en una estufa entre 500 y 600 °C haciendo referencia de la metodología del ANEXO D. La materia orgánica es oxidada y al residuo que contiene la materia mineral se le llama cenizas

#### **1.1.8.5 Determinación de fibra cruda o bruta**

La fibra cruda es la pérdida de la calcinación del residuo seco después de la digestión de la muestra con soluciones de 1.25 % (peso /volumen) de Ácido sulfúrico y 1.25 % de

Hidróxido de sodio, se aplica en muestras que previamente fueron desgrasadas, y se aplica en granos, carne, alimentos, y materiales fibrosos y alimentos para mascotas. Al efectuar la digestión ácida se disuelve parte de la hemicelulosa y al efectuar la digestión alcalina se disuelve parte de la lignina; por lo tanto, el producto final no puede considerarse como la totalidad de la fibra cruda y los resultados obtenidos son menores que reales.

## **1.2. LA GANADERÍA LECHERA**

En México, la leche de ganado bovino es un producto de mucha demanda en el sector pecuario, por su importancia como alimento básico para la población infantil y su creciente consumo por otros grupos de edad (Martínez *et al.*, 2012). Estos factores de mercado han influido de alguna manera para que la producción de leche esté en crecimiento y desarrollo, así como para que esté presente en todas las regiones y estados de la República Mexicana. A pesar de ello, la oferta nacional ha sido incapaz de responder a la creciente demanda del lácteo y sus derivados, situación que ha llevado a nuestro país a ocupar los primeros lugares en importación de leche fluida y en polvo con 20.8 y 13.9% respectivamente del flujo mundial

La leche es uno de los alimentos más completos para el ser humano, por su alto contenido en proteínas y su gran contenido de aminoácidos esenciales para la nutrición de la humanidad. En México un producto prioritario, es la leche de ganado bovino, es el sector con una gran importancia para la alimentación básico para la población infantil y su creciente (Castro *et al.*, 2012). Estos factores de mercado han influido de alguna manera para que la producción de leche se haya desarrollado y esté presente en todas las regiones y estados de la República Mexicana.

La producción lechera intensiva y familiar se desarrollan en las zonas templadas, áridas y semiáridas del territorio mexicano, manejando razas lecheras especializadas, mientras que el tercer sistema se lleva a cabo en el trópico con vacas cruzadas (Magaña *et al.*, 2006). Esta diversidad productiva también ha permitido que se desarrollen sistemas comerciales de la leche fresca con características particulares dependientes del manejo de los hatos y de la región de México, en la Figura 1 se observa una proyección de producción de leche a nivel mundial hasta el 2023 (Castro *et al.*, 2012).

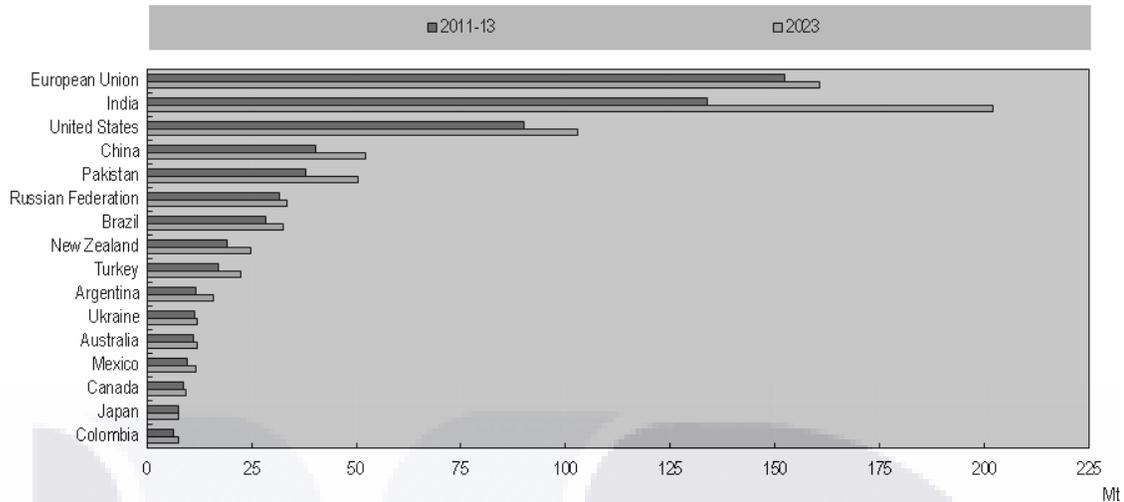


Figura 1. Proyección de producción de leche mundial. Fuente: (Secretariedades de la OCDE y de la FAO.2014).

### 1.2.1. La actividad lechera en México

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, semispecializado, doble propósito y familiar o de traspatio (SIAP, 2017). Una opción sería aumentar la producción mediante la incorporación de nuevos recursos naturales a esta actividad; pero no es una alternativa factible pues el territorio nacional con vocación ganadera está utilizado prácticamente en su totalidad. Por lo anterior, la siguiente opción es aumentar la producción mediante el incremento de la productividad en las unidades de producción existentes; este es el mejor camino en un mundo globalizado, caracterizado por economías integradas y mercados competitivos, en el cual las reglas del juego han cambiado sustancialmente para todas las actividades productivas, y la ganadería lechera no es la excepción (Loera y Banda, 2017). Por lo que se tiene distintos tipos de explotaciones:

- **Especializado.** Animales de razas finas; incorpora tecnología en el proceso productivo, manejo estabulado y ordeña mecanizada. La productividad y la asociación con grandes empresas industrializadoras es una de sus ventajas.
- **Semis-estabulados.** Predomina la raza Holstein y sus cruza; los animales se mantienen de forma semis-estabulada y la ordeña puede o no ser mecánica. Atiende básicamente el mercado local.

- **Familiar** Pequeñas unidades de producción semis-estabuladas; las razas mayoritariamente son la Holstein, suizo americano y cruza; la ordeña es manual. Tiene gran contribución en la elaboración de quesos artesanales.
- **Doble propósito.** Razas cebú con cruzamientos de suizo o Holstein, la función principal es la producción de carne. El manejo del hato es extensivo, basando su alimentación en el pastoreo.

La leche de bovino es uno de los productos fundamentales en la conformación de la canasta básica mexicana; su importancia radica en que es una de las bases de la alimentación de niños y adultos mayores. El crecimiento de la población y el consumo por persona son dos de los aspectos que han modificado los niveles de oferta (SIAP, 2017). La composición de la leche depende de factores como la raza, Región geográfica, sistema de producción, número y periodo. De lactancia, estacionalidad, clima y dieta que pueden influir. La calidad del producto final (Cofani *et al.*, 2009). En el caso de México, es destacable que dos a tres de cada cien litros que se producen en el mundo, son de origen mexicano, lo cual coloca a nuestro país en la posición 16 en este rubro (Loera y Banda, 2017).

### **1.2.2. Estados productores de leche.**

Los principales estados productores de leche en orden de importancia son: Jalisco, Coahuila, Durango, Chihuahua, Veracruz, Guanajuato, México, Hidalgo, Aguascalientes y Puebla (SE, 2012). En Aguascalientes se cuenta con 239,222 cabezas de bovino. El 70.7% son vientres para producción de leche. Asimismo, Aguascalientes es considerado una cuenca lechera del país, ya que tiene una producción media diaria de leche de un millón 265 litros, la que lo coloca en el 9º lugar del país con una aportación del 3.7% a nivel nacional (INEGI, 2013).

### **1.2.3. Alimentación del ganado lechero**

Se entiende por alimentación del ganado lechero a la administración correcta de nutrientes necesario para el mantenimiento de vacas lecheras, la producción de leche, aumento de peso, gestación y trabajo (Copa, 2010). En la alimentación de bovinos las proteicas son las fuentes principales de alimentación del ganado lechero, son de suma importancia económicas con la cual se cubren los requerimientos de mantenimiento y producción, los altos costos de importación han impulsado la exploración de fuentes alternas de proteínas disponibles localmente y a bajo costo (Arteta y Zamora 2005).

La alimentación es la base en el desempeño del ganado lechero. Una dieta bien balanceada y una administración apropiada de la producción de leche, la reproducción y la salud de la vaca. Una nutrición inadecuada predispone a la vaca a problemas de reproducción, y a no cubrir los requerimientos para la producción de leche (Payan *et al.*, 2013). Es muy importante y delicado el conservar los niveles de desempeño reproductivo adecuados cuando las vacas se ven presionadas para producir altos rendimientos de leche. Esto se agrava debido a que las vacas no pueden obtener los nutrientes adecuados para producir la leche para lo cual se les ha desarrollado.

Actualmente los alimentos concentrados han generado nuevas formas de alimentación, con el objetivo de aumentar la producción láctea y cubrir todas las necesidades nutrimentales que demanda el animal para un buen rendimiento en producción.

Como todo ruminante, los bovinos lecheros son animales que ocupan forrajes para su alimentación por naturaleza, con esto nos dice que los pastos y forrajes son alimentos con los que se cubren todas sus necesidades para su producción y desarrollo. En la actualidad se han modificado las nuevas formas de alimentación, en las que se incluyen los alimentos concentrados (Fink, 2008). Para evitar que las vacas pasen hambre en la época seca, es necesario conservar el forraje en forma de heno y ensilaje.

### **1.2.3.1 Forrajes**

Los forrajes están constituidos por tallos, hojas y flores de las plantas de especies forrajeras como la cebada, avena, sorgo, pastos y principalmente el maíz como se muestra en, Los animales pueden consumir forrajes en los siguientes estados: verde, secos y ensilaje, El ensilaje de maíz es sumamente importante en la dieta del ganado lechero por su contenido energético y su fácil conservación como ensilajes que es la principal fuente de alimentación del ganado lechero (Cueto *et al.*, 2006). Según el estado en el que se encuentren al momento de ser consumidos por los animales, los forrajes pueden ser clasificados como:

- **Forrajes verdes.** - Forrajes de consumo inmediato al punto de cosecha o directamente en la pradera. Los principales son los pastos (naturales y artificiales), alfalfa, maíz, cebada, trigo, avena y sorgo.
- **Forrajes secos.** - Forrajes que se cortan y se dejan secar antes de ser proporcionados a los animales, se les conoce como henos. También entran dentro de este grupo los residuos de cosecha como el tamo de leguminosas o cereales.

Los forrajes son las partes vegetativas de las gramíneas o de las leguminosas que contienen una alta proporción de fibra (más de 30% de fibra neutro detergente).

Tabla 3. Producción forrajera en México.

Producción forrajera en México, 2016 Cultivo	Superficie sembrada (Ha)	Superficie cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Valor producción (Miles de Pesos)
ALFALFA VERDE	387,799	376,422	28,247,520	75.0	13,055,454
MAÍZ GRANO	7,750,301	6,069,092	17,635,417	2.9	71,913,855
MAÍZ FORRAJERO	489,152	311,225	9,605,148	30.8	4,402,710
SORGO GRANO	1,972,059	1,728,228	6,429,311	3.7	22,185,072
AVENA FORRAJERA	942,82	633,761	6,265,530	9.9	3,012,451
SORGO FORRAJERO	235,787	183,398	3,937,931	21.4	1,961,937
VERDE					

Fuente: Adaptado de SIAP, 2017.

Los forrajes son requeridos en la dieta en una forma importante. Los forrajes pueden ser pastoreados directamente, cosechados y preservados como ensilaje. Según la etapa de lactancia (Luciano, 2009), por lo cual se tiene que generar una dieta, que garantice una nutrición adecuada y de buena calidad para la producción de leche.

**1.2.4. Dieta para el ganado lechero**

La alimentación de las vacas de su peso vivo, nivel de producción, el momento de producción del hato, también debe ser de acuerdo a sus requerimientos nutritivos. Todos estos aspectos deben ser considerados para formular una ración óptima, en lo que se considera una cierta proporción de forraje y concentrado. (Hazard 2009). Una de los principales factores para que la producción de leche sea de buena calidad, son las dietas del ganado las cuales deben tener los requerimientos necesarios para que el ganado lechero tenga una buena producción, los cuales son, principalmente el ensilaje de maíz, alimento concentrado, minerales y vitaminas. La dieta debe contener proteína, minerales, vitaminas (liposolubles e hidrosolubles), Esta clasificación es un poco arbitraria y no es tan

importante, lo importante es saber cuáles alimentos se encuentran disponibles, su valor nutritivo y los factores que afectan su utilización en una ración para así tener un mejor rendimiento en la producción (Cueto *et al.*, 2006).

#### **1.2.4.1 Proteínas**

Las proteínas son constituyentes esenciales en los organismos vivos. Todas las células sintetizan proteínas durante una parte o a lo largo de toda su existencia, sin esa función la vida no resulta posible (Álvarez, 2008). Los rumiantes se distinguen del resto de los animales por la adaptación de la parte anterior de su estómago, esta peculiaridad permite convertir alimentos fibrosos y proteínas de muy baja calidad, incluso el nitrógeno no proteico (NNP) en nutrientes de calidad como la proteína microbiana y los ácidos grasos volátiles (Rodríguez *et al.*, 2007).

#### **1.2.4.2 Lípidos**

Normalmente la dieta consumida por las vacas contiene solo 4 a 6% de lípidos. Sin embargo, los lípidos son parte importante de la ración de una vaca lechera porque contribuyen directamente a casi el 50% de la grasa en la leche y son la fuente más concentrada de energía en los alimentos (Wattiaux y Howadr 1994). En el rumen, la mayoría de los lípidos son hidrolizados. Los enlaces entre el glicerol y los ácidos grasos son separados dando origen a glicerol y tres ácidos grasos. El glicerol se fermenta rápidamente para formar ácidos grasos volátiles (AGV), estos se absorben en la pared ruminal. Algunos ácidos grasos son utilizados por las bacterias para sintetizar los fosfolípidos necesarios para construir las membranas de las células (Wattiaux y Howard 1994, Relling y Mattioli 2003).

#### **1.2.4.3 Carbohidratos**

Los carbohidratos son el principal constituyente de la dieta del ganado lechero y contribuyen de un 60 a un 70% de la energía neta utilizada para la producción de leche (Castro, 2002). La clasificación de los carbohidratos en estructurales y no estructurales se refiere a su función dentro de la planta que puede ser de estructura o de reserva de nutrientes. Los carbohidratos estructurales (fracción fibrosa) está en la pared celular son la hemicelulosa, celulosa y pectina, en tanto los carbohidratos no estructurales (fracción no fibrosa) están en semillas, y pequeñas cantidades en las hojas y tallos de los forrajes, siendo estos el almidón y los azúcares (Castro 2002, Relling y Mattioli 2003).

El almidón también se encuentra dentro de la célula de la planta y es altamente digestible (75 a 95%). Es la mayor reserva de energía de los vegetales y se encuentra en la porción de la semilla de la planta. Se fermenta rápidamente en el rumen si el grano está procesado (molido fino y hojuela do al vapor), el almidón de la cebada y el trigo tiende a fermentarse rápidamente, mientras que el maíz, sorgo, y granos procesados toscos se fermentan más lentamente. El almidón puede representar hasta 20 a 30 % de la materia seca de la ración (Hutjens, 2003).

#### **1.2.4 Fibra**

La fibra incluye compuestos que forman parte de la pared celular de los vegetales. Los principales compuestos de la fibra son:

- **Celulosa:** Es el principal carbohidrato estructural y le da rigidez a la pared celular. Los forrajes maduros son más ricos en celulosa y puede representar de 15 a 20% de la materia seca de la ración (Hutjens, 2003, Bach y Casamiglia, 2006).

- **Hemicelulosa:** También se encuentra en la pared celular. Las bacterias convierten estas ligaduras complejas de glucosa, en ácidos grasos volátiles. La hemicelulosa puede representar hasta 10 a 15% de la materia seca de la ración (Hutjens, 2003).

- **Pectinas:** Se encuentran en cantidades elevadas en leguminosas. Se digieren más rápidamente que la celulosa o la hemicelulosa, pero a diferencia de lo que ocurre con la rápida fermentación del almidón, la fermentación de estas no disminuye el pH ruminal. (Bach y Casamiglia 2006)

#### **1.2.4.5 Alimento concentrado**

Usualmente "concentrado" se refiere a alimentos bajos en fibra y altos en energía. Los concentrados pueden ser altos o bajos en proteína, tienen alta palatabilidad y usualmente son comidos rápidamente. También son alimento combinado con otro para mejorar el balance nutritivo del producto y que será posteriormente diluido y mezclado para producir un suplemento o un alimento completo (AAFCO, 2000).

Los principales alimentos que se utilizan (avena, trigo, cebada, sorgo y maíz) residuos de algunas industrias que tienen en su composición los principales nutrientes que requieren los animales y poseen alto contenido de energía. Una de las principales dificultades que se han encontrado en la actualidad y que afecta gravemente al productor, es la contaminación de los alimentos destinados al consumo del ganado lechero, En la mayoría de los casos la principal fuente de contaminación microbiana y de toxinas de los

alimentos son las materias primas que se puede contaminar en campo, alimento de cosecharse y principalmente en el almacenamiento (Martínez *et al.*, 2013). La prevención de los contaminantes que entran en la producción de alimentos es una mejor práctica que intentar para mejorar la inocuidad de los alimentos contaminados. Uno de los principales contaminantes que afectan gravemente al sector agrícola y pecuario por la contaminación de los alimentos principalmente los cereales, siendo el maíz un huésped natural de las micotoxinas, que son producidos por hongos que se encuentran en los alimentos y causan fuertes pérdidas económicas.

El maíz, por ser una fuente rica en carbohidratos tiene un riesgo potencial de contaminación por hongos especialmente toxigénicos (Leiko *et al.*, 2004). Los polisacáridos complejos como celulosa y almidón son buenos sustratos para el crecimiento de hongos, es por esto que el maíz proporciona las condiciones óptimas para el desarrollo de hongos filamentosos, principalmente el género *Aspergillus* (Soares *et al.*, 2013).

### **1.3. HONGOS AFLATOXICOGÉNICOS**

La presencia de micotoxinas como patógenos potencialmente tóxicos, son causantes de pérdidas importantes año con año, de los productos agrícolas principalmente los cereales, se contaminan en campo, cosecha, traslado y almacenamiento, estos productos contaminados con hongos aflatoxigénicos pueden causar la muerte de los animales y en casos extremos del ser humano (Arrúa *et al.*, 2012). Dentro de las micotoxinas, se destacan las aflatoxinas (AF) por su toxicidad y potencial cancerígeno.

Por estas razones el estudio de los hongos aflatoxigénicos adquiere cada vez mayor importancia. Es importante encontrar las herramientas correctas para la identificación a tiempo de los contaminaste naturales como lo son los hongos, que son, de alto riesgo que su presencia implica. El género *Aspergillus*, es el de mayor importancia económica para los agricultores y ganaderos.

#### **1.3.1. Género *Aspergillus***

En 1729 el *Aspergillus* fue catalogado por primera vez por el biólogo italiano Pier Antonio Micheli. Usó el nombre "*Aspergillum*" por parecerse el hongo al instrumento usado para dispersar agua bendita. La descripción hecha por Micheli de este género de hongo en su obra *Nova Plantarum Genera* tiene importancia histórica, al ser reconocido como el punto

inicial de la ciencia de la micología (Klich, 2002). *Aspergillus* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza (Klich y Samson, 2007).

Aproximadamente 50 nuevas especies de *Aspergillus* fueron descritas a partir de 2000, basándose en características morfológicas (figura 2) y moleculares siendo muchas de ellas imposibles de diferenciar morfológicamente (Klich, 2009). La identificación a nivel de género es sencilla mediante características morfológicas; sin embargo, a nivel de especies se complica. La taxonomía de *Aspergillus*, se fundamenta hasta el siglo pasado, en características fenotípicas (Arrúa *et al.*, 2012).

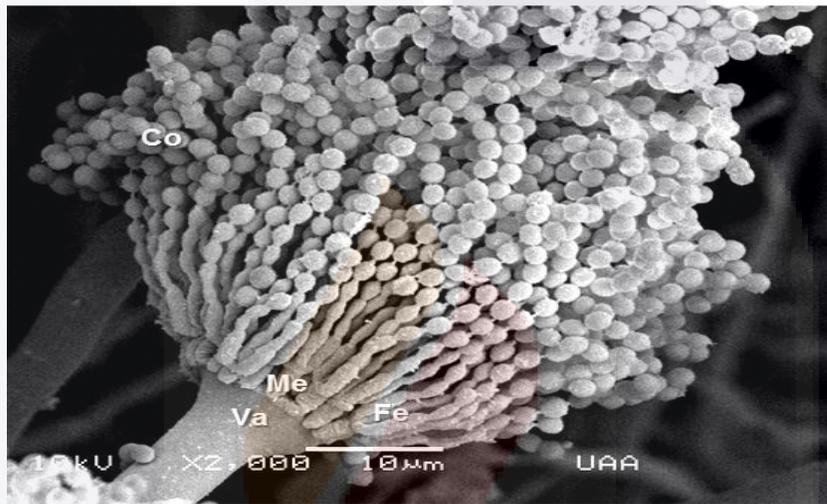


Figura 2. Estructura morfológica del género *Aspergillus*. Cabeza conidial biseriada: Co = Conidio, Fe = Fiálide, Va = Vesícula, Me = Métula (datos tomados de Méndez, 2015)

El género *Aspergillus* es ubicuo, se aísla de diferentes sustratos y se presenta con mayor frecuencia en climas cálidos (Soriano, 2007); algunas especies son de interés industrial; otras, por ser un agente de bio-deterioro debido a su capacidad de producir micotoxinas, puede ser patógeno para los animales y los humanos. Las colonias de las especies de este género son de desarrollo rápido, con tonalidades: blanquecinas, amarillentas, marrón-amarillentas, negruzcas, marrón-negruzcas o verdosas. El crecimiento de *Aspergillus* y la contaminación de los productos alimenticios con aflatoxinas son consecuencia de la interacción entre el hongo, el hospedero y el ambiente (Martínez *et al.*, 2013). La diversidad genética dentro de poblaciones de *A. flavus* ha sido ampliamente estudiada en relación con su potencial de producción de aflatoxinas y su relación con las variantes morfológicas L (400µm o más) y S (menores a 400µm) denominadas así de acuerdo al tamaño de los esclerocios que producen (Perrone *et al.*,

2007). La síntesis de aflatoxinas y sus metabolitos precursores se asocia también a una mayor producción de conidios (Wilkinson *et al.*, 2004).

### **1.3.2. *Aspergillus sección flavi***

La sección de *Aspergillus Flavi* incluye históricamente especies con conidios, cabezas en tonos de amarillo verdoso a marrón y esclerocios oscuros (Varga *et al.*, 2011), Varias especies han sido descritas en el pasado que fueron asignado a la sección *Flavi* de *Aspergillus*, principalmente basado en métodos tradicionales (parámetros morfológicos, incluyendo el diámetro de la colonia, color y textura, tamaño y textura de conidios y conidióforos, estructura (Klich, 2002).

### **1.3.3. *Aspergillus flavus***

*Aspergillus flavus*, es un patógeno parásito facultativo, que tiene la capacidad de colonizar una cantidad de cultivos comunes especies que incluyen maíz, algodón, cacahuets y muchos otros cultivos (Fountain et al 2014).

Las 22 especies de *aspergillus flavus* se agruparon en siete subtipos, dentro de esta sección se clasifican especies productoras de AF como *A. flavus* y *A. parasiticus*, que se encuentran y se desarrollan en casi todos los productos agrícolas, se incluyen también especies que son utilizadas para la fermentación de alimentos las cuales son, *A. Orizae*, *A. Sojae*, *A. Tamarii*. Estas especies son consideradas domesticas (Vargas *et al.*, 2011)

El maíz es su principal huésped, es un microorganismo saprófito que su hábitad natural es el suelo y se alimenta de materia orgánica de cultivos anteriores, que cuenta con fuentes de carbono y nitrógeno para su crecimiento y desarrollo al tener las condiciones óptimas se coloniza muy favorablemente, su reproducción es por esporulación asexual, pero cuando las condiciones no son adecuadas para su reproducción asexual se convierten en esclerocios que sobreviven por un largo tiempo (Petterson, 2011).

### **1.3.4. *Condiciones para el crecimiento de hongos Aspergillus***

La mayoría de las especies del género *Aspergillus* son hongos filamentosos saprófitos que desempeñan un papel esencial en la degradación de la materia orgánica. Su hábitad natural es el suelo donde sobreviven y se desarrollan sobre materia en descomposición. Este género es uno de los más abundantes en la naturaleza y puede encontrarse en cualquier ambiente; se reproduce por conidios cuya germinación da origen a las hifas.

Para su crecimiento, *Aspergillus* requiere de una humedad relativa entre el 70 y 90 %, contenido de agua en la semilla entre 15 y 20 % y un rango de temperatura amplio (0 a 45 °C) (Martínez *et al.*, 2013).

#### **1.3.4.1. Actividad de agua (aw).**

La actividad de agua (aw) es la porción que está disponible de agua en el sustrato que puede aprovechar el hongo, al igual que la temperatura son los factores más importantes para un buen desarrollo fúngico, en el campo de las micotoxinas la aw es un parámetro para que la micotoxinas se acumulen en los alimentos principalmente cereales, en pre cosecha y otras en pos cosecha, la presencia de AF en maíz se manifiesta por la contaminación en campo de *A. flavus*. Para *A. flavus* y *A. parasiticus* crece en 0,99 aw estando la aw mínima para su crecimiento entre 0,80 y 0,83. Las AF, sin embargo, se producen en el intervalo 0,95 y 0,99 aw (Soriano, 2007)

#### **1.3.4.2. Concentración de iones hidrógeno (pH).**

Los hongos crecen en un rango amplio de pH, entre 3 y 8 pero su óptimo crecimiento es de 5, aunque el pH no es un condicionamiento importante para el crecimiento y desarrollo del hongo, como lo es la aw y la temperatura, cuando el pH cambia en el sustrato o alimento se altera la respuesta fúngica al resto de los factores (Soriano, 2007).

#### **1.3.4.3. Temperatura**

*A. flavus* y *A. parasiticus* requieren una temperatura para su buen desarrollo de 10 a 43 °C, con una óptima entre 32 y 33 °C, las AF se producen entre 12 y 40 °C, los niveles más altos de AF producidas por *A. flavus* en caldo de cultivo se ha observado a 25-30 °C (Soriano, 2007).

#### **1.3.4.4. Disponibilidad de nutrientes.**

El campo es una fuente de nutrientes (glucosa, proteínas, CO<sub>2</sub>), que ofrece para los microorganismos presentes en el suelo, con la gran biodiversidad microbiana de diversos grupos de microorganismos, como virus, bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoos. Los hongos del género *aspergillus*, predominan en climas templados; sin embargo, todos los hongos son regulados por la cantidad y calidad del sustrato (Pacasa *et al.*, 2017) que está presente en el suelo, después de la cosecha de productos agrícolas principalmente. Los mohos *Aspergillus* sección Flavi pueden sobrevivir durante largos

periodos de tiempo y permanecer en el suelo con los residuos contaminados de plantas de cosechas anteriores, para iniciar el ciclo de infección en nuevas plantas hospedadoras. Los principales factores que influyen en la permanencia de estos hongos en el suelo son la temperatura del suelo, la humedad y las prácticas agronómicas llevadas a cabo sobre ese suelo (Reyes *et al.*, 2013), cuando encuentra las condiciones adecuada produce la AF. *A. flavus* es un microorganismo oportunista que coloniza fácilmente un substrato 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).

#### 1.4. AFLATOXINAS

Las AF son metabolitos secundarios producidos principalmente por hongos del genero *aspergillus*, principalmente *A. flavus* y *A. parasiticus*, que son los que producen las principales aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) como se muestra en la (tabla 4) (Alpizar, 2015), Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 1983), las cuatro sustancias principales se distinguen por sus colores fluorescentes B, correspondiente al color azul, y el G, correspondiente al verde, con subíndices que indican la movilidad cromatográfica relativa (Requena *et al.*, 2005). Siendo la AFB<sub>1</sub> la de más importancia económica, al ser metabolizada por la vaca se deriva la AFM<sub>1</sub> que es liberada en la leche.

Tabla 4. Principales hongos que producen micotoxinas.

Hongos	Micotoxinas que producen
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas B1 y B2
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Toxina T-2, Desoxinivalenol (nivalenol) y Zearalenona
<i>Fusarium moniliforme (F. verticillioides)</i>	Fumonisina B1
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ocratoxina A
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ocratoxina A

Fuente: (Alpizar, 2015).

*A. flavus* en condiciones apropiadas es capaz de infectar los granos de maíz, en condiciones de campo, cosecha y almacenamiento (Scarpari *et al.*, 2014). La composición de la semilla que está constituida principalmente de lípido, que afectan la susceptibilidad de infección de hongos productores de micotoxinas.

Las condiciones de crecimiento favorables para *A. flavus* son de 28-30°C, cuando los conidios (esporas) encuentran una fuente de nutrientes adecuada y las condiciones ambientales favorables como se muestra en la (figura. 3), el hongo coloniza rápidamente y produce AF exitosamente (Lakkireddy *et al.*, 2014). Con las condiciones adecuadas que ayudan a la infección de la planta, la presencia del hongo se manifiesta por daño por estrés hídrico, insectos, contaminación del suelo y de almacenamiento.



Figura 3. Ciclo de vida del hongo *aspergillus* (*A. flavus*) en maíz, estadio saprofitas y patogénicas. Fuente (Lakkireddy *et al.*, 2014).

*A. flavus*, se desarrolla de especial forma en los granos de maíz; Los granos de maíz se encuentran entre los productos agrícolas con mayor susceptibilidad a la contaminación con AF, el maíz es uno de los productos agrícolas que presenta mayor contaminación por hongos y AF (Reyneri ,2006 y Soares, 2013) De Luna *et al.* (2013), Evaluaron varios genotipos de maíz para observar su resistencia que presentan 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. *A. flavus* es un microorganismo saprófito que se encuentra en el suelo, oportunista que coloniza fácilmente cuando hay una rica fuente de carbono y nitrógeno, bajo condiciones ambientales extremas forman esclerocios capaces de sobrevivir por muchos años.

*A. flavus* es un patógeno oportunista de cultivos, especialmente de los que contienen aceites y carbohidratos, como el maíz, cacahuate y algodón. El hongo es un huésped natural del suelo, se encuentre de forma de conidios o esclerocio, principalmente se encuentra o se aloja en los tejidos de las plantas como micelio (Klich, 2007).

Las altas temperaturas y el estrés por sequía, son factores que, durante el periodo de desarrollo de la semilla y la maduración, permiten que las plantas sean inmunes a ataque de patógenos ya sea por el agrietamiento de las partes de la planta, permitiendo la entrada de esporas que son trasladadas por el viento, insectos y aves (Carbajal, 2013).

#### **1.4.1. Importancia de las aflatoxinas en el ámbito agropecuario**

La capacidad que tienen los hongos para utilizar diversos tipos de sustratos y la producción de una gran diversidad de micotoxinas que están presentes en todos los productos agrícolas y subproductos, los cuales pueden dañar al hombre de manera directa o indirecta, ya que contaminan y degradan productos que son útiles para la economía humana, al contaminar los productos agrícolas que son destinados a la alimentación animal y humana (SAGARPA, 2016).

El género *Aspergillus*, a diferencia de los hongos de campo, es considerado un hongo de almacén y su principal característica es que tiene la habilidad para invadir los granos con contenidos de humedad relativamente bajos; en cereales con contenido de humedad mínimo del 13.0% y en oleaginosas de 8 a 9%. Este hongo *Aspergillus* puede crecer en un rango de temperaturas amplio (Arias, 1993). Los daños principales ocasionados por los hongos de almacén, cuyo hábitat natural generalmente se encuentra en los almacenes, silos y trojes, son: reducción del poder germinativo, ennegrecimiento total o parcial de los granos, calentamiento, hedor, cambios bioquímicos diversos, pérdida de peso y producción de micotoxinas. Precisamente, estas micotoxinas al ser ingeridas pueden ser dañinas por lo que se establecen niveles máximos de contenido de aflatoxina en alimentos (tabla 5), ocasionando diversos trastornos severos en los humanos y los animales que consumen dichos granos o alimentos contaminados.

## 1.6. NIVELES MÁXIMOS PERMISIBLES DE AFLATOXINAS EN ALIMENTO

### 1.6.1 Legislación de la Unión Europea (UE) Alimentos para animales

En la tabla 5, se muestran los niveles permitidos según la unión europea, para los niveles permitidos de aflatoxinas en alimentó destinado al ganado lechero

Tabla 5. Legislación de la Unión Europea (UE)

Alimentos con una humedad de 12%.	Aflatoxina B1 Los límites máximos en $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb)
Todas las materias primas para alimentación animal	20
Alimento completo para bovinos	20
Alimento completo para becerro	10
Alimentos completos para ganado lechero	5
Otros alimentos complementarios	5

### 1.6.2 Norma Oficial Mexicana (NOM-188-SSA1-2002)

La Norma Oficial Mexicana (NOM-188-SSA1-2002) para el control de aflatoxinas en cereales establece un límite máximo permisible de aflatoxinas en los cereales destinados para el consumo humano y animal, así como los lineamientos y requisitos sanitarios para el transporte y almacenamiento de los granos. Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que se dedican a su proceso o importación. Límites permitidos para consumo animal. Los cereales con una concentración mayor de 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de AF y que se destinen para consumo directo o como parte de alimentos procesados. Lo que recurren a métodos de identificación de AF ya sea físicos, químicos y biológicos, siendo este último el del principal estudio.

## 1.7. MÉTODOS DE CONTROL PARA AFLATOXINAS

Las aflatoxinas en la actualidad han sido de gran importancia para la investigación dentro de las sustancias denominadas micotoxinas por su alta incidencia en alimentos destinado para la alimentación del ganado lechero y de la población, porque su consumo en dosis bajas, medias o altas, causa tanto efectos tóxicos en corto tiempo (agudos), como aquellos que pudieran manifestarse a largo plazo (crónicos), siendo esta la más común en

animales y humanos (Martínez *et al.*, 2013) por lo que están buscando estrategias para controlar la contaminación .

La descontaminación se refiere a los métodos por los cuales las micotoxinas son eliminadas o neutralizadas de los alimentos, mientras que la detoxificación son los procedimientos para reducir las propiedades tóxicas de las micotoxinas. El método de descontaminación o detoxificación ideal debe ser fácil de usar, económico, no formar compuestos más tóxicos que la micotoxinas original y no alterar las propiedades nutricionales ni organolépticas de los alimentos. Existen diferentes métodos de descontaminación físicos, químicos y biológicos, aunque se suele usar combinaciones entre ellos (soriano 2007). Existen diferentes métodos de descontaminación físicos, químicos y biológicos, aunque se suele usar combinaciones entre ellos.

### **1.7.1 Métodos físicos**

Estos métodos incluyen: extracción con solventes, adsorción, inactivación por calor e irradiación. Son un conjunto de técnicas y estrategias cuyo objetivo es eliminar la porción contaminada por AF de los insumos agrícolas; sin embargo, estas técnicas resultan ser poco prácticas además de que tienen el inconveniente de disminuir el valor nutritivo de los ingredientes alimenticios. Estas estrategias han sido aplicadas para la inactivación o reducción de las AF en los productos agrícolas que se destinan a la alimentación del ganado lechero (Kabak, 2010). Entre estas estrategias están los tratamientos térmicos y la irradiación.

**-Tratamiento térmico:** La mayoría de las micotoxinas son resistentes al calor dentro del rango del procesamiento convencional de alimentos temperaturas (80-121°C), por lo que se produce una reducción pequeña o nula en los niveles generales de toxinas como resultado de las condiciones normales de cocción, tales como hervir y freír, o incluso Después de la pasteurización, El nivel inicial de contaminación, tipo de micotoxinas y su concentración, la temperatura y el tiempo de calentamiento y el grado de la penetración del calor, así como el contenido de humedad, pH y fuerza iónica de los alimentos, Entre otros factores, juegan un papel importante en el logro de la degradación de toxinas.

**-Irradiación:** Radiación que involucra rayos X, rayos G, haz de electrones, radiación UV y energía solar. Se ha demostrado que destruye las micotoxinas.

### 1.7.2. Métodos químicos

Una variedad de químicos, incluyendo ácidos, bases, reactivos oxidantes, agentes reductores, Se han analizado agentes colorantes y reactivos diversos para desintoxicar las micotoxinas. El éxito del proceso de desintoxicación mediante tratamientos químicos altamente depende del tipo de alimento y / o alimento. El uso de productos químicos en combinación, con tratamientos físicos como el tratamiento térmico para la desintoxicación de alimentos (Kabak, 2010).

**-Tratamiento ácido:** De la evidencia acumulada se desprende claramente que el tratamiento de aflatoxinas con los ácidos destruyen la actividad biológica de AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub> al convertirlos en El hemiacetal forma AFB<sub>2a</sub> y AFG<sub>2a</sub>, respectivamente, debido a la adición catalizada por ácido de Agua a través del doble enlace en el anillo de furano (Heathcote y Hibbert, 1978). Se ha demostrado que el tratamiento con HCl (pH 2) reduce los niveles de AFB<sub>1</sub> en un 19,3% dentro de 24 h (Doyle *et al.*, 1982).

**-Tratamiento con Bases:** son productos químicos que contienen sustancias alcalinas, la amoniación ha demostrado ser un eficaz, método para desintoxicar productos agrícolas contaminados con aflatoxinas. Se ha demostrado en algunos casos disminuir los niveles de aflatoxinas en más del 75% (Burgos *et al.*, 2002).

**-Agentes oxidantes:** Es bien sabido que las aflatoxinas como AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFM<sub>1</sub> que poseen un doble enlace terminal en el anillo de dihidrofurano es más susceptible de ser atacado por el ozono (O<sub>3</sub>) y otros agentes oxidantes distintos (AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>2</sub> y AFM<sub>2</sub>), que carecen de este doble enlace (McKenzie *et al.* 1997). Se ha informado que el ozono reduce la AFB<sub>1</sub> y la AFG<sub>1</sub>. Niveles en 77% y 80% respectivamente en maní después del tratamiento a 75 ° C durante 10 minutos. El peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), uno de los agentes oxidantes, se ha utilizado a escala comercial para desintoxicar la aflatoxina. El tratamiento de los higos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.2% causó una reducción del 65.5% en Niveles de AFB<sub>1</sub> después de un almacenamiento de 72 h (Kabak, 2010).

### 1.7.3. Métodos biológicos

La principal tecnología potencialmente útil para realizar el control de la contaminación de alimentos pecuarios por micotoxinas es realizada mediante la utilización de microorganismos no toxigénicos. La aplicación de cepas no aflatoxigénicas de *A. flavus* reducen claramente la contaminación por aflatoxinas de los productos agrícolas, incluidos

los cacahuetes (Dorner *et al.*, 2003), maíz y semilla de algodón con el AF-36 (Cotty, 1994), principalmente a través de competición por el sustrato y por la producción de metabolitos inhibidores. Eso También se ha informado de que algunos microorganismos tienen la capacidad de disminuir el crecimiento del fúngico.

Uno de los principales problemas con los que se enfrentan los productores, es la de la contaminación de alimento destinado al ganado lechero, por la cual se están usando secuestrante para disminuir la presencia micotoxinas, por lo que se necesita hacer estudios sobre la eliminación de las AF presentes en la dieta del ganado lechero.

#### **1.7.4 ANTECEDENTES DEL CONTROL BIOLÓGICO DE AFLATOXINAS**

El control biológico de las aflatoxinas se basa, en promover la interacción de cepas de *Aspergillus* no toxicogenicas con cepas que si tienen la capacidad de producir estas micotoxinas. Ya se ha demostrado, cuando menos experimentalmente, que cuando crecen simultáneamente ambos tipos de cepas ocurre una disminución de la cantidad de AFs producidas. El fundamento del fenómeno se basa en la evidencia de que la generación de estas micotoxinas tiene un costo metabólico alto que pone en desventaja a las cepas toxicogénicas frente a las que no lo son.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 HIPÓTESIS

Los aislados de *Aspergillus flavus* no aflatoxicogénicos poseen la capacidad de disminuir la contaminación con aflatoxinas del ensilaje de maíz empleado en la dieta de vacas lecheras.

### 2.2 OBJETIVOS

#### 2.2.1 *Objetivo General*

Evaluar en un modelo experimental, la eficacia de aislados de *Aspergillus flavus* no aflatoxicogénicos para disminuir la contaminación con aflatoxinas del ensilaje de maíz empleado en la dieta de vacas lecheras.

#### 2.2.1 *Objetivos específicos*

- Diseñar e implementar bajo condiciones controladas un modelo experimental de micro-ensilaje de maíz.
- Diseñar e implementar un modelo experimental de inoculación de granos inmaduros de maíz *in situ* e *in vitro*.
- Evaluar los efectos del ensilaje experimental mediante los cambios en la cantidad de UFC de *Aspergillus spp.* y las características bromatológicas.
- Cuantificar la concentración de aflatoxinas presentes en el ensilaje experimental.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Ciencias Agropecuarias, en el laboratorio de Investigación del Centro de Ciencias Agropecuarias. Así como invernadero número seis del Área Agrícola de la Posta de la UAA, -la cual se ubica en el municipio de Jesús María, Aguascalientes. Este municipio se localiza a once kilómetros de la capital del estado, en la parte del oeste del estado, con las coordenadas 21°58'21.9"N 102°21'46.6"O, con una altitud promedio de 1,880 metros sobre el nivel del mar (INAFED, 2010).



Figura 4. Área Agrícola del Centro de Ciencias Agropecuarias de la

Fuente: Google maps: <https://www.google.com.mx/maps/@21.9726413,-102.3631317,144m/data=!3m1!1e3>. Obtenido el 24 de abril de 2017.

#### 3.2 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se utilizó un diseño de bloques incompletos al azar. Los tratamientos se diseñaron en base a la disponibilidad de tres cepas aisladas de alimento concentrado (AC) denominadas AC1, AC2 y AC3, así como otras tres aisladas de ensilaje de maíz (EM), (EM1, EM2 y EM3) que se utilizaban en la dieta de ganado destinado a la producción lechera. Estos seis aislados se compararon contra un testigo no aflatoxigénico (AF-36) y contra dos testigos (Cuautitlán y Tamaulipas) a los que se ha demostrado (de Luna *et al.*, 2013) que poseen la capacidad para producir aflatoxinas.

En la tabla 6, se muestra como se realizaron los tratamientos, teniendo nuestro control, muestras sepas AF- y AF+, también se incluyó la prueba de biocontrol utilizando cepas AF- vs AF+ para realizar una interacción entre las dos cepas de *aspergillus favus*.

Tabla 6. Formación de bloques experimentales y combinación de tratamientos utilizados para inocular esporas de *A. flavus*.

Cepas	Bloque			
	Control	Sin interacción (AF <sup>+</sup> )	Sin interacción (AF <sup>-</sup> )	Interacción (AF <sup>-</sup> vs AF <sup>+</sup> )
Inocuidad	Testigo, Sham			
Controles		Cuautitlán (C), Tamaulipas (T)	AF-36, AF-EM1	
Aislados locales		AF-AC1, AF-AC2, AF-AC3, AF-EM2, AF-EM3		
Prueba de biocontrol				(AF-36, AF-EM1) vs (C, T, AF-AC1, AF-AC2, AF-AC3, AF-EM2, AF-EM3)

NOTAS. Testigo: Apertura de brácteas más solución de dilución; Sham: sólo apertura de brácteas; AF: *Aspergillus flavus*; AC: Alimento concentrado; EM: Ensilaje de maíz

Este diseño de bloques incompletos se aplicó en un cultivo de maíz en invernadero (*in situ*), así como en un cultivo del hongo sobre granos inmaduros de maíz en condiciones de laboratorio (*in vitro*). En esta segunda etapa *in vitro*, se cuantificaron las variables antes de la fermentación de la planta completa como después de que el material vegetal se sometió al proceso de ensilaje (post-fermentación).

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); cuando se obtuvo un valor significativo en el ANDEVA, se realizó la comparación de las medias de bloque mediante la prueba de diferencia honestamente significativa (DHS) de Tukey, considerando un nivel de significancia de  $P < 0.05$ .

### 3.3 PRODUCCIÓN DE MAÍZ EN INVERNADERO

El invernadero se acondicionó realizando las prácticas culturales tradicionales y Se seleccionó la semilla la variedad de maíz P3055W de la casa comercial PIONNER, de ciclo de crecimiento intermedio (100-120 días a floración), que en estudios anteriores se

sabe que es susceptible a la contaminación del hongo *Aspergillus*, (de Luna *et al.* 2013) se realizó la prueba de germinación conteniendo un 98% de germinación (figuras 5) para posteriormente ser trasplantadas en las macetas en el invernadero, se utilizó, suelo vegetal (inerte), agua y un macetade 19 L, las variables agronómicas que se evaluaron son: altura de planta, numero de hojas, numero de mazorcas, Ph, temperatura y húmedas



Figura 5. a y b) Selección de la semilla p3055w, c) prueba de germinación d) prueba de inocuidad.

Después de realizar todas las pruebas pertinentes del material vegetativo que se utilizó en el estudio se pasó a sembrar y la distribución de las plantas para este estudio. Durante su fenología de maíz se estuvieron monitoreando la humedad y temperatura como se muestra en la (figura 6), para que el cultivo no tuviera un estrés hídrico y fuera alterar los resultaos en la producción de ensilaje de maíz (figura 7) y así obtener un ensilaje de buena calidad.

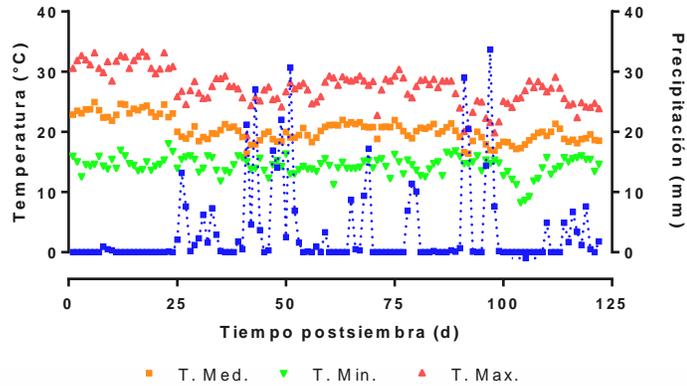


Figura 6 secuencia de la temperatura y precipitación durante el ciclo del cultivo del maíz forrajero

### 3.4. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE *A. FLAVUS*

La suspensión de esporas utilizada como fuente de inóculo se preparó a partir de cultivos del hongo en papa-dextrosa-agar (PDA) con ocho días en incubación a 25 °C. Se resuspendieron las esporas en agua destilada con Tween 20 al 0.2%, obteniendo una suspensión  $1 \times 10^6$  /mL. (Quesada *et al.*, 1986, Quezada *et al.*, 2011). Se adicionó aceite parafínico al 1.0% como fijador (Valdivia *et al.*, 2010). Se obtuvieron cepas de *Aspergillus flavus* no tóxicas genéticas (AF-) y toxigenas (AF+), con estas cepas se realizó una interacción entre cepas como se muestran en la (figura 8).

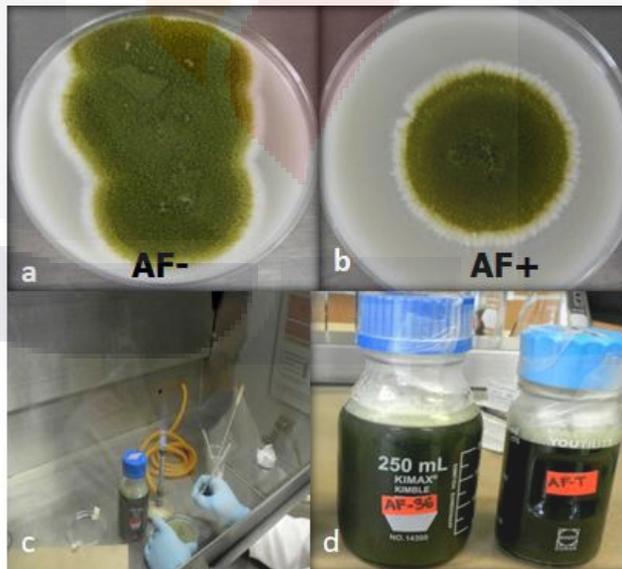


Figura 7. a) Aislados de *Aspergillus flavus* (-), b) aislado de *Aspergillus flavus* (+), c y d) obtención de esporas

### 3.4. INOCULACIÓN DEL PATÓGENO *IN SITU*

La inoculación del patógeno se realizó cuando las coloraciones de los estilos de las mazorcas comienzan a adquirir una tonalidad café- verdosa a café- rojiza, debido a que se encuentran en la etapa fisiológica posterior a la polinización aproximadamente 90 días después de la germinación (Quezada *et al.*, 2011). Se realizó por el método 3 utilizando la metodología de Quesada (1986), que consiste en abrir algunas brácteas (hojas) de la mazorca con un bisturí (figura 9) se colocaron  $5 \times 10^6$  /mL esporas, en las distintas aberturas que se realizaron a la mazorca para que el inóculo se dispersara uniformemente, principalmente se depositaron en los canales de la mazorca de las, finalmente se colocaron las brácteas en su lugar para ser tapadas con una bolsa de papel #6, para evitar contaminación no deseada que nos pudiera afectar con los resultados.

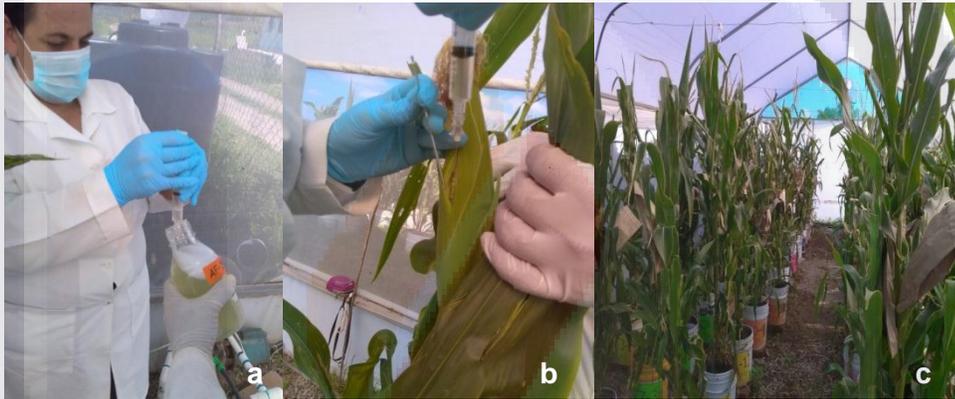


Figura 8 a) Preparación del inóculo, b) aplicaciones inóculo, c) colocación de la bolsa de papel.

### 3.5 INOCULACIÓN DE GRANOS INMADUROS DE MAÍZ *IN VITRO*

El maíz se cosechó 100 días después de la siembra. Fueron colocados en bolsas de papel para la deshidratación en un horno (55 ° C / 13 días) y el contenido inicial de humedad se calculó para cada genotipo. Los granos fueron recogidos de mazorcas deshidratadas y mantenidos en contenedores herméticos. Antes de la inoculación de hongos, los granos eran asignados en envases de vidrio con tapas (400 g / contenedor) y esterilizados (121 ° C, 15 min).

Inoculación de granos con esporas de *A. flavus* Cepas de *A. flavus* de toxigénico y cepas no toxigénicas, en la misma forma de tratamientos ya utilizados. Las cepas fueron cultivadas en placas de Petri con agar de papa dextrosa e incubados a 27 ° C durante 10 días. Para obtener esporas, Petri los platos se lavaron con Tween 20 al 0,1%. Espora la concentración se calculó usando un hemocitómetro para obtener una solución madre (5 x

10<sup>6</sup> esporas / m), para inocular. Se añadió aceite de parafina (1%) como fijador a las esporas, Los granos de maíz se inocularon usando una técnica estéril no invasiva con 5 ml de inóculo (6 x 10<sup>6</sup> esporas / g de grano), y la humedad se ajustó a 15% mediante la adición de agua destilada estéril. Los frascos eran agitados diariamente para prevenir la adhesión, cada tratamiento fue adherido a micro ensilajes previamente realizados sin ninguna inoculación.

### 3.6. ELABORACIÓN DE MICRO-ENSILAJES

A los 115 días después de la germinación se pasó a ensilar el material vegetativo, la literatura menciona que el corte debe realizarse a 12 cm de altura del suelo agrícola para evita contaminación del suelo, en este estudio la siembra se realizó en macetas con tierra vegetal estéril y arena previamente esterilizada, el corte se realizó con una rozadera previamente esterilizada, para después ser trasladado al área pecuaria para ser picado con una picadora de forraje y obtener una partícula de 1 a 2 cm, entre cada tratamiento la maquina fue desinfectada con cloro y/o alcohol entre cada tratamiento al momento de picar, para eliminar cualquier residuo entre tratamientos y nos pueda modificar los resultados, posteriormente se pesaron 1.5 kg, como se muestra en la (figura 10), posteriormente, se depositaron en una bolsa de plástico de 30 x 40 cm para realizar los micro ensilajes, con una prototipo de compactación, antes del sellado se extrajo el aire utilizando una bomba de vacío , considerando que el vacío aplicado en los micro-ensilajes entre ellos fue el mismo.



Figura 9 a) ensilaje de maíz b) prototipo de micro-silo, c) extracción del oxígeno d) 1.5 kg f y g) almacenamiento tambos.

### 3.7 MUESTREO DE MICRO-ENSILAJES DE MAÍZ

La calidad organoléptica de los micro ensilajes se evaluó como se observa en la (figura 11), donde se evaluó color, olor y textura, las muestras evaluadas, se pasaron a secar en una estufa de alta temperatura con circulación forzada de aire (of-226 JE01- TECH, Lab Companion, Corea) a 60°C durante 24 horas, y se molerán en un molino universal de funcionamiento continuo, hasta obtener un tamaño de partículas de 500 y 800µ. Las muestras secas y molidas se almacenarán en refrigeración dentro de bolsas con cierre hermético con los datos correspondientes a cada muestra. Para realizar los siguientes análisis de laboratorio: cenizas, materia orgánica (MO), proteína cruda (PC), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), (AOAC, 1990).



Figura 10. Evaluación ensilajes de maíz. a) Muestra de ensilaje, b) Evaluación de olor y color, c) Evaluación de textura, d) secado de la muestra

### 3.8 IDENTIFICACIÓN DE UFC

3.8.1 .MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS (técnica de vaciado en placa por diluciones)

Para el procedimiento de la cuantificación de UFC se utilizó la metodología (Camacho *et al.*, 2009). Para el medio de cultivo (PDA), pesar 39 gr de papa dextrosa agar, se

disolvieron en un litro de agua destilada, el preparado se agitó frecuentemente hasta su ebullición. Se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos.

El medio estéril se vació dentro de una campana de flujo laminar vertical clase II tipo A2, se introdujo el medio de cultivo estéril, las cajas de petri estériles, un marcador permanente, tijeras, un atomizador con alcohol al 96% y algodón; todo el material requerido para vaciar el medio se dejó dentro de la campana de flujo laminar bajo luz ultravioleta (UV) durante 15 minutos.

Se vierten el medio en cada caja de petri, se dejaron enfriar durante 15 minutos dentro de la campana y se tapan, se almacenan en refrigeración después de solidificado el medio, para su posterior uso.

Se pesa g del polvo de peptona de caseína y se disuelve en un litro de agua destilada, se esteriliza en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos, para tener una solución estéril de peptona de caseína al 0.1%.

Se pesaron 10 g de las muestras molidas, se diluyeron en 90 mL de peptona de caseína al 0.1% y se obtuvo una dilución de 1:10, de esta dilución se tomó un mL que se colocó en un tubo estéril con 9 mL de peptona de caseína al 0.1% y se obtuvo una dilución 1:100, de esta dilución se tomó nuevamente un mL que se depositó en un tubo estéril con 9 mL de peptona de caseína al 0.1% y se obtuvo una dilución 1:1000, finalmente se tomó un mL de esta dilución y se pasa a un tubo estéril con 9 mL de peptona de caseína al 0.1% y se obtiene una dilución final de 1:10000). Se inocularon 100  $\mu$ L de cada dilución en una caja petri con PDA, las cajas se taparon, se incubaron a 27°C durante un periodo de 72 a 120 h.

### **3.9 EXAMEN BROMATOLÓGICO DE ENSILAJES DE MAÍZ**

#### **3.9.1 Humedad y materia seca**

Para la obtención materia seca, se lavaron las cajas de aluminio perfectamente con agua y detergente, después Enjuagarlas con agua destilada y posteriormente con éter, después se introdujeron las cajas de muestra en la estufa (100 -115 °C) hasta peso constante por 4 horas aproximadamente) colocando la tapa en la base de la caja, posteriormente se Enfriarlas en desecador para evitar la hidratación, para después Pesar las cajas de aluminio en la balanza analítica, para después Depositar dentro de la caja de 1 a 1.5 g de la muestra y registrar su peso exacto, las muestras se Secaron en la estufa de 100 a 105 °C hasta peso constante (aproximadamente 24 horas), después que transcurrieron las 24

horas se retiraron las caja con su contenido, se tapanla y enfriarla en el desecador, estas muestras ya enfriadas se pesaron en la balanza analítica, usar pinzas en todas las manipulaciones como se muestra en la (figura 12) para después se sacaron los Cálculos. con las siguientes formulas

- 

$$\text{Pesarla \% de humedad total} = \frac{\text{pérdida de peso en g X 100}}{\text{g de muestra}}$$

$$\% \text{ de materia seca parcial} = 100 - \% \text{ de humedad}$$



Figura 11. Medición de humedad y materia seca. a) Peso del crisol, b) identificación del crisol, c) crisoles dentro de la mufla con la muestra, d) secado mufla.

### 3.9.2 Extracto etéreo o grasa cruda

- Se pesaron por diferencia 2 g de muestra y se introdujeron en el dedal para posteriormente se taparon con un trozo de algodón seco, se colocó el dedal que contiene la muestra dentro del porta-dedal y fijarlo bajo del condensador del aparato de extracción, el vaso se pasó al desecador usando pinzas para manipularlo y depositar dentro del mismo 30 a 40 mL éter, unirlo a la rosca y colocarlo debajo del condensador cerrado herméticamente, se abrió la llave del agua y se subió las parrillas hasta que queden en

contacto con el vaso, se inició el calentamiento y se observó durante los primeros diez minutos de ebullición si hay fugas de éter. Cuando el nivel de éter permanezca constante puede se dejó solo el aparato y observarse periódicamente. A partir del inicio de la ebullición extraer durante 2 horas como mínimo, dependiendo de la muestra que se trate. Cuando se finalizó el tiempo de extracción se bajan las parrillas y dejar que el dedal termine de gotear, para después desenroscar el vaso de extracción y quitar el dedal que contiene la muestra, colocar en el lugar del dedal un recolector de vidrio, volver a colocar el vaso de vidrio y subir las parrillas calientes. Destilar el éter que se encuentra en el vaso de extracción y poco antes de que éste se evapore hasta sequedad, bajar las parrillas y retirar el vaso como se muestra en la figura 13. Vaciar el éter de los tubos recolectores a un recipiente especial para éter usado. Colocar el vaso en la estufa a 100 °C durante 40 minutos, enfriar en el desecador y posteriormente pesar.

$$\text{Cálculos: \% E. E.} = \frac{(\text{Peso del vaso con la grasa}) - (\text{Peso del vaso solo}) * 100}{\text{g. de muestra}}$$



Figura 12. Medición del extracto etéreo o grasa cruda. a) Dedal con la muestra, b) Método Goldfish c) vaso con la grasa obtenida, d) balcula analítica.

### 3.9.3 Determinación de proteína cruda

Se verifica las condiciones de los gases, temperaturas en el ambiente de monitor, Se corrieren 2 blancos. Usando el menú análisis en el inciso insertar blancos, con el fin de eliminar ruido por el nitrógeno ambiental. Se calibra con 5 estándares de EDTA marca LECO. Se pesan por duplicado .12g de muestra en un papel de estaño, con la cual se hicieron paquetes tipo kiss, en el menú principal análisis con la tecla selec se introduce el peso de muestra, y factor de conversión, identificación de la muestra, y se introduce la

muestra envuelta en estaño a loading heat se presiona la tecla next y star 2 veces. El tiempo de análisis es en promedio 2 minutos como se observa en la figura14. Para las repeticiones se siguen los pasos a partir del punto 3 por ultimo en el menú resultados se selecciona la opción estadística obtenemos el promedio y la desviaciónestandar.



*Figura 13. Medición de proteína cruda. a) peso de la muestra, b) acomodo de las capsulas con la muestra, c) inserción de la capsula para su medición, d) obtención de proteína de la muestra (%)*

### **3.9.4 Determinación de cenizas o materia inorgánica**

Se pesaron los crisoles previamente identificados, se pesó 1g de la muestra y se colocó en el crisol previamente identificado con el número de muestra. Para pasarlos pasan a la estufa a 600° C durante 2 horas, se pesaron los crisoles con las cenizas para sacar la diferencia (Figura 15).



*Figura 14 Determinación de cenizas o materia inorgánica. a) Identificación los crisoles b) peso de los crisoles c) combustión de la muestra d) peso del crisol con las cenizas.*

### **3.9.5 Determinación de fibra cruda o bruta**

Se pesaron las bolsas de filtración en balanza analítica ( $w_1$ ), después se pesaron directamente en la bolsa de filtración 1.0 g de muestra ( $W_2$ ), de tamaño de partícula 1 mm, también se pesó un blanco con una bolsa vacía incluirla en la digestión para determinar la corrección de bolsa ( $C_1$ ). El proceso se aprecia en la Figura 16. Se selló la bolsa a una distancia de 0.5 cm. De la abertura, se acomodó la muestra uniformemente dentro de la bolsa, si la muestra contiene grasa se recomienda colocar las bolsas con muestra en un frasco con 500 ml de acetona, agitando el frasco 10 veces dejar reposar 10 minutos. Repetir el procedimiento con acetona nueva el procedimiento. Y posteriormente sacar las bolsas de la acetona y ponerlas al aire durante 5 minutos para eliminar el residuo, se colocaron las 24 bolsas en las 8 charolas del suspensor de bolsas (tray) como se muestra en la figura 16. Se colocaron 3 bolsas por tray acomodadas a 120 grados, en relación uno con otra. El tray 9 se deja libre y actúa como el tope del tray 8. Después se adicionó de 1900 a 2000 mL de la solución de ácido sulfúrico (0.255 N) a temperatura ambiente en el vessel (contenedor de los tray), programando un tiempo de digestión ácida de 45 minutos. Se abre la válvula de salida de la solución caliente para reducir la presión interna. Para la digestión alcalina se agregaron 1900 a 2000 ml solución de hidróxido de sodio a (0.313 N) a temperatura ambiente; se programó el tiempo de digestión 45

minutos. Para el secado de las bolsas se sometió la muestra a 105 °C durante 2 a 4 horas y se enfrió en el desecador. El peso se registró como W3. Finalmente se colocó la bolsa en un crisol y se calcinó durante 2 horas a 550 °C y se registró el peso W4.

Para determinar la fibra se utiliza la siguiente fórmula:

$$FC = (W5 - (W1 \times C2)) \times 100 / W2 \times DM$$

Donde

- W1= peso de la bolsa sola.
- W2= peso de la muestra.
- W3 = peso de la bolsa con la fibra digerida.
- W4= peso de la bolsa con la fibra digerida y calcinada.
- W5= peso de la materia orgánica (M0) =W3- W4 C2= cenizas corregidas de la bolsa (blanco). 50 DM. Materia seca.

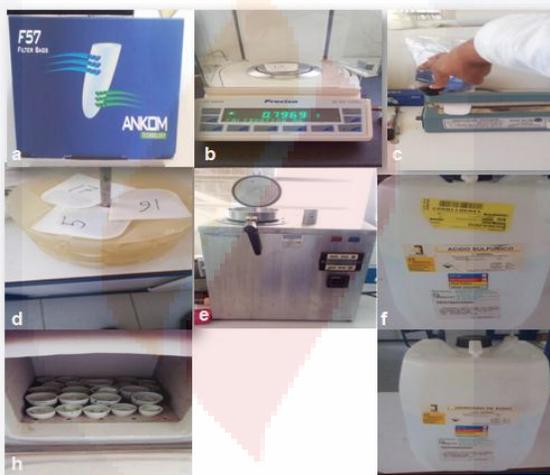


Figura 15 Determinación de fibra cruda o bruta. a) Filtros ANKOM F57 b) filtros c) filtros sellados con la muestra d) filtros en el Tray-e) Equipo Digestor/Analizador ANKOM 200/220 f) solución de ácido sulfúrico. g) Digestión alcalina, h) crisol.

### 3.10. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS

#### 3.10.1. Cromatografía en Capa Fina (TLC)

La cromatografía en capa fina es una técnica analítica rápida y sencilla, que permite determinar la identificación de compuestos de una mezcla mediante la formación del cromatograma, además comparar diferentes muestras entre sí. Las muestras a analizar se depositaron en forma de banda cerca de un extremo de una lámina de plástico, aluminio o vidrio recubierta de una capa fina de adsorbente que en este caso se trató de

la sílica gel (fase estacionaria), luego se colocó en una cámara cerrada para TLC la cual se ha dejado durante 15-30 minutos en contacto con la fase móvil para crear una atmosfera saturada del o la mezcla de solventes, estos ascendieron por capilaridad a través del adsorbente, produciéndose que las muestras recorrieran la placa, finalmente se usó un revelador que forma complejos coloreados, los que fueron reconocidos por métodos espectrofotómetros y mediante el cálculo del tiempo de retención pudimos determinar de qué sustancia se trataba la muestra (Velasco, 1992)

### 3.10.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Se seleccionó la HPLC porque se consideró una técnica con especificidad y sensibilidad muy altas para la cuantificación de AF. Las muestras que se analizaron mediante esta técnica se sometieron a purificación exhaustiva y se analizaron separadamente (Varga *et al.*, 2012). Este método es el más recomendado para la cuantificación de AF en raciones alimenticias para ganado y está oficialmente aprobado por la AOAC; tiene el inconveniente de ser un método largo y laborioso por lo que se requiere personal especializado para su desarrollo.

La técnica de HPLC se utilizó de acuerdo a lo señalado en el Anexo I, pero solamente se aplicó en las muestras que la técnica de ELISA no fue capaz de detectar la concentración debido a sobrepasar el rango máximo de detección. Los datos de ELISA y HPLC se contrastaron contra una curva de calibración elaborada con AF purificada (Figura 17). Aflatoxinas.

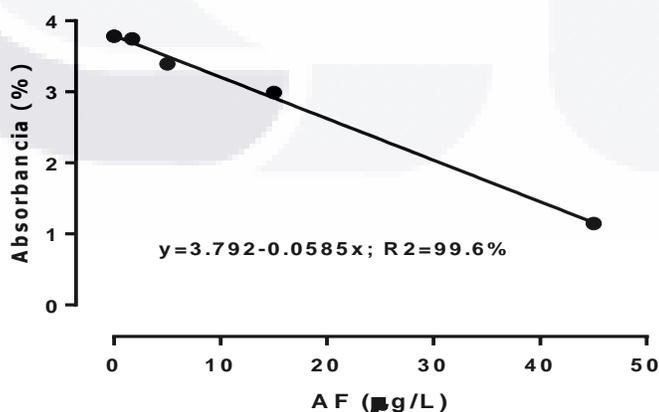


Figura 16 curva de calibración

### 3.10.3. Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

De las muestras secas y molidas se pesaron cinco g, posteriormente se agregaron 12.5 mL de metanol al 70% y se agitaron durante tres minutos, se filtraron sobre papel filtro con porosidad 1, se usaron 50  $\mu$ L del filtrado para cada uno de los pocillos de la microplaca, Todos los reactivos se llevaron a temperatura ambiente, como tampón de lavado se usó un tampón PBS-Tween; el sobre completo del tampón se disolvió en un litro de agua destilada; este tampón se mantuvo estable entre cuatro y seis semanas, los estándares de aflatoxina se pusieron en los pocillos suficientes en el soporte del micro-placa para los estándares y las muestras que se analizaron (Figura 18).



*Figura 17. Kit de ELISA (Ridascreen® Fast Aflatoxin)*

Se registró la posición de los estándares y las muestras en una hoja impresa donde se representó la micro-placa, se agregaron 50  $\mu$ L de los estándares y de las muestras a analizar en los pocillos correspondientes, tomando la precaución de usar una punta nueva y estéril para cada estándar y cada muestra, se agregaron 50  $\mu$ L del conjugado aflatoxina-enzima a los pocillos correspondientes, después se agregaron 50  $\mu$ L del anticuerpo anti-aflatoxina a los pocillos correspondientes, se mezcló el contenido de la micro-placa suavemente y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, el contenido de los pocillos se vació en un recipiente y con golpes en el marco porta-pocillos sobre un papel absorbente limpio. Se aseguró la eliminación completa de restos líquidos, se lavaron los pocillos con 250  $\mu$ L de tampón de lavado utilizando una micro pipeta multicanal y se vaciaron nuevamente los pocillos de la forma indicada anteriormente; este paso se repitió dos veces más, se agregan 100  $\mu$ L de sustrato/cromógeno a cada pocillo, mezclando el contenido de la micro-placa suavemente y se incubó 5 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, se agregaron 100  $\mu$ L de la solución stop a cada pocillo y se mezcló el contenido del micro-placa suavemente. Se midió la absorbancia a 450 nm antes de 10 minutos de que se detuvo la reacción. La lectura de las placas se realizó en un lector de

microplacas (ELx800TM, Bio Tek, EUA); los resultados de la absorbancia se registraron y se calcularon usando el software Ridasoft Win versión 1.8. la concentración de AFs correspondiente a la absorción se leyó directamente en la curva de calibración.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 PRODUCCIÓN DE MAÍZ EN INVERNADERO

Se llevaron todas los manejos agronómicos usuales en la producción de maíz forrajero para su optima producción y tener una buena calidad de ensilaje de maíz, se monitorearon temperatura y humedad, durante toda su desarrollo vegetativo. Los resultados obtenidos en la producción de maíz en invernadero cual se observó las variables agronómicas (altura de planta, peso de planta, pH, materia seca y número de hojas) hasta el momento de ensilaje. También se registró un monitoreo de los microsilos (temperatura y pH) que se presenta en la figura 22, a las 0, 24, 48 horas como se muestra en la figura 21 hasta el momento de apertura del microsilo que fue a los 250 horas.

Para su análisis organoléptico. Se observó que la fenología de las plantas fue similar en cada uno de los grupos de tratamientos, denominados interacciones; sin embargo, la altura de planta y el número de hojas en el Grupo AF<sup>-</sup> vs AF<sup>+</sup> presentó una diferencia que, aunque relativamente pequeña, fue significativa en comparación con el Grupo Control y con los grupos que no tenían interacción entre aislados AF<sup>-</sup> o AF<sup>+</sup> (Tabla 7).

Tabla 7. Medias de las variables fenológicas en estudio

Interacción	Media altura de planta (cm)	Media Peso planta (g)	Media pH al ensilar	Media Materia seca %	Media número de hojas
Control	181 <sup>b</sup>	1.01 <sup>a</sup>	6.15 <sup>a</sup>	0.32 <sup>a</sup>	12.0 <sup>a</sup>
Sin interacción AF <sup>-</sup>	194 <sup>a</sup>	1.02 <sup>a</sup>	6.20 <sup>a</sup>	0.31 <sup>a</sup>	12.3 <sup>a</sup>
Sin interacción AF <sup>+</sup>	190 <sup>a</sup>	1.02 <sup>a</sup>	6.08 <sup>a</sup>	0.31 <sup>a</sup>	12.6 <sup>a</sup>
Interacción AF <sup>-</sup> vs AF <sup>+</sup>	177 <sup>c</sup>	0.93 <sup>a</sup>	6.13 <sup>a</sup>	0.30 <sup>a</sup>	12.7 <sup>a</sup>
Total	183	0.97	6.13	0.31	12.1

\*Intervalos de confianza al 95.0% basados en la diferencia honestamente significativa de Tukey

\*a- b Medias con literal diferente muestra diferencia significativa (DHS de Tukey).

### 4.1 EXAMEN BROMATOLÓGICO DE ENSILAJES DE MAÍZ

#### 4.1.1. Humedad y materia seca

Para el valor de materia seca no se observó ninguna diferencia entre los tratamientos, por lo que esto indica, que el patógeno que se incorporó no influye en el contenido de materia seca del material vegetativo que se está estudiando.

Tabla 8. Base materia seca (M S%) en ensilajes de maíz contaminados in situ con aislados de *Aspergillus flavus* aflatoxigénicos (AF+) o no aflatoxigénicos (AF-)

Bloque	Media	Error Est.	Intervalos de confianza del 95.0%	
			Límite Inferior	Límite Superior
Control	93.9 <sup>a</sup>	2.2	90.4	97.4
Sin interacción (AF -)	96.7 <sup>a</sup>	2.2	93.2	100.3
Sin interacción (AF+)	96.2 <sup>a</sup>	2.2	92.6	99.7
Interacción (AF- vs AF+)	95.1 <sup>a</sup>	1	93.4	96.7
Total	95.3			

\*Intervalos de confianza al 95.0% basados en la diferencia honestamente significativa de Tukey

\*a- b Medias con literal diferente muestra diferencia significativa (DHS de Tukey).

#### 4.1.2 Extracto etéreo o grasa cruda

Para el valor de grasa cruda, si se observó una diferencia entre los tratamientos, cuando se le incorporo solo una cepa de *Aspergillus*, ya sea FA<sup>-</sup> o FA<sup>+</sup> el contenido fue igual, pero al momento de realizar la interacción de las cepas (AF<sup>-</sup> vs AF<sup>+</sup>) se observa una mayor reducción debido a la competitividad de las dos cepas por los nutrientes en este caso por la grasa cruda (Tabla 9).

Tabla 9. Grasa cruda (%) en ensilajes de maíz contaminados in situ con aislados de *Aspergillus flavus*.

Bloque	Media	Error Est.	intervalos de confianza del 95.0%	
			Límite Inferior	Límite Superior
Control	10.6 <sup>a</sup>	1.33	8.5	12.6
Sin interacción (AF <sup>-</sup> )	9.6 <sup>b</sup>	1.33	6.5	10.7
Sin interacción (AF <sup>+</sup> )	9.6 <sup>b</sup>	1.33	7.5	11.6
Interacción (AF <sup>-</sup> vs AF <sup>+</sup> )	8.5 <sup>c</sup>	0.62	7.5	9.5

Total	8.9
-------	-----

\*Intervalos de confianza al 95.0% basados en la diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey

\*a-b Medias con diferente literal muestra diferencias significativas (DHS de Tukey).

#### 4.1.3 Determinación de proteína cruda

Para la determinación de proteína cruda, se observó una reducción notoria, en los bloques donde se incorporó cepas de *Aspergillus*, (AF -), (AF+) y ( AF- vs AF + , respectivamente, mostraron el mismo comportamiento en comparación con el control

Tabla 10. Proteína cruda (%) en ensilajes de maíz contaminado in situ con aislados de *Aspergillus flavus*

Bloque	Media	Error Est.	de confianza del 95.0%	
			Límite Inferior	Límite Superior
Control	8.3 <sup>a</sup>	0.15	8.1	8.5
Sin interacción (AF -)	6.1 <sup>b</sup>	0.15	5.9	6.3
Sin interacción (AF+)	6.1 <sup>b</sup>	0.15	5.9	6.3
Interacción (AF- vs AF+)	6.2 <sup>b</sup>	0.07	6.1	6.3
Total	6.4			

\*Intervalos de confianza al 95.0% basados en la diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

\*a-b Medias con diferente literal muestra diferencias significativas (DHS de Tukey).

#### 4.1.4 Determinación de cenizas o materia orgánica

Para la determinación de cenizas, en los bloques no se observó ninguna diferencia, por lo que no altera en este aspecto cuando se incorpora las cepas de *Aspergillus* ya sea, (AF -), (AF+) y ( AF- vs AF+ ) , respectivamente, como se observa en la tabla 11.

Tabla 11. Cenizas % en ensilajes de maíz contaminado in situ con aislados de *Aspergillus flavus*.

Bloque	Media	Error Est.	Intervalos de confianza del 95.0%	
			Límite Inferior	Límite Superior
Control	6.5 <sup>a</sup>	0.397	5.8	7.1
Sin interacción (AF -)	6.1 <sup>a</sup>	0.397	7.4	8.7
Sin interacción (AF+)	6.5 <sup>a</sup>	0.397	5.8	7.1
Interacción (AF- vs AF+)	6.1 <sup>a</sup>	0.187	7.2	7.8
Total	6.3			

\*Intervalos de confianza al 95.0% basados en la diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

\* a-b Medias con diferente literal muestra diferencia significativa (DHS de Tukey).

#### 4.1.5 Determinación de fibra cruda o bruta

En la determinación de fibra cruda, respecto a los bloques a evaluar no se observa diferencias que puedan afectar la calidad de ensilaje cuando se incorpora las cepas de *Aspergillus* ya sea, (AF -), (AF+) y ( AF- vs AF+) como se observa en la tabla 12.

Tabla 12. Fibra cruda (%) en ensilajes de maíz contaminado in situ con aislados de *Aspergillus flavus*.

Bloque	Media	Error Est.	intervalos de confianza del 95.0%	
			Límite Inferior	Límite Superior
Control	19.8 <sup>a</sup>	0.33	19.3	20.3
Sin interacción (AF -)	19.6 <sup>a</sup>	0.33	19.1	20.1
Sin interacción (AF+)	20.6 <sup>a</sup>	0.33	20.1	21.1
Interacción (AF- vs AF+)	19.8 <sup>a</sup>	0.15	19.6	20.1
Total	19.9			

\*Intervalos de confianza al 95.0% basados en la diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

\*<sup>a-b</sup> Medias con diferente literal muestran diferencias significativas a la prueba HSD de Tukey ( $p < 0.05$ ).

## 4.2 CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS TOTALES

### 4.2.1 Concentración de aflatoxinas totales inoculados in situ

Los ensilajes que fueron, respecto al bloque control sin interacción (AF<sup>-</sup>) con respecto a la de sin interacción (AF<sup>+</sup>), se observa una diferencia notable en las medias de producción de aflatoxinas totales 24 y 6409 (AF; µg/kg) respectivamente, pero al momento de realizar la interacción (AF<sup>-</sup> vs AF<sup>+</sup>) se observa una notable reducción en la presencia de AF 2090 (AF; µg/kg), observándose una reducción del 67% en la presencia de AF en comparación con la sin interacción (AF<sup>+</sup>), como se observa en la (tabla 13)

Tabla 13. Micro-ensilajes in situ. Medias de aflatoxinas totales (AF; µg/kg).

Bloque	Media	Error Est.	Intervalos de confianza al 95.0%	
			Límite Inferior	Límite Superior
Control	0.00 <sup>d</sup>	0	0.00	0.00
Sin interacción (AF <sup>-</sup> )	24.0 <sup>c</sup>	1842	0.00	2604
Sin interacción (AF <sup>+</sup> )	6409 <sup>a</sup>	696	5455	7394
Interacción (AF <sup>-</sup> vs AF <sup>+</sup> )	2090 <sup>b</sup>	492	1420	2791
Total	2852			

\*Intervalos de confianza al 95.0% basados en la diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

<sup>a-b</sup> Medias con diferente literal muestran diferencias significativas a la prueba HSD de Tukey ( $p < 0.05$ ).

### 4.2.2 Concentración de aflatoxinas totales inoculados in vitro

Los ensilajes que fueron inoculados *in vitro*, respecto al bloque control no se muestra presencia de AF totales, en cambio al bloque sin interacción (AF<sup>-</sup>) con respecto a la de sin interacción (FA<sup>+</sup>), se observa una diferencia notable en las medias de producción de aflatoxinas totales) 36 y 5301 (AF; µg/kg) respectivamente, pero al momento de realizar la interacción (AF<sup>-</sup> vs AF<sup>+</sup>) se observa una notable reducción en la presencia de AF (1611 AF; µg/kg) observándose una reducción del 70% en la presencia de AF en comparación con la sin interacción (AF<sup>+</sup>), como se observa en la (tabla 14)

Tabla 14. Micro-ensilajes in vitro Medias de aflatoxinas totales (AF;  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Bloque	Media	Error Est.	Intervalos de confianza al 95.0%	
			Límite Inferior	Límite Superior
Control	0.00 <sup>d</sup>	0.00	0.00	0.00
Sin interacción (AF -)	36.0 <sup>c</sup>	1500	0.00	2164
Sin interacción (AF+)	5301 <sup>a</sup>	567	4516	6113
Interacción (AF- vs AF+)	1611 <sup>b</sup>	401	1060	2190
Total	2310			

\*Intervalos de confianza al 95.0% basados en la diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

<sup>a-b</sup> Medias con diferente literal muestran diferencias significativas a la prueba HSD de Tukey ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.3 Concentración de aflatoxinas totales inoculados granos inmaduros in vitro

Los frascos que fueron evaluados con respecto al control no se mostro presencia de AF, en cambio con los bloques sin interacción (AF<sup>-</sup>) con respecto a la de sin interacción (AF<sup>+</sup>), se observa una diferencia notable en las medias de producción de aflatoxinas totales (40 y 6635 AF;  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) respectivamente, pero al momento de realizar la interacción (AF<sup>-</sup> vs AF<sup>+</sup>) se observa una notable reducción en la presencia de aflatoxinas totales (1971 AF;  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), observándose una reducción del 70% en la presencia de AF en comparación con la sin interacción (FA<sup>+</sup>), como se observa en la (tabla 15).

Tabla 15. Cultivo de *Aspergillus flavus* en granos inmaduros de maíz. Medias de aflatoxinas totales (AF;  $\mu\text{g}_\text{kg}$ ).

Bloque	Media	Error Est.	Intervalos de confianza al 95.0%	
			Límite Inferior	Límite Superior
Control	0.00 <sup>d</sup>	0	0.00	0.00
Sin interacción (AF -)	40 <sup>c</sup>	5107	0.00	50
Sin interacción (AF+)	6635 <sup>b</sup>	1930	16979	2242
Interacción (AF- vs AF+)	1971 <sup>a</sup>	1365	4711	8560
Total	9235			

*\*Intervalos de confianza al 95.0% basados en la diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.*

*\*<sup>a-b</sup> Medias con diferente literal muestran diferencias significativas a la prueba HSD de Tukey ( $p < 0.05$ ).*



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. REDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS

En este trabajo las cepas no toxigénicas mostraron capacidad para reducir la concentración de aflatoxina cuando interactuaron con cepas atoxigénicas en el mismo sustrato, en este caso en el ensilaje de maíz. Se observó una disminución en la presencia de aflatoxinas totales cuantificadas, tanto *in situ* (67%) como *in vitro* (70%).

En estudios anteriores ya se han utilizado cepas *Aspergillus* no toxicogénicas para disminuir la presencia de aflatoxinas. Alaniz (2018), utilizó cepas no aflatoxigénicas *A. flavus* (AR27 y AR113) contra una cepa *A. flavus* (S4LC1) en Argentina; los resultados que se obtuvieron fueron de 55% en la reducción al realizar la interacción (AR27 vs S4LC1) y de 48% al realizar la interacción (AR113 vs S4LC1) al colonizar los granos de maíz bajo los ensayos de competencia.

En otro estudio, Hruska (2014), logró un 73% en la disminución de aflatoxinas totales al realizar la inoculación de *A. flavus* no toxigénicas en granos de maíz conjuntamente con toxigénicas (AF<sup>+</sup>: AF-70 vs AF<sup>-</sup>: AF-36; vs). También Hruska *et al.* (2014) obtuvieron mejores resultados de la disminución de aflatoxinas en el cultivo de maíz y algodón. Estos autores observaron una mayor reducción (80-90%) de la concentración de aflatoxinas en el maíz y en la semilla de algodón cuando se introdujo la cepa fúngica no aflatoxigénica 24 h antes de la cepa productora de aflatoxina asperjando esporas en campo agrícola. Estos resultados coinciden con los resultados de estudios pioneros en algodón desarrollados por Brown *et al.* (1991), así como por Cotty (1990).

Abbas *et al.* (2011) utilizaron en cultivos de maíz inóculos mixtos que contenían un aislado no aflatoxigénico (AF-K49) y dos cepas toxigénicas (AF-F3W4 y AF-K54), resultando una reducción en el total de aflatoxinas de 79% (AF-F3W4 vs AF-K49) y 89% (AF-F3W4 vs AF-K54) respectivamente. Mehl y Cotty (2010) evaluaron la capacidad competitiva de diferente compatibilidad y se observaron reducciones de aflatoxinas en el maíz 57-88%.

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%.

Atehnkeng (2008) probó un control biológico en la producción de maíz en campo en Nigeria. Utilizaron 11 aislados no toxigénicos originarios de África contra un aislado potencialmente productor de aflatoxinas (AF-La3228). En este estudio se observó una reducción del 70% al 95% en la reducción de aflatoxinas totales

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.

Lo anterior sugiere que existen diversas cepas no toxigénicas con capacidad de inducir la disminución de la producción de AF cuando crecen compartiendo un mismo sustrato. En el ensilaje de maíz se observó este efecto de biocontrol con cepas locales, lo cual pudiera ser de enorme importancia para la cadena lechera local.

## 5.2. CALIDAD BROMATOLÓGICA

En este estudio se observó que el crecimiento de *Aspergillus flavus* en el maíz redujo la calidad bromatológica del material vegetativo ensilado. El crecimiento de *Aspergillus flavus* en el maíz redujo la cantidad de grasa cruda y proteína disponible, por lo que se redujo también la calidad nutritiva para la alimentación de las vacas lecheras.

Los valores nutricionales del ensilaje de maíz obtenidos en este estudio concuerdan con diversos reportes anteriores. Por ejemplo, Peña (2010) y Tadeo (2012), reportan valores similares a los resultados obtenidos en este estudio en el rendimiento de proteína y en materia seca. También Núñez en el 2015, publicó resultados semejantes en la producción de proteína cruda. Las variaciones que observaron los autores anteriores se relacionaron con la carga genética del maíz inmersa en cada variedad utilizada.

Sin embargo, en el presente estudio solamente se utilizó un genotipo por lo que los efectos anti nutricionales pueden ser atribuidos a la acción de los hongos. Este efecto anti nutricional fue aumentado al realizar la interacción entre cepas de *A. flavus* no toxigénicas y toxigénicas (AF<sup>-</sup> vs AF<sup>+</sup>) en el material vegetativo, lo que sugiere que la competencia que se genera al momento de la interacción genera dinámicas diferenciales de crecimiento micótico.

## 6. CONCLUSIONES

Las AF representan un serio peligro para los seres humanos y para los animales porque son contaminantes ambientales naturales muy frecuentes en la mayoría de los productos alimentarios. El maíz se encuentra entre los productos agrícolas con mayor susceptibilidad a la contaminación con AF, ya que *Aspergillus flavus* permanece en el suelo agrícola y pasa de año a otro lo puede contaminar tanto en campo, la cosecha, el transporte como en el almacenamiento. Es por ello que el maíz presenta una gran incidencia de contaminación por hongos y AF en muchos de los países del mundo.

En este estudio se observó que al inocular experimentalmente en maíz forrajero cepas no toxigénicas conjuntamente con cepas que sí tienen capacidad para la producción de AF, la contaminación de los ensilajes de maíz destinados a la dieta del ganado lechero se puede disminuir la concentración de AF hasta en un 70%. También, la calidad bromatológica del material vegetativo disminuyó de manera leve pero significativa.

El diseño de un modelo experimental de micro ensilajes 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. Lo anterior pudiera ser muy útil para verificar de manera económica el potencial de genotipos de maíz para resistir el ataque de hongos como para evaluar la patogenicidad y toxigencidad de los hongos toxigénicos que atacan el ensilaje de maíz.

## 7. 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.

**Aluminosilicatos:** Es un material que contiene óxido de aluminio y sílice.

**Ácido ribonucleico (ARN):** Ácido nucleico 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.

**Bentonita:** Arcilla de gran poder decolorante, de grano muy fino, del tipo de montmorillonita, que contiene bases y hierro utilizada en cerámica.

**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 detoxificación 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 superfamilia de genes. Término relacionado: mono-oxigenasa, oxidasas de función mixta, reacciones de fase I.

**Codex Alimentarius:** Colección reconocida internacionalmente de estándares, códigos de prácticas, guías y otras recomendaciones relativas a los alimentos, su producción y seguridad alimentaria, bajo el objetivo de la protección del consumidor.

**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:** Esporocarpo 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.

**Detoxificación:** Es el acto de retirar la toxina de un producto tóxico o contaminado.

**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 O<sub>2</sub> 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 destoxificación 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

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

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.

**Secuestrante:** Capacidad que tienen algunos agentes de unirse a uno o varios metabolitos por medio de algún tipo de enlace químico.

**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 Lechera:** 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.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca L, Bragulat R, Castellá G, Accensi F y Cabañes F J. 2000. Hongos productores de micotoxinas emergentes *Revista Iberoamericana de Microbiología*. 17 (1): 63-68.
- Abarca L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomia. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17: 79-84.
- Abbas K, Zablutowicz M, Bruns A y Abel CA. (2006). Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Biocontrol Sci Technol*. 16(5):437-449.
- Acosta R. (2009). El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El maíz en Cuba. *Cultivos Tropicales*, 30(2): 113-120.
- Acuña C A, Díaz J y Espitia, M E. (2005). Aflatoxinas En Maíz: Reporte De Caso En La Costa Atlántica Colombiana. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria Y de Zootecnia*, 52; 156-162.
- Aguirre G. y García L. (2012). Manual de capacitación: Selección para el mejoramiento de maíz criollo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Centro de Investigación Regional Centro. Campo experimental Bajío. Celaya, Gto., México. Folleto para Productores Núm. 4.
- Alvarenga A, Moreno E, Quezada M Y, Moreno J, Vázquez E y Flores A. (2012). *Aspergillus* aflatoxigénicos: Enfoque taxonómico actual. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 3(5), 1047-1052.
- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis of the AOAC. 15a Edición. Sección 49. AOAC Método 970.45.
- Arias, C. (1993). Manual de manejo pos-cosecha de granos a nivel rural. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Oficina Regional de la FAO para América Latina y El Caribe. Santiago, Chile.
- Atehnkeng J , Ojiambo P S, Ikotun T, Sikora R A, Cotty P J, Bandyopadhyay R. (2008). Evaluation of atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents for aflatoxin in maize. *Food Addit. Contam.* 25 (10):1264-1271.
- Baliukoniene V, Bakutis B, Vaivadaite T, Bartkienė E y Jovaišienė J. (2012). Prevalence of fungi and mycotoxins in silage and milk in Lithuania. *Vet. Med. Zoot.* 59 (81): 9-12.
- Bandyopadhyay R. y Cotty P. (2013). Biological controls for aflatoxinb reduction. In: Unnevehr, L. and Grace, D. (eds.) *Aflatoxins: finding solutions for improved food safety*. IFPRI, Washington, DC, USA, pp. 44-45.

- Camacho A, Giles M, Ortegón A, Palao M, Serrano B y Velázquez O. (2009). Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM México.
- CAÑETE M V Y SANCHA J L. (1998). Ensilados de forraje y sus empleos en la alimentación de rumiantes. Editorial Mendi. Prensa, Madrid, España.
- Carvajal M y Arroyo G. (1997). Management of aflatoxin contaminated maize in Tamaulipas, Mexico. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 22:327-350.
- Cary J W, Rajasekaran K, Brown R L, Luo M, Chen Z y Bhatnagar D. (2011). Developing resistance to aflatoxin in maize and cottonseed. *Toxins*, 3(6): 678–696.
- Catchpole V R y Henzell E F. (2011); Silage and silage-making from tropical herbage species. *Herbage Abstracts*. 41: 213-221.
- Cavallarin L, Tabacco E, Antoniazzi S y Borreani G. (2011). Aflatoxin accumulation in whole crop maize silage as a result of aerobic exposure. *J Sci Food Agric*. 91 (13):2419-2425.
- Charles W Y Schmidt M S, (2014). Para romper el molde del moho: Nuevas estrategias para combatir las aflatoxinas. *Salud pública de México*. 56( 2): 1-12.
- Chavarri M, Luzón O, Mazzani C, González C, Alezones J y Garrido M J. (2009). Mohos toxigénicos y micotoxinas en maíz de grano blanco cosechado bajo riego en los estados Yaracuy y Portuguesa, Venezuela. *Fitopatol. Venez*. 22(1):2-7.
- Chaverra E. (2000). El ensilaje en la alimentación del ganado vacuno. *Revista lasallista*. 1(1):1-6.
- Chepsergon J, Kiprop E K y Mwamburi L A. (2014). Biocontrol of Aflatoxins in Corn using Atoxigenic *Aspergillus flavus*: Review. *International Journal of Science and Research (IJSR)*. 3(12):1954-1958.
- Cofani L, Nadai F, Arruda B, Sarria G A, Blumer L, Barbosa Jr F. (2009). Chemical analysis of dairy cattle feed from Brazil. *J Radioanal Nucl Chem* 282:497–500.
- Copa, A. (2010). Nutrición y alimentación del ganado lechero. La Paz: Soluciones Prácticas-Fundación Sartawi Sayariy. La Paz, Bolivia. Punto de encuentro. Primera edición.
- Cotty P J y García J R. (2007). Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology* 119:107-115.
- Cotty, P. J. and Bayman, P. 1993. Competitive exclusion of a toxigenic strain of *Aspergillus flavus* by an atoxigenic strain. *Phytopathology* 83: 1283-1287.

- Cueto J, Reta D, Barrientos J, González G y Salazar E. (2006). Rendimiento de maíz forrajero en respuesta a fertilización nitrogenada y densidad de población. *Rev. Fitotec. Mex.* 29 (2): 97 – 101).
- Damann, K E. (2015). Atoxigenic *Aspergillus flavus* biological control of aflatoxin contamination: what is the mechanism? *World Mycotoxin Journal.* 8 (2): 235-244.
- De Luna M C, Valdivia A G, Jaramillo F, Reyes J. Ortiz R, y 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.p 387-456
- Diario Oficial de la Federación. (2002). Productos y Servicios. Control de Aflatoxinas en Cereales para Consumo Humano y Animal. Especificaciones Sanitarias. Norma Oficial Mexicana (NOM-188-SSA1-2002). México. 23 p.
- Dorner J W. (2008) Control biológico de Aflatoxina contaminación de los cultivos. *Journal of Toxicology* . 23:2-3.
- Dorner W y Cole J. (2002). Effect of application of nontoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on subsequent aflatoxin contamination of peanuts in storage. *J Stored Products Res.* 38(4):329–339.
- Dorner, J. W. 2010. Efficacy of a biopesticide for control of aflatoxins in corn. *Journal of food protection* 73: 495-499.
- Duarte S y Villamil L. (2006). Micotoxinas en salud Pública. *Revista de Salud Pública.* 8: 129-135.
- Duncan S, Fjell D, Vanderlip R, Roozeboom K, Devlin D, Janssen K y Langereier M. (2007). Corn production handbook, *Kansas State University*, 5(1):1–52.
- Espinosa V, Rivera G y García L. (2008). Los canales y márgenes de comercialización de la leche cruda producida en sistema familiar (estudio de caso). *Veterinaria México.* 39 (01): 281-288.
- Fassio A, Carriquiry A, Tojo C y Romero R. (1998). *MAIZ: Aspectos sobre fenología.* Editorial: INIA. Monte video ,Uruguai. 50p.
- Fortún J, Meije Y, Fresco A y Moreno S. (2011) Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento, *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 30(4):201–208.

- Fountain J C, Scully B T, Ni X, Kemerait R C, Lee R D, Chen Z Y, y Guo B. (2014). Environmental influences on maize-*Aspergillus flavus* interactions and aflatoxin production. *Frontiers in Microbiology*, 5 (1):1–7.
- Gallo A, Giuberti G, Frisvad J C, Bertuzzi, T y Nielsen, K F. (2015). Review on mycotoxin issues in ruminants: Occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. *Toxins*, 7(8), 3057–3111.
- García J R Y Cotty P J. (2010). Crop rotation and soil temperature influence the community structure of *Aspergillus flavus* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 42:1842-1847.
- Gonza M L, Pereyra L, Alonso V A, Sager R, Morlaco M B, Magnoli C E, Astoreca A L. (2008). Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. *Journal of Applied Microbiology*. 104: 1034–104.
- Gutiérrez, G F, Virgen J y Arellano L. (2007). Germinación de semillas de maíz con envejecimiento natural. *Agronomía Mesoamericana*. 18(2): 163-170.
- Hazard S, Morales M, Butendieck B N, Gómez A P, y Mardones M P. (2001). Evaluación de la mezcla ensilaje de maíz con ensilaje de trébol rosado en diferentes proporciones, en la alimentación invernal de vacas lecheras en la zona sur. *Agricultura Técnica*, 61(3): 306-318.
- Honig H. y Woolford M K. (1980). Changes in silage on exposure to air. Ed, forage conservation in the 80s. *FAO*. (11):76-87.
- Hruska Z, Rajasekaran K, Yao H, Kincaid R, Darlington D, Brown R L, Bhatnagar D y Cleveland T E. (2014). Co-inoculation of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* to study fungal invasion, colonization, and competition in maize kernels. *Frontiers in Microbiology*. 5(22):1-7.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)-Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2010). Conocimiento de la diversidad y distribución actual del maíz nativo y sus parientes silvestres en México. Segunda Etapa 2008-2009. Región Norte Centro, Estado de Aguascalientes. 33pp.
- Ito Y, Peterson W, Wick low D y Goto, T. (2001). *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section Flavi. *Mycological Research* 105 (2): 233-239.

- Klich M. (2002). Identification of Common *Aspergillus* Species. First edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures. The Netherlands. 115p.
- Klich, M. (2009). Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicol ind health*. 9(25):657-667.
- Leiko S, Braga A y Machinsky P. (2004). Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in maize-based food products. *Brazilian journal of microbiology*(36), 289-294.
- Lim, T. K. (2013). Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. Volumen 5, Fruits. Springer. New York. 416-447pp.
- Magaña J, Ríos G, y Martínez J. (2006). Los sistemas de doble propósito y los desafíos en los climas tropicales de México. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. *Quinta Época* 14 (82).
- Martínez C J, Cotera J y Abad J. (2012). Características de la producción y comercialización de leche bovina en sistemas de doble propósito en Dobladero, Veracruz. *Revista Mexicana de Agronegocios*. 16 (30):816-824.
- Martínez P H Y Hernández D S J, Reyes M C A y Vázquez C G. (2013). El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Rev. mex. Fitopatol*. 31(2): 126-146.
- Martínez P, Hadassa Y, Hernández, S, Reyes M, César A, y Vázquez, (2013). El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(2), 126-146.
- Mauro A, Battilani P y Cotty P J. (2015). Atoxigenic *Aspergillus flavus* endemic to Italy for biocontrol of aflatoxins in maize. *BioControl* 60:125–134.
- Mehl H y Cotty P J. (2010). Variation in competitive ability among isolates of *Aspergillus flavus* from different vegetative compatibility groups during maize infection. *Phytopathology*. 100 (2): 150–159.
- Núñez G, Anaya A, Faz R, Serrato A. (2015). Híbridos de maíz forrajero con alto potencial de producción de leche bovino. *Agrofaz*. 15(1):47-56.
- OPS (Organización Panamericana de la Salud). (1983). Criterio de Salud 11. Micotoxinas. Publicación Científica N° 453. *osium Alltech*. 30: 6-314.
- Pacasa Q, Loza M , Bonifacio F , Vino N , Serrano C . (2017). Comunidad de hongos filamentosos en suelos del Agro-ecosistema de K'iphak'iphani. *J. Selva Andina Res. Soc* 8(1):2-25.
- Paredes O y Valverde M E. (2006). Los recursos nutraceuticos y medicinales que Mesoamérica le ha dado al mundo. *CINVESTAV*. 25(3):65-73.

- Paterson R. y Lima N. 2011. Further mycotoxin effects from climate change. *Food Research International*. 44(9): 2555 – 2566.
- Paterson, M. and Lima, M. 2011. Further mycotoxin effects climate change. *Food Research International* 44: 2555-2566.
- Payan G, Chávez M, Zarate M, BANDA R . (2013). Manejo de ganado lechero. Progreso No. 5, Barrio de Santa Catarina Delegación Coyoacán, C. P. 04010 México D. F. Primera Edición, INIFAP.
- Pildain M B, Frisvad J C, Vaamonde G, Cabral D, Varga J. y Samson R. (2008) Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(3): 725–735.
- Pitt J. y Hocking A. 2009. The ecology of fungal food spoilage. Fungi and food spoilage. Springer Science. DOI: 10.1007/978-0-387-92207-2.
- Quesada M, Rivera G, Blanco F, y Araya C. (1986). Estudio de la eficiencia de cuatro métodos de inoculación artificial con *Aspergillus Flavus* Link ex fries en seis genotipos de maíz (*Zea Mays*) bajo condiciones de campo. *Uniciencia*. 3 (2): 43-47.
- Quezada M Y, Flores A, Arrúa A A, Vázquez M E y Martínez E. (2011). Resistencia de Plantas de Maíz a la Infección por *Aspergillus Flavus* Link en Invernadero. *Revista Agraria -Nueva Epoca*. 8(2):15-20.
- Ramos A, González F y Robles F J. (2010). Manejo agronómico para incrementar el rendimiento de grano y forraje en híbridos tardíos de maíz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 1 (1): 27-35.
- Requena F, Saumel E y Alicia, L. (2005), Micotoxinas: Riesgos y prevención, *Zootecnia Tropical*. 23(4):393-410.
- Reyes O, González B y López I .(2013). Un analisis del metabolismo de ´ aspergillus niger creciendo sobre un sustrato solido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12: 41-56.
- Reyneri, A. (2006). The role of climate condition on micotoxina production in cereal. *Veterinary Research Communications*. 30: 87-92.
- Reyneri, A. 2006. The role of climate condition on micotoxin production in cereal. *Veterinary Research Communications* 30: 87-92.
- Robledo M, Marín, S y Ramos, A. (2001) Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado de Nayarit (México), *Rev Iberoam Micol* ,18: 141-144.

- Rodrigues P, Soares C, Kozakiewicz Z, Paterson R, Lima N y Venâncio, A. (2007). Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. Communicating Current *Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Mendez-Vilas (Ed). 527-534.
- Samson R. y Pitt J. (2000). Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Editorial: Harwood academic publisher. Amsterdam, Holanda . 510 p.
- Sepúlveda C y Piontelli E. (2005). Poblaciones de *Aspergillus* en semillas de maíz y soja de importación argentina: énfasis en la sección flavi. *Boletín Micológico* 20: 41 - 55.
- Sharma P. (2004). Mycotoxins in the food chain: a look at their impact on immunological responses. *Proc. Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. 20vo Annual Symp.*
- Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2017). Información agrícola anual y por estados. SAGARPA. México Disponible en <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>. Consulta efectuada el 24 de marzo de 2017. *Society of Chemical Industry*. 91: 2419–2425.
- Soares C, Calado T y Venancio, 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., 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.
- Solís C. A. (2015). Presencia de hongos y contaminación con micotoxinas ensilajes para alimentación de rumiantes. *Ciencias Veterinarias*. 33 (1): 7-31.
- Soriano J.M. (2007). Micotoxinas en alimento. Primera edición. Editorial Díaz de Santos, España. 396p.
- Tracy W, Vargas C, Zepeda L, Pataky J y Chandler M. (2007). Production and Marketing of huitlacoche. *Ciencias Veterinarias*. 2: 233-236.
- Turner N, Subrahmanyam S y Piletsky S. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*. 632:168–180.
- Urrego J. y Díaz J. (2006). Aflatoxina: mecanismo de toxicidad en la Etología de cáncer hepático celular. *Revista de la Facultad de medicina de la universidad nacional de Colombia*. 54:108-116.

- Vaamonde G, Degrossi C, Comerion R y Fernández V. (1995). *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* en maní cultivado en la provincia de Córdoba (Argentina): Características diferenciales y capacidad aflatoxicogénica. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 30:191-198.
- 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.
- Varga J, Frisvad J, Samson R. (2011). Two new aflatoxin producing species and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology* 69: 57–80.
- Velasco, D. (1992). Operaciones Básicas en el Laboratorio de Química. Obtenido de [http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/cromatografia\\_tipus.html](http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/cromatografia_tipus.html)
- WEINBERG G y MUCK E. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *Microbiology Reviews*. 19 (1): 53-68.
- Weinberg Z Y Muck R. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews*.19 (1):53-68.
- Wicklow D y Shotwell O. (1983). Intrafungal distribution of aflatoxins among conidia and sclerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Canadian Journal of Microbiology* 29 (1): 1-5.
- Winch T. (2006). Growing Food a guide to food production. *Spinger. Hereford, UK*. 342pp.
- Woloshuk C y Shim W. (2013). Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: A convergence of knowledge. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(1), 94–109.
- Yagen B, Sintov A y Bialer M. (1986). New, sensitive thin-layer chromatographic-high-performance liquid chromatographic method for detection of trichothecene mycotoxins. Original Research Article. *Journal of Chromatography*. 356:195-201.
- Yin Y, Yan L, Jiang J y Ma Z. (2008). Biological control of aflatoxin contamination of crops. *J Zhejiang Univ Sci B*: 9(10): 787–792.
- YIN Y, YAN L, JIANG J, MA Z. (2008). Biological control of aflatoxin contamination of crops. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 9(10):787-792.
- Zheng M, Richard J y Binder J. (2006). A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* 161:261–273.

## INDICE DE ANEXOS

ANEXO A. EXAMEN BROMATOLÓGICO DE ENSILAJES DE MAÍZ. HUMEDAD Y MATERIA SECA	92
ANEXO B. EXAMEN BROMATOLÓGICO DE ENSILAJES DE MAÍZ. EXTRACTO ETÉREO O GRASA CRUDA. (Método Goldfish).....	93
ANEXO C. EXAMEN BROMATOLÓGICO DE ENSILAJES DE MAÍZ. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA CRUDA .....	94
ANEXO D. EXAMEN BROMATOLÓGICO DE ENSILAJES DE MAÍZ. DETERMINACIÓN DE CENIZAS O MATERIA INORGÁNICA.....	95
ANEXO E. EXAMEN BROMATOLÓGICO DE ENSILAJES DE MAÍZ. DETERMINACIÓN DE FIBRA CRUDA O BRUTA .....	96
ANEXO F. TÉCNICA DE VACIADO EN PLACA POR DILUCIONES .....	98
ANEXO G. TINCIÓN CON AZUL DE ALGODÓN DE LACTOFENOL PARA IDENTIFICACIÓN DE HONGOS MICROSCÓPICOS (López <i>et al.</i> , 2004).....	100
ANEXO H. TÉCNICA DE ELISA.....	101
ANEXO I. TÉCNICA PARA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN PARA AFLATOXINAS EN ALIMENTO (HPLC).....	103

## ANEXO A. EXAMEN BROMATOLÓGICO DE ENSILAJES DE MAÍZ. HUMEDAD Y MATERIA SECA

### Procedimiento

- Lavar las cajas de aluminio perfectamente con agua y detergente.
- Enjuagarlas con agua destilada y posteriormente con éter.
- Introducir las cajas de muestra en la estufa (100 -115 °C) hasta peso constante por 4 horas aproximadamente) colocando la tapa en la base de la caja.
- Enfriarlas en desecador para evitar la hidratación.
- Pesar las cajas de aluminio en la balanza analítica.
- Depositar dentro de la caja de 1 a 1.5 g de la muestra y registrar su peso exacto.
- Secar en la estufa de 100 a 105 °C hasta peso constante (aproximadamente 24 horas)
- Colocando la tapa en la base de la caja.
- Retirar la caja con su contenido, taparla y enfriarla en el desecador.
- Pesarla en la balanza analítica, usar pinzas en todas las manipulaciones.

### Cálculos.

$$\% \text{ de humedad total} = \frac{\text{pérdida de peso en g} \times 100}{\text{g de muestra}}$$

$$\% \text{ de materia seca parcial} = 100 - \% \text{ de humedad}$$

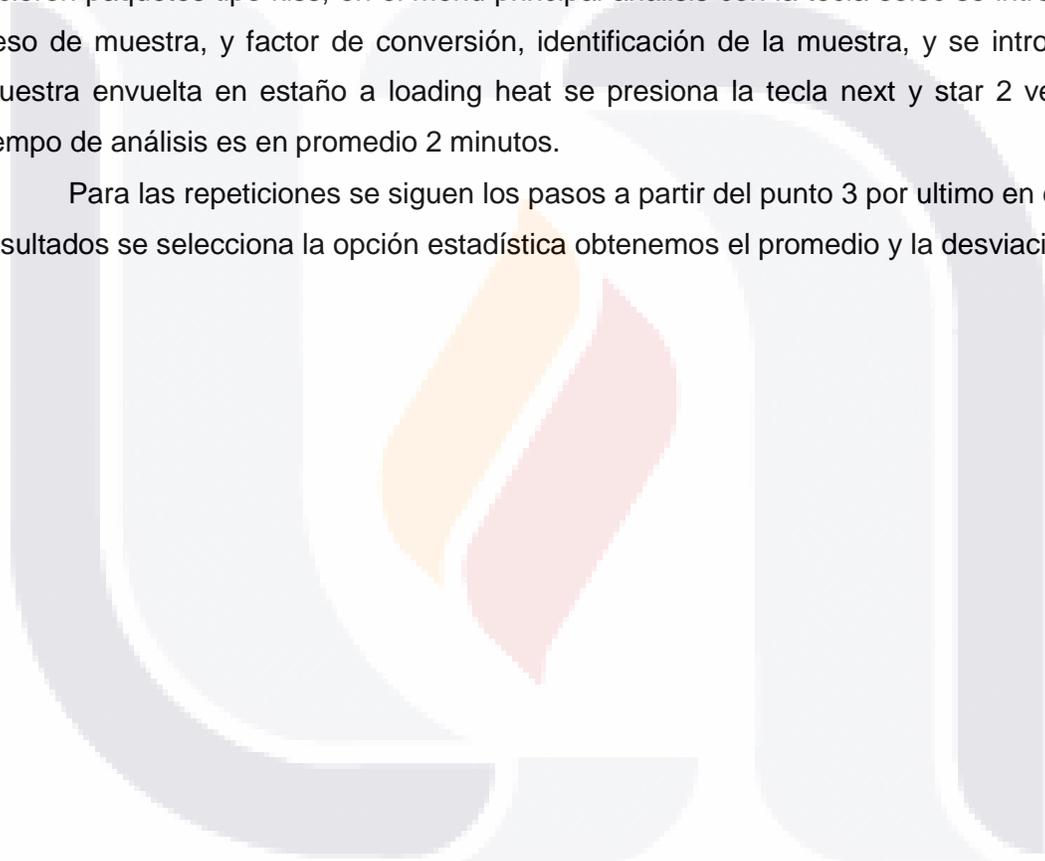
## ANEXO A. EXAMEN BROMATOLÓGICO DE ENSILAJES DE MAÍZ. EXTRACTO ETÉREO O GRASA CRUDA. (Método Goldfish)

- Pesar por diferencia 2 g de muestra e introducirlo en el dedal y taparlo con un trozo de algodón seco.
- Colocar el dedal que contiene la muestra dentro del porta-dedal y fijarlo bajo del condensador del aparato de extracción.
- Pesar el vaso que se encuentra en el desecador usando pinzas para manipularlo y depositar dentro del mismo 30 a 40 mL éter, unirlo a la rosca y colocarlo debajo del condensador cerrado herméticamente.
- Abrir la llave del agua y subir las parrillas hasta que queden en contacto con el vaso.
- Iniciar el calentamiento y observar durante los primeros diez minutos de ebullición si hay fugas de éter. Cuando el nivel de éter permanezca constante puede dejarse solo el aparato y observarse periódicamente.
- A partir del inicio de la ebullición extraer durante 2 horas como mínimo, dependiendo de la muestra que se trate.
- Cuando se finalice el tiempo de extracción bajar las parrillas y dejar que el dedal termine de gotear, desenroscar el vaso de extracción y quitar el dedal que contiene la muestra, colocar en el lugar del dedal un recolector de vidrio, volver a colocar el vaso de vidrio y subir las parrillas calientes.
- Destilar el éter que se encuentra en el vaso de extracción y poco antes de que éste se evapore hasta sequedad, bajar las parrillas y retirar el vaso.
- Vaciar el éter de los tubos recolectores a un recipiente especial para éter usado.
- Colocar el vaso en la estufa a 100 °C durante 40 minutos, enfriar en el desecador y posteriormente pesar.

$$\text{Cálculos: \% E. E.} = \frac{(\text{Peso del vaso con la grasa}) - (\text{Peso del vaso solo}) * 100}{\text{g. de muestra}}$$

## ANEXO B. EXAMEN BROMATOLÓGICO DE ENSILAJES DE MAÍZ. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA CRUDA

- Se verifica las condiciones de los gases, temperaturas en el ambiente de monitor.
- Se corrieren 2 blancos. Usando el menú análisis en el inciso insertar blancos, con el fin de eliminar ruido por el nitrógeno ambiental.
- Se calibra con 5 estándares de EDTA marca LECO.
- Se pesan por duplicado .12g de muestra en un papel de estaño, con la cual se hicieron paquetes tipo kiss, en el menú principal análisis con la tecla selec se introduce el peso de muestra, y factor de conversión, identificación de la muestra, y se introduce la muestra envuelta en estaño a loading heat se presiona la tecla next y star 2 veces. El tiempo de análisis es en promedio 2 minutos.
- Para las repeticiones se siguen los pasos a partir del punto 3 por ultimo en el menú resultados se selecciona la opción estadística obtenemos el promedio y la desviación.



**ANEXO C. EXAMEN BROMATOLÓGICO DE ENSILAJES DE MAÍZ.  
DETERMINACIÓN DE CENIZAS O MATERIA INORGÁNICA**

- Se pesan los crisoles previamente identificados.
- Se pesa 1g de la muestra y se coloca en el crisol previamente identificado con el número de muestra.
- Se pasan a la estufa a 600°C durante 2 horas.
- Pesar los crisoles con las cenizas.



## ANEXO D. EXAMEN BROMATOLÓGICO DE ENSILAJES DE MAÍZ. DETERMINACIÓN DE FIBRA CRUDA O BRUTA

Preparación de las bolsas de filtración.

- Pesar las bolsas de filtración en balanza analítica. ( $w_1$ ).
- Pesar directamente en la bolsa de filtración 1.0 g de muestra ( $W_2$ ), de tamaño de partícula 1 mm. Pesar un blanco con una bolsa vacía incluirla en la digestión para determinar la corrección de bolsa ( $C_1$ ).
- sellar la bolsa a una distancia de 0.5 cm. De la abertura.
- acomodar la muestra uniformemente dentro de la bolsa.
- si la muestra contiene grasa se recomienda colocar las bolsas con muestra en un frasco con 500 ml de acetona, agitando el frasco 10 veces dejar reposar 10 minutos. Repetir el procedimiento con acetona nueva el procedimiento. Y posteriormente sacar las bolsas de la acetona y ponerlas al aire durante 5 minutos para eliminar el residuo.
- colocar las 24 bolsas en las 8 charolas del suspensor de bolsas (tray), colocando 3 bolsas por tray acomodadas a 120 grados, en relación uno con otra. El tray 9 se deja libre y actúa como el tope del tray 8. Acomodar el tray dentro de la cámara del equipo.
- adicionar 1900 a 2000 ml de la solución de ácido sulfúrico (0.255 N) a temperatura ambiente en el vessel (contenedor de los tray), acomode el contrapeso y cierre, programe el tiempo de digestión 45 minutos, encienda agitación y calentamiento y Start para iniciar la digestión ácida.
- transcurrido el tiempo se apaga la agitación y calentamiento. Se abre la válvula de salida de la solución caliente para reducir la presión interna. Y se abre la parte superior de la cámara. Se vuelve a cerrar la válvula de salida, se agregan 1900 a 2000 ml de agua caliente (90 a 100 °C) encienda agitación durante 3 a 5 minutos, se abre la válvula de salida de líquido y se repite este procedimiento 3 veces.
- Digestión alcalina se agregan 1900 a 2000 ml solución de hidróxido de sodio a (0.313 N) a temperatura ambiente se programa tiempo de digestión 45 minutos se enciende agitación y calentamiento y Start.
- transcurrido el tiempo se elimina la solución alcalina por la válvula de salida y se realiza el enjuague como en el punto 8.
- Retirar las bolsas de los tray y presiona ligeramente para eliminar el líquido que haya quedado atrapado, sumerja durante 3 minutos las bolsas en un vaso de precipitado

de 500 con 250 ml acetona, remueva las bolsas y elimine el exceso. Deje secar a la intemperie para eliminar la acetona. Más tarde para secar las bolsas se somete la muestra a 105°C durante 2 a 4 horas, enfriar en el desecador y pesar este peso corresponderá al (W3).

- colocar la bolsa en un crisol que este a peso constante, y calcinar durante 2 horas a 550 °C, enfriar en un desecador y pesar (W4).

- FORMULA

- $FC = (W5 - (W1 \times C2)) \times 100 / W2 \times DM$

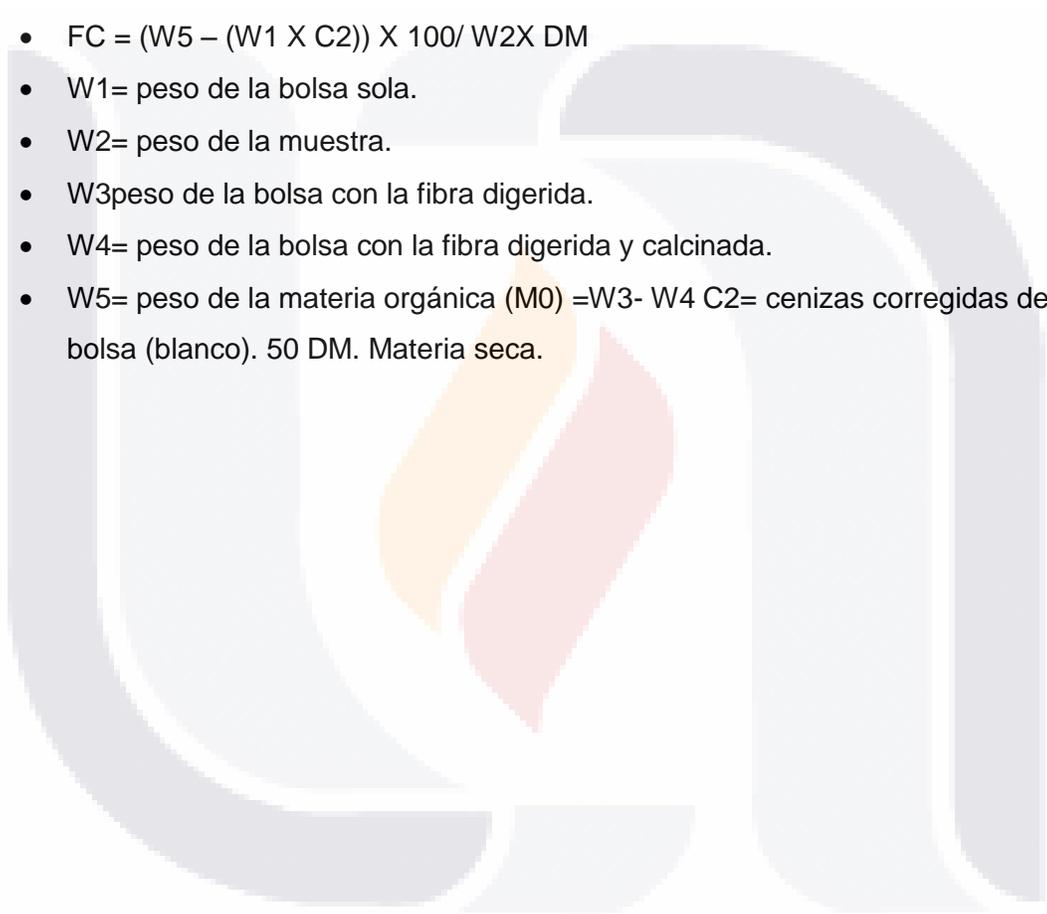
- W1= peso de la bolsa sola.

- W2= peso de la muestra.

- W3 peso de la bolsa con la fibra digerida.

- W4= peso de la bolsa con la fibra digerida y calcinada.

- W5= peso de la materia orgánica (M0) =W3- W4 C2= cenizas corregidas de la bolsa (blanco). 50 DM. Materia seca.



## ANEXO E. TÉCNICA DE VACIADO EN PLACA POR DILUCIONES

(Camacho *et al.*, 2009)

Para el medio de cultivo (PDA), pesar 39 gr de papa dextrosa agar, se disolvieron en un litro de agua destilada, el preparado se agitó frecuentemente hasta su ebullición. Se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos.

El medio estéril se vació dentro de una campana de flujo laminar vertical clase II tipo A2, se introdujo el medio de cultivo estéril, las cajas de petri estériles, un marcador permanente, tijeras, un atomizador con alcohol al 96% y algodón; todo el material requerido para vaciar el medio se dejó dentro de la campana de flujo laminar bajo luz ultravioleta (UV) durante 15 minutos.

Se vierten el medio en cada caja de petri, se dejaron enfriar durante 15 minutos dentro de la campana y se tapan, se almacenan en refrigeración después de solidificado el medio, para su posterior uso.

Se pesa g del polvo de peptona de caseína y se disuelve en un litro de agua destilada, se esteriliza en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos, para tener una solución estéril de peptona de caseína al 0.1%.

Se pesaron 10 g de las muestras molidas, se diluyeron en 90 mL de peptona de caseína al 0.1% y se obtuvo una dilución de 1:10, de esta dilución se tomó un mL que se colocó en un tubo estéril con 9 mL de peptona de caseína al 0.1% y se obtuvo una dilución 1:100, de esta dilución se tomó nuevamente un mL que se depositó en un tubo estéril con 9 mL de peptona de caseína al 0.1% y se obtuvo una dilución 1:1000, finalmente se tomó un mL de esta dilución y se pasa a un tubo estéril con 9 mL de peptona de caseína al 0.1% y se obtiene una dilución final de 1:10000). Se inocularon 100  $\mu$ L de cada dilución en una caja petri con PDA, las cajas se taparon, se incubaron a 27°C durante un periodo de 72 a 120 h (Camacho *et al.*, 2009).

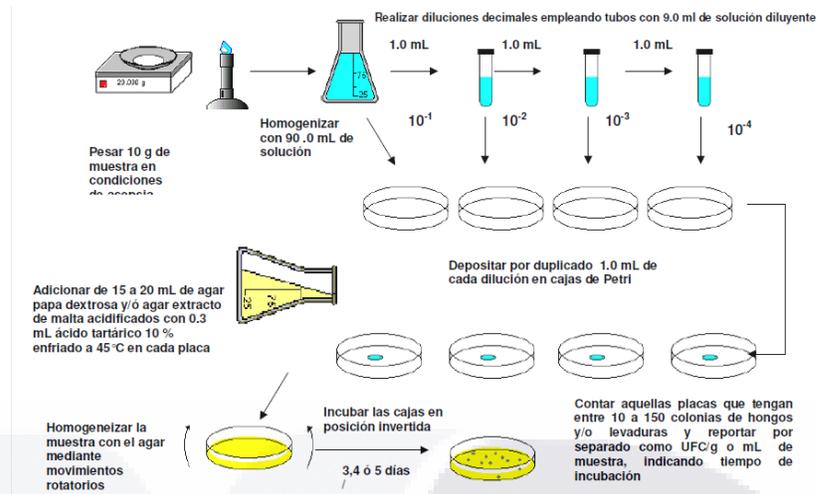


Figura 18. Método de vaciado en placas adaptado por( Camacho et al 2009)

## **ANEXO F. TINCIÓN CON AZUL DE ALGODÓN DE LACTOFENOL PARA IDENTIFICACIÓN DE HONGOS MICROSCÓPICOS (López *et al.*, 2004)**

El azul de lactofenol en solución se utilizó para la preparación de los hongos en las preparaciones Microbiológicas y de diagnóstico. El material de las muestras se tiñe por tinción en un paso. Los elementos fungosos aparecen azul.

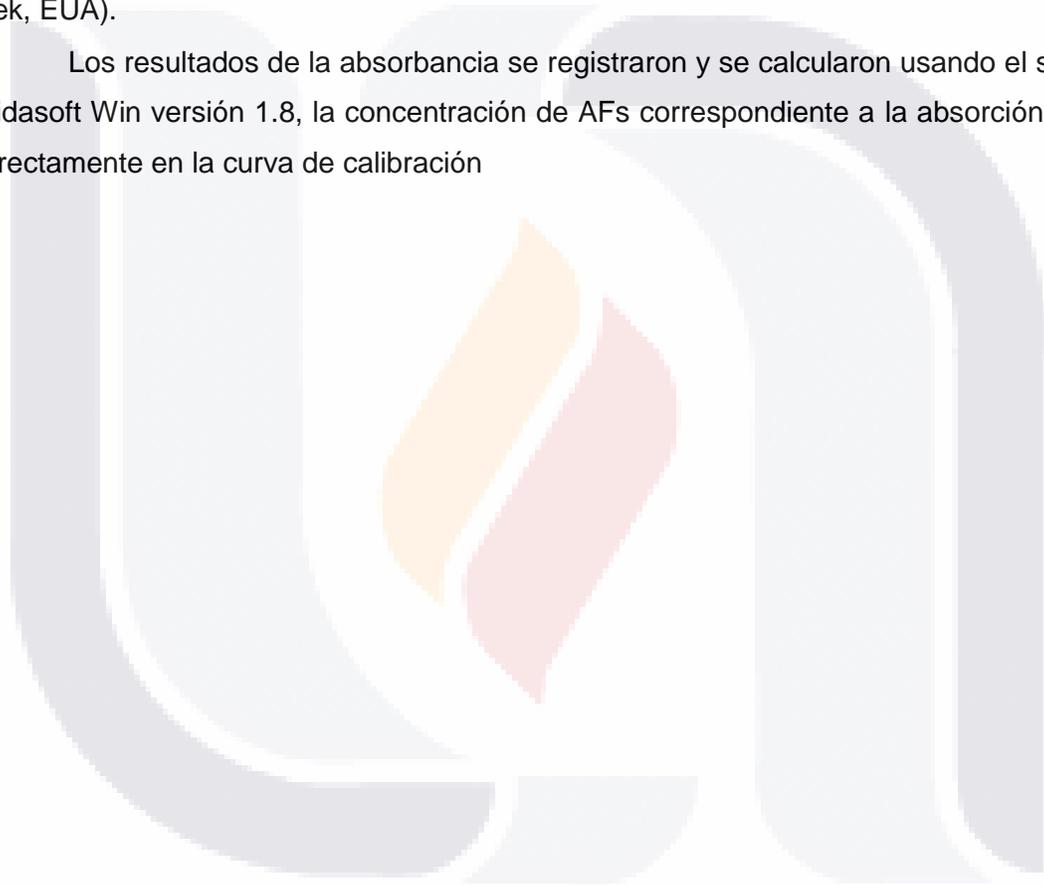
- Se introdujeron los portaobjetos, los cubreobjetos, las agujas de disección, el gotero con azul de lactofenol y las cajas con PDA en las cuales se observó crecimiento fúngico.
- Se dejó bajo luz UV durante 15 min, con ayuda del mechero se flamearon los portaobjetos después de pasarles una torunda con alcohol por ambas superficies, las colonias de hongos que crecieron en las cajas petri se identificaron con un número consecutivo, se colocó una gota de colorante de azul de lactofenol en el centro del portaobjetos previamente desinfectado, con la aguja de disección se tomó una porción de la colonia de interés y se colocó sobre la gota del colorante, extendiendo la preparación cuidadosamente con ayuda de otra aguja de disección y se cubrió con un cubreobjetos previamente esterilizado.
- Las laminillas se identificaron con el número de la muestra en la que creció la colonia, el número de aislado, la fecha de preparación y las iniciales de quien realizó la preparación. Al terminar la preparación de laminillas, las cajas con los aislados se sellaron y se dejaron a temperatura ambiente, se retiró de la campana de extracción el material que se utilizó, se limpió la superficie con alcohol y se bajó por completo la puerta de seguridad.
- Las laminillas se observaron al microscopio óptico con menor y mayor aumento, se registró en una bitácora el género del aislado.

## ANEXO G. TÉCNICA DE ELISA

Procedimiento (instrucciones del fabricante)

- De las muestras secas y molidas se pesaron cinco g.
- posteriormente se agregaron 12.5 mL de metanol al 70% y se agitaron durante tres minutos.
- Se filtraron sobre papel filtro con porosidad 1, se usaron 50  $\mu$ L del filtrado para cada uno de los pocillos de la microplaca.
- Todos los reactivos se llevaron a temperatura ambiente.
- Como tampón de lavado se usó un tampón PBS-Tween, el sobre completo del tampón se disolvió en un litro de agua destilada, este tampón se mantiene estable entre cuatro y seis semanas.
- Los estándares de aflatoxina ya vienen listos para su uso.
- Se ponen los pocillos suficientes en el soporte del micro-placa para los estándares y las muestras que se analizaron.
- Se registra la posición de los estándares y las muestras en una hoja impresa donde se representa la micro-placa.
- Se agrega 50  $\mu$ L de los estándares y de las muestras a analizar en los pocillos correspondientes, tomando la precaución de usar una punta nueva y estéril para cada estándar y cada muestra.
- Se agrega 50  $\mu$ L del conjugado aflatoxina-enzima a los pocillos correspondientes.
- Después se agregaron 50  $\mu$ L del anticuerpo anti-aflatoxina a los pocillos correspondientes, se mezcló el contenido de la micro-placa suavemente y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- El contenido de los pocillos se vació en un recipiente y con golpes en el marco portavocillos sobre un papel absorbente limpio se aseguró la eliminación completa de restos líquidos.
- Se lavaron los pocillos con 250  $\mu$ L de tampón de lavado utilizando una micro pipeta multicanal y se vaciaron nuevamente los pocillos de la forma indicada anteriormente.
- Este paso se repitió dos veces más.

- Se agregan 100  $\mu$ L de sustrato/cromógeno a cada pocillo, mezclando el contenido de la micro-placa suavemente y se incubó 5 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.
- -Se agregan 100  $\mu$ L de la solución stop a cada pocillo y se mezcló el contenido del micro-placa suavemente.
- Se midió la absorbancia a 450 nm, para tomar esta lectura no se deben dejar pasar más de 10 minutos.
- La lectura de las placas se realizara en un lector de microplacas (ELx800TM, Bio Tek, EUA).
- Los resultados de la absorbancia se registraron y se calcularon usando el software Ridasoft Win versión 1.8, la concentración de AFs correspondiente a la absorción se leyó directamente en la curva de calibración



## ANEXO H. TÉCNICA PARA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN PARA AFLATOXINAS EN ALIMENTO (HPLC)

### PREPARACIÓN DE MATERIAL

El material de vidrio que va a ser expuesto a una solución acuosa de aflatoxina, debe ser lavado en ácido para evitar pérdida de aflatoxina. Antes de usar el material de vidrio debe ser lavado con una solución de ácido sulfúrico 2 M durante varias horas y después realizar varios lavados con agua destilada para remover los residuos de ácido (AOAC, 2000).

### PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

Utilizar tubos en fase sólida (SPE) para la extracción de AFs. Pasar 0.5 mL de extracto a través del tubo SPE de 1.0 mL, acondicionado con 2.0 mL de ácido acético en agua al 0.5 %, dos veces. Posteriormente lavar la muestra con 0.5 mL de tetrahidrofurano (THF) al 20 % en ácido acético 0.5%, luego con 2.0 mL de hexano y 3.0 mL de THF al 25 % en hexano; al terminar el lavado el tubo SPE se dejar secar.

Utilizar una solución de elusión con 2.0 mL de cloruro de metileno: THF (99:1).

### DERIVATIZACIÓN

Evaporar el eluato a sequedad en baño maría a 80°C.

Resuspender con 200 µL de hexano y 50 µL de ácido trifluoroacético (TFA). Mezclar con el vortex durante 30 segundos y dejar reposar 5 minutos.

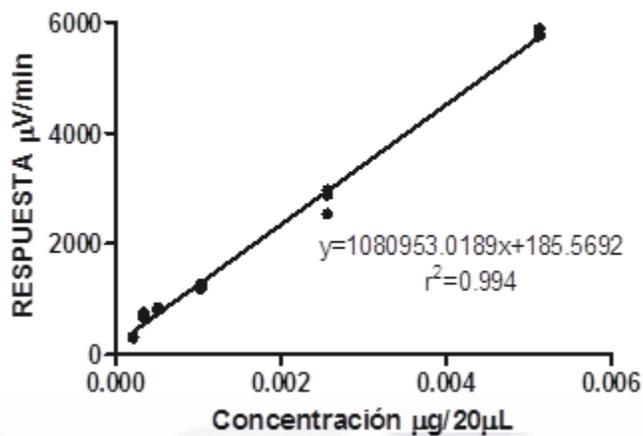
Agregar 1.95 mL de agua: acetonitrilo 9:1, mezclar con el vortex durante 30 segundos y permitir la separación de las fases mediante reposo durante 10 min.

### DETERMINACIÓN

Una vez derivatizadas las muestras se inyectaron al Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia, Bomba binaria Varían ProStar y detector de fluorescencia Varían, FP-2020, Varían Associates Inc., Victoria, Australia; Columna Supelcosil HPLC LC-18, Supelco Inc. Condiciones del sistema cromatográfico: 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/min, presión 2,755 psi, muestra 20 µL, detector de fluorescencia a 360 nm de excitación y 440 nm de emisión (De Luna y col. 2013). 99

### PREPARACIÓN DE LA GRÁFICA DE CALIBRACIÓN

- Evaporar a sequedad 10 $\mu$ L de la solución estándar de 1 $\mu$ g/ $\mu$ L en tubos de vidrio preparados como se indicó en el punto de preparación de material
  - Resuspender en diferentes volúmenes de benceno:acetonitrilo de acuerdo a la concentración deseada
  - Tomar 10 $\mu$ L de la dilución y realizar la derivatización de acuerdo a lo descrito anteriormente
  - Inyectar por triplicado en el sistema cromatográfico
- 
- Los granos de maíz se inocularon usando una técnica estéril no invasiva con 5 mL de inóculo ( $2.5 \times 10^5$  esporas / g de grano), y la humedad se ajustó a 15% mediante la adición de agua destilada estéril.
  - Los frascos se agitan diariamente para prevenir la adhesión. Tres tratamientos fueron diseñados para cada uno de los 11 genotipos de maíz (n = 20 frascos): (1) grupo de control; (2) Cepa de Cuautitlán; (3) variedad Tamaulipas. El control el grupo no fue inoculado, pero se manejó como grupos 2 y 3 (humedad, fijador de esporas, temperatura y período) del ensayo). Cada matraz representa una unidad experimental.
  - Los matraces se incuban a  $27 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . El crecimiento de *Aspergillus flavus* se registra después de 14 días de incubación.
  - El nivel de colonización fúngica (FC) fue expresado como el porcentaje de invasión en la superficie de los granos, asignando niveles 0, 1, 2 o 3 (0%, 1% -33%, 34% -67%, 68% -100%, respectivamente), según el método modificado de Guo *et al.*
  - Los genotipos y controles de maíz inoculados se procesan en un molino, y tamizado (850  $\mu$ m malla).
  - La harina se mantiene en bolsas herméticamente selladas y mantenido congelado a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta que se analice.
  - Cuantificar concentraciones de AF (AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2), las muestras se analizarán según la Asociación de Métodos oficiales de los químicos analíticos oficiales (AOAC).



Gráfica de calibración de las soluciones estándar de AFB1 con la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución.

**Propuesta de artículo**

**Comparación de dos métodos de inoculación de *Aspergillus flavus* *in situ* e *in vitro* a la contaminación experimental con aflatoxinas en ensilaje de maíz**

**Comparision of methods for *in situ* and *in vitro* *Aspergillus flavus* inoculation for experimental contamination with aflatoxins in corn silages**

**ALBERTO RANGEL-MUÑOZ<sup>1</sup>, ARTURO G VALDIVIA-FLORES<sup>1\*</sup>, TEODULO QUEZADA-TRISTAN<sup>1</sup>, JOSÉ DE JESÚS LUNA-RUIZ<sup>1</sup>, AMALIO PONCE –MONTROYA<sup>1</sup>**

**1 Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA)**

