



CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MAESTRIA EN CIENCIAS AGRONÓMICAS Y VETERINARIAS

TESIS:

**FACTORES ASOCIADOS A LA CONTAMINACIÓN DEL ALIMENTO
DE VACAS LECHERAS POR *Aspergillus flavus* Link
AFLATOXIGÉNICO Y AFLATOXINAS EN EL ALTIPLANO
CENTRAL MEXICANO**

QUE PRESENTA:

IAEZ. MARÍA FERNANDA ÁLVAREZ DÍAS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS VETERINARIAS

Comité tutorial

DR. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES (TUTOR)

DR. TEÓDULO QUEZADA TRISTÁN

DRA. ERIKA JANET RANGEL MUÑOZ

Evaluadores externos

DR. JOSÉ ISIDRO ALEJOS DE LA FUENTE

PH. D. MARIO ANTONIO COBOS PERALTA

Aguascalientes, Ags., 05 de enero de 2021

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

Por medio del presente como Tutor designado de la egresada **MARÍA FERNANDA ÁLVAREZ DÍAS** con ID 266235, quien realizó la tesis titulada: **FACTORES ASOCIADOS A LA CONTAMINACIÓN DEL ALIMENTO DE VACAS LECHERAS POR *Aspergillus flavus* Link AFLATOXIGÉNICO Y AFLATOXINAS EN EL ALTIPLANO CENTRAL MEXICANO**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir mi **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

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

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 14 de diciembre de 2020



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

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

Por medio del presente como Tutor designado de la egresada **MARÍA FERNANDA ÁLVAREZ DÍAS** con ID 266235, quien realizó la tesis titulada: **FACTORES ASOCIADOS A LA CONTAMINACIÓN DEL ALIMENTO DE VACAS LECHERAS POR *Aspergillus flavus* Link AFLATOXIGÉNICO Y AFLATOXINAS EN EL ALTIPLANO CENTRAL MEXICANO**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir mi **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

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

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 14 de diciembre de 2020



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

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

Por medio del presente como Tutor designado de la egresada **MARÍA FERNANDA ÁLVAREZ DÍAS** con ID 266235, quien realizó la tesis titulada: **FACTORES ASOCIADOS A LA CONTAMINACIÓN DEL ALIMENTO DE VACAS LECHERAS POR *Aspergillus flavus* Link AFLATOXIGÉNICO Y AFLATOXINAS EN EL ALTIPLANO CENTRAL MEXICANO**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir mi **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

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

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 14 de diciembre de 2020



DRA. ERIKA JANET RANGEL MUÑOZ
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

DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL
EXAMEN DE GRADO

Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 15/12/2020

NOMBRE: María Fernanda Álvarez Díaz ID 266235

PROGRAMA: Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias LGAC (del posgrado): Producción y salud animal

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo Práctico

TÍTULO: FACTORES ASOCIADOS A LA CONTAMINACIÓN DEL ALIMENTO DE VACAS LECHERAS POR *Aspergillus flavus* Link AFLATOXIGÉNICO Y AFLATOXINAS EN EL ALTIPLANO CENTRAL MEXICANO

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Generación de conocimiento sobre el panorama actual de contaminación de productos agropecuarios por cepas aflatoxigénicas de *Aspergillus flavus* y aflatoxinas.

INDICAR SI NO N.A. (NO APLICA) SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:	
SI	El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI	La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI	Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI	Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI	Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI	El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI	Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
SI	Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI	Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
El egresado cumple con lo siguiente:	
SI	Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI	Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI	Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
SI	Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI	Coincide con el título y objetivo registrado
SI	Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI	Tiene el CVU del Conacyt actualizado
N.A.	Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
En caso de Tesis por artículos científicos publicados	
N.A.	Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
N.A.	El estudiante es el primer autor
N.A.	El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
N.A.	En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
N.A.	Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
N.A.	La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado: Sí ☒ X
No ☐

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

DR. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DR. ANTONIO DE JESÚS MERAZ JIMÉNEZ

* En caso de conflicto de intereses, firmará un miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DR. ANTONIO DE JESÚS MERAZ JIMÉNEZ

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Ciencias Agropecuarias, por darme la oportunidad de cumplir el sueño de estudiar una Maestría en Ciencias. A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el apoyo financiero para la realización de esta investigación a través del proyecto institucional denominado “Ocurriencia de aflatoxinas en alimentos y productos pecuarios en el estado de Aguascalientes” con clave PIP/SA 19-1. A CONACYT por la asignación de la beca de posgrado 2019-000002-01NACF-04508.

A los Doctores: Arturo Valdivia Flores, Teódulo Quezada Tristán, Erika Janet Rangel Muñoz, José Isidro Alejos De La Fuente y Mario Antonio Cobos Peralta, por su invaluable apoyo y acertada guía.

A las Maestras en Ciencias: Lizbeth Martínez Martínez y Karla Isela Arroyo Zúñiga por su incansable ayuda.

A todos y cada uno de los profesores del Centro de Ciencias Agropecuarias que contribuyeron a mi formación académica y personal.

A los amigos que me han acompañado a lo largo del camino, a los de siempre y a los que se han sumado, a los nuevos y a los no tan nuevos: Vonny, Pahola, Néstor Alberto, Juan Pablo, Héctor, Alonso, Erika, Magdalena, Barenca y Liz; los compañeros de tantas aventuras vividas y las que faltan por vivir. A Raúl por ser mi amigo, confidente, psicólogo y siempre tener las palabras necesarias para alentarme; porque aun en la distancia siempre nos acompañamos.

A Luis Alberto y Claudia, los mejores y los peores hermanos. A mis sobrinos, los más tiernos y latosos: Juan Pablo, Carlos Enrique, Mateo y la pequeña Ana Paula. A mi abuelita Maria de Jesús, a mi abuelita Irene, a mi tío Jesús y demás miembros de la familia.

A Dios, por darme motivación cada día y haber puesto a las personas correctas en mi camino.

DEDICATORIAS

A los hombres y mujeres de mi vida:

A Miguel Álvarez de Robles, hombre de mirada dura, voz firme y palabras recias, él me guio con sus consejos y regaños, siempre se preocupó en mi porvenir y preparación académica, me enseñó la lección más importante y sublime de la vida: “el amor no tiene fin”, pues aun después de su partida yo puedo sentir su cariño aquí conmigo. A ti papá, donde quiera que estés, hoy serías el más orgulloso de este logro, sigue en pie la promesa de que algún día nos volveremos a ver.

A Felipa Días Reyes, la mujer más fuerte que he conocido, de carácter duro y corazón noble, la que me enseñó a nunca rendirme, que mi imaginación es el límite y que puedo descansar solo hasta el día que me muera. A ti mami, porque has estado ahí para sacudirme el polvo después de mis tropiezos y también, para celebrar juntas los triunfos.

Al hombre que ha alegrado mis días con su sonrisa, el gran amor de mi vida. Quizá en estos momentos no entiendas mis palabras, pero para cuando seas capaz de hacerlo, te darás cuenta de lo mucho que significas para mí, eres la razón de que me levante cada día para esforzarme por el hoy y el mañana, eres mi principal motivación. Miguel Alejandro, te amo hijo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL 1

ÍNDICE DE CUADROS 6

ÍNDICE DE FIGURA..... 8

ACRÓNIMOS 10

RESUMEN 11

ABSTRACT 12

1. INTRODUCCIÓN..... 15

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... 17

 2.1. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN 18

 2.2. OBJETIVOS..... 18

 2.2.1. Objetivo general..... 18

 2.2.2. Objetivos específicos 18

 2.3. JUSTIFICACIÓN 19

3. MARCO TEÓRICO..... 21

 3.1. GANADERÍA LECHERA 21

 3.1.1. Importancia social de la leche 21

 3.1.1.1. Aporte nutrimental..... 21

 3.1.2. Producción de leche..... 21

 3.1.2.1. Producción mundial. 21

 3.1.2.2. Producción nacional..... 22

 3.1.2.3. Consumo y demanda potencial de leche. 24

 3.2. PRODUCCIÓN LECHERA EN EL ACM 25

 3.2.1. Altiplano Central Mexicano..... 25

 3.2.1.1. Localización. 25

 3.2.1.2. Características fisiográficas. 26

 3.2.1.3. Características hidrográficas..... 26

 3.2.1.4. Características climatológicas..... 26

 3.2.2. Tipificación de la producción lechera del ACM 27

 3.2.2.1. Escala de producción..... 27

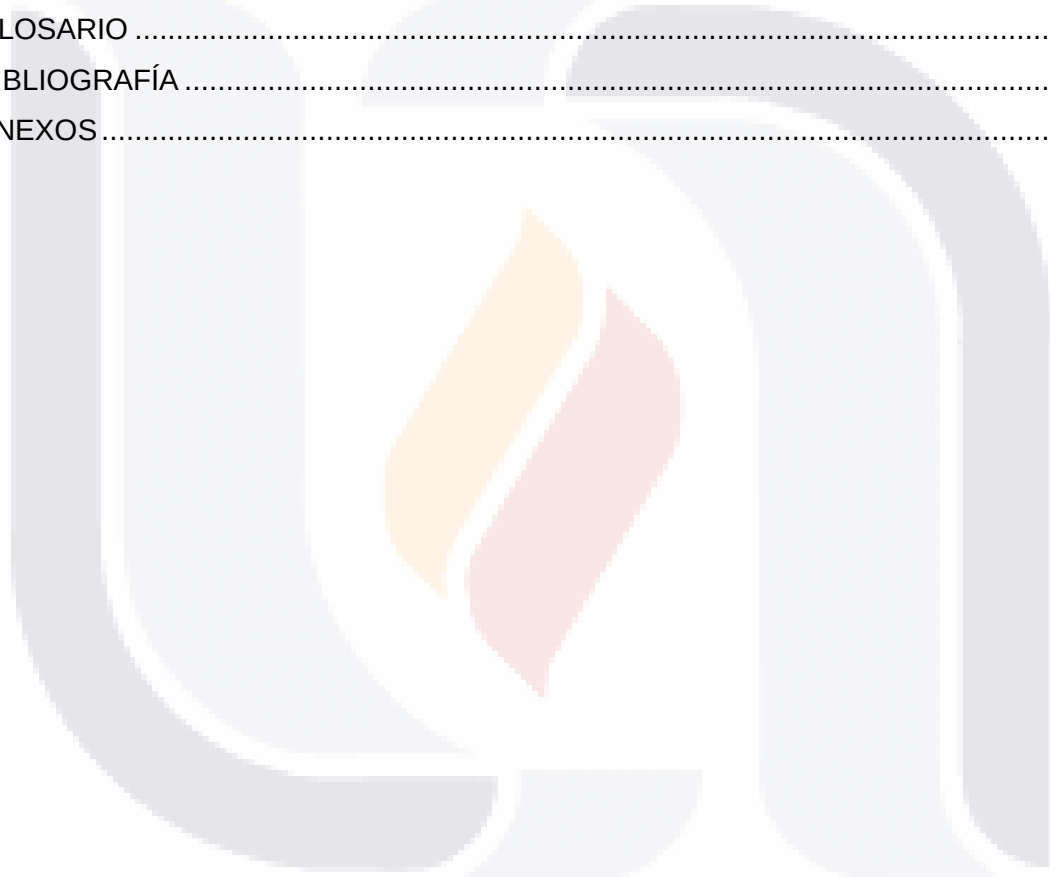
 3.2.3. Alimentación del ganado lechero 27

3.2.3.1. Composición de la RTM.....	28
3.3. CONTAMINACIÓN DE LOS PRODUCTOS AGRÍCOLAS.....	29
3.3.1. Situación actual de la contaminación de productos agrícolas.....	30
3.3.1.1. Mundial.	30
3.3.1.2. Nacional.....	30
3.4. <i>ASPERGILLUS FLAVUS</i>	31
3.4.1. Características morfológicas	31
3.4.1.1. Clasificación taxonómica.....	31
3.4.1.2. Características macroscópicas	32
3.4.1.3. Características microscópicas.....	32
3.4.1.4. Características distintivas.	33
3.4.2. Características biológicas	33
3.4.2.1. Ciclo biológico.....	33
3.4.2.2. Biosíntesis de aflatoxinas.....	35
3.4.3. Condiciones óptimas de crecimiento.....	36
3.4.4. Mecanismo de contaminación.....	36
3.4.5. Métodos de control.....	37
3.4.5.1. Químicos.	37
3.4.5.2. Biológicos.	37
3.5. IMPACTO DE <i>ASPERGILLUS FLAVUS</i> Y AFLATOXINAS.....	38
3.5.1. Aflatoxinas	38
3.5.2. Impacto en la salud animal y producción.....	38
3.5.3. Impacto en la salud humana	39
4. MATERIALES Y MÉTODOS	40
4.1. POBLACIÓN BAJO ESTUDIO	40
4.1.1. Ubicación espacio temporal	40
4.1.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	41
4.1.3. Métodos de muestreo	41
4.1.3.1. Cálculo del tamaño de muestra.....	41
4.2. TÉCNICAS DE MUESTREO Y ANÁLISIS DE LABORATORIO	43
4.2.1. Obtención de muestras	43

4.2.1.1. Muestreo de RTM	43
4.2.1.2. Manejo de muestras de RTM.	43
4.2.2. Aislamiento, identificación y cuantificación de colonias con morfología <i>Aspergillus flavus</i>	43
4.2.2.1. Técnica de vaciado en placa por dilución.....	43
4.2.2.2. Preparaciones con azul de algodón-lactofenol.....	44
4.2.2.3. Cuantificación de UFC fúngicas.	44
4.2.3. Extracción de ADN genómico de aislados con morfología <i>Aspergillus flavus</i> y amplificación de genes	44
4.2.4. Caracterización de la capacidad aflatoxigénica de aislados con morfología <i>Aspergillus flavus</i>	45
4.2.4.1. Vapores de hidróxido de amonio.....	45
4.2.5. Cuantificación de aflatoxinas en muestras de RTM por ELISA.....	45
4.2.6. Cuantificación de aflatoxinas en aislados con morfología <i>Aspergillus flavus</i> obtenidos de la RTM.....	45
4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
4.3.1. Variables y escalas de medición.	46
4.3.2. Proceso de captación de la información.....	46
4.3.3. Análisis e interpretación de la información	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA PRODUCTIVO LECHERO	47
5.1.1. Localización de las UPL por municipio	47
5.1.2. Composición de la RTM.....	48
5.1.3. Procedencia de los insumos empleados en la alimentación de las vacas lecheras	49
5.1.4. Producción y rendimiento de leche en las UPL	52
5.1.5. Activos productivos de las UPL.....	52
5.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS CON MORFOLOGÍA <i>Aspergillus flavus</i>	53
5.2.1. Frecuencia de géneros fúngicos y colonias con morfología <i>Aspergillus flavus</i>	53
5.2.2. Cuantificación de colonias fúngicas totales y de colonias con morfología <i>Aspergillus flavus</i>	54

5.3. AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DIANA DE ADN GENÓMICO DE AISLADOS CON MORFOLOGÍA <i>Aspergillus flavus</i>	56
5.3.1. Región ITS y gen <i>CaM</i>	56
5.4. CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA DE AISLADOS CON MORFOLOGÍA <i>Aspergillus flavus</i>	58
5.5. CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN AISLADOS CON MORFOLOGÍA <i>Aspergillus flavus</i>	58
5.6. CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN RTM	59
5.7. ASOCIACIÓN DE LA PRESENCIA DE COLONIAS CON MORFOLOGÍA <i>Aspergillus flavus</i> CON LA CONTAMINACIÓN POR AF EN LA RTM	60
5.8. ASOCIACIÓN DE FACTORES CON LA CONTAMINACIÓN POR AF DE LA RTM.....	61
5.8.1. Asociación de factores geográficos con la contaminación por AF de la RTM..	61
5.8.1.1. Municipio de localización de la UPL.....	61
5.8.1.2. Origen de los insumos por estado.....	63
5.8.2. Asociación de factores zootécnicos con la contaminación por AF de la RTM..	64
5.8.2.1. Composición de la RTM.....	64
5.8.2.2 Escala de producción.....	65
5.7.3. Asociación de factores socioeconómicos con la contaminación por AF de la RTM	66
5.7.3.1. Bovinos equivalentes.	66
5.7.3.2. Superficie agrícola equivalente de riego.	66
6. DISCUSIÓN	68
6.1. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA PRODUCTIVO LECHERO	68
6.1.1. Producción y rendimiento de leche en las UPL	68
6.1.2. Activos productivos de las UPL.....	68
6.2. PRESENCIA DE COLONIAS CON MORFOLOGÍA <i>Aspergillus flavus</i> EN RTM....	69
6.2.1. Frecuencia de géneros fúngicos y colonias con morfología <i>Aspergillus flavus</i>	69
6.2.2. Cuantificación de colonias fúngicas totales y de colonias con morfología <i>Aspergillus flavus</i>	70
6.3. AMPLIFICACIÓN DE REGIÓN ITS Y GEN <i>CaM</i> DE AISLADOS <i>Aspergillus flavus</i>	70

6.4. CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA DE AISLADOS CON MORFOLOGÍA <i>Aspergillus flavus</i>	71
6.5. CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN RTM	71
6.6. ASOCIACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR AF EN LA RTM CON LA PRESENCIA DE COLONIAS CON MORFOLOGÍA <i>Aspergillus flavus</i>	72
6. 7. ASOCIACIÓN DE FACTORES CON LA CONTAMINACIÓN POR AF DE LA RTM.....	72
7. CONCLUSIONES.....	74
GLOSARIO	75
BIBLIOGRAFÍA	79
ANEXOS.....	88



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Demanda potencial de leche.....	24
Cuadro 2. Producción y productividad por escalas de UPL del ACM.....	27
Cuadro 3. Clasificación de los alimentos para consumo animal	29
Cuadro 4. Ocurrencia natural de aflatoxina B ₁ en alimento balanceado y granos en México.	30
Cuadro 5. Clasificación taxonómica <i>Aspergillus flavus</i>	32
Cuadro 6. Distribución de las UPL (%) en los municipios de Aguascalientes por estrato de producción	48
Cuadro 7. Frecuencia de inclusión de los ingredientes en la RTM de las UPL por estrato de producción	49
Cuadro 8. Frecuencia de UPL que incluyeron en la RTM ingredientes solamente de Aguascalientes y/o de otros estados del ACM.....	50
Cuadro 9. Frecuencia (%) de inclusión en la RTM de ingredientes de los estados del ACM en las UPL por estrato de producción	51
Cuadro 10. Producción y rendimiento de leche por tamaño de UPL.....	52
Cuadro 11. Cantidad de activos productivos con los que cuentan las UPL de acuerdo a su estrato de producción.....	53
Cuadro 12. Proporción de aislados compatibles con la morfología <i>Aspergillus flavus</i> de acuerdo a su capacidad aflatoxigénica y producción de AF (µg/kg) cuantificada mediante prueba de ELISA.....	59
Cuadro 13. Asociación de la presencia de hongos compatibles con morfología <i>Aspergillus flavus</i> aflatoxigénicos con la contaminación por aflatoxinas en la RTM	60
Cuadro 14. Asociación de la presencia colonias con morfología <i>Aspergillus flavus</i> aflatoxigénicas con la contaminación por aflatoxinas en la RTM de acuerdo al estrato de producción de las UPL	61
Cuadro 15. Concentración media de AF (µg/kg) en muestras de RTM y frecuencia (%) de muestras que excedieron el LMP de AF, en relación a la localización por municipio de las UPL.....	62
Cuadro 16. Concentración media de AF (µg/kg ± EE) en muestras de RTM, en relación al municipio de localización y estrato productivo de las UPL.....	62

Cuadro 17. Concentración media de AF ($\mu\text{g/kg}$) y frecuencia (%) de muestras que excedieron el LMP de AF, en relación a la inclusión en muestras de RTM de insumos provenientes de diferentes estados..... 63

Cuadro 18. Concentración media de AF ($\mu\text{g/kg}$) en muestras de RTM en relación a la inclusión de insumos por estado y su estrato de producción. 64

Cuadro 19. Concentración media de AF ($\mu\text{g/kg}$) en muestras de RTM y frecuencia (%) de muestras que excedieron el LMP de AF, en relación a la inclusión de ingredientes. 64

Cuadro 20. Concentración media de AF ($\mu\text{g/kg}$) en muestras de RTM en relación a la inclusión de ingredientes y estrato de producción de las UPL 65

Cuadro 21. Concentración media de AF ($\mu\text{g/kg}$) en muestras de RTM en relación al estrato de producción..... 65

Cuadro 22. Concentración media de AF ($\mu\text{g/kg}$) en muestras de RTM y frecuencia (%) de muestras que excedieron el LMP de AF, en relación a la cantidad de bovinos equivalentes (N°) que poseen las UPL..... 66

Cuadro 23. Concentración media de AF ($\mu\text{g/kg}$) en muestras de RTM y frecuencia (%) de muestras que excedieron el LMP de AF, en relación a la cantidad de hectáreas equivalentes de riego (Ha) de las UPL..... 67

Cuadro 24. Equivalencia a superficie agrícola de riego de los tipos de superficie agrícola 108

Cuadro 25. Bovinos equivalentes de acuerdo a la etapa de ganado bovino..... 108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales países productores de leche en 2017..... 22

Figura 2. Evolución histórica de la producción de leche de bovino en México. 22

Figura 3. Principales estados productores de leche (2009-2018).. 23

Figura 4. Principales estados productores de leche en relación a la superficie territorial (2009-2018)..... 24

Figura 5. Localización del Altiplano Central Mexicano..... 26

Figura 6. Composición nutrimental de los alimentos..... 28

Figura 7. Estructura morfológica típica del genero *Aspergillus*. 31

Figura 8. Crecimiento de colonias de *Aspergillus flavus* en distintos medios de cultivo ... 32

Figura 9. Ciclo biológico de *Aspergillus* spp. 35

Figura 10. Mecanismo de contaminación de *A. flavus* en cultivos agrícolas..... 37

Figura 11. Estructura química de las aflatoxinas. 38

Figura 12. Ubicación del estado de Aguascalientes... 40

Figura 13. Selección de muestra por el método de racimos o clústers 41

Figura 14. Frecuencia (%) de localización de las UPL por municipio..... 47

Figura 15. Frecuencia de inclusión (%) de ingredientes en la RTM.. 48

Figura 16. UPL que sí incluyen y no incluyen insumos provenientes de otros estados del ACM en la alimentación de las vacas lecheras..... 50

Figura 17. Utilización de ingredientes provenientes de los estados del ACM en la RTM empleada en las UPL para la alimentación de las vacas lecheras..... 51

Figura 18. Géneros de colonias fúngicas identificadas por sus características morfológicas obtenidas de muestras de RTM..... 54

Figura 19. Recuento de unidades formadoras de colonias fúngicas totales (UFC/g de muestra) en las muestras de RTM.. 55

Figura 20. Cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC/g de muestra) compatibles con morfología *Aspergillus flavus* de acuerdo a su capacidad aflatoxigénica. 55

Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados de la región ITS..... 56

Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados del gen calmodulina (*CaM*)..... 57

Figura 23. Viraje de color del reverso de cepas de *A. flavus* en agar-coco al contacto con vapores de hidróxido de amonio..... 58

Figura 24. Concentración media de AF (µg/kg) en muestras de RTM por debajo del límite máximo permisible (≤ LMP) de AF y en muestras de RTM que excedieron el límite (>LMP) máximo permisible de AF. 60

Figura 25. Curva de estándar para aflatoxinas totales cuantificadas con ELISA 101



ACRÓNIMOS

ACM	Altiplano Central Mexicano	UPL	Unidad de Producción Lechera
AFB₁	Aflatoxina B ₁	UV	Ultravioleta
AFB₂	Aflatoxina B ₂	°C	Grados Celsius
AFG₁	Aflatoxina G ₁		
AFM₁	Aflatoxina M ₁		
AFM₂	Aflatoxina M ₂		
CaM	Calmodulina		
CAM	Medio agar-coco		
CYA	Czapeck y Agar		
FAO	Food and Agriculture Organization		
g	Gramos		
h	Hora		
ITS	Espaciador transcrito interno		
Kg	Kilogramo		
L	Litro		
LMP	Límite máximo permisible		
mg	Miligramo		
min	Minuto		
mL	Mililitro		
mm	Milímetro		
n	Número de observaciones		
N	Solución Normal		
ng	Nanogramo		
nm	Nanómetro		
NOM	Norma Oficial Mexicana		
P	Probabilidad de "F" en ANDEVA		
PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa		
RBA	Rosa de Bengala Agar		
RTM	Ración total mezclada		
seg	Segundo		
SAS	Statistical Analysis System		
sem	Semana		
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera		
U/L	Unidades por litro		
µg	Microgramo		
µL	Microlitro		
µmol	Micromol		
UFC/g	Unidades formadoras de colonia por gramo		

RESUMEN

La contaminación de alimentos y piensos por hongos toxigénicos y micotoxinas es un problema mundial. Provoca daños en la producción agrícola, la producción pecuaria, la salud animal y la salud humana. Aunque se han realizado varias investigaciones al respecto, la información a nivel regional es escasa. El objetivo de este estudio fue analizar la asociación de factores zootécnicos, geográficos y socioeconómicos con la contaminación de raciones para vacas lecheras por *Aspergillus flavus* aflatoxigénico y aflatoxinas (AF) en el Altiplano Central Mexicano (ACM). Se realizó un muestreo en 99 UPL de Aguascalientes para recolectar muestras de ración total mezclada (RTM) elaboradas con ingredientes procedentes del ACM; se aplicó un instrumento de recolección de datos a los encargados, para obtener información sobre el manejo de las unidades de producción lechera (UPL) y características de la RTM. Se aislaron, identificaron y cuantificaron colonias de *A. flavus* presentes en las muestras de RTM se caracterizó la capacidad aflatoxigénica de los aislados *A. flavus*; mediante técnica de ELISA se cuantificó la concentración de AF en las muestras de RTM y aislados. Los resultados de las variables cuantitativas se analizaron mediante análisis de varianza (ANDEVA) y pruebas de Tukey; las variables categóricas mediante pruebas de chi cuadrada; se consideró un nivel de probabilidad $P < 0.05$. Los resultados obtenidos en las distintas determinaciones, confirmaron la contaminación por AF y por cepas aflatoxigénicas de *A. flavus* y de la RTM. Existió asociación de los factores de las UPL con la contaminación por AF de la RTM; se encontró una mayor concentración de AF en UPL que incluyeron concentrados y o núcleos proteínicos o ingredientes procedentes de San Luis Potosí en la RTM o cuando los establos se localizaron los municipios de Aguascalientes, Pabellón de Arteaga y San José de Gracia. Estos resultados sugieren que es necesario diseñar estrategias más efectivas para el control de la presencia de *Aspergillus flavus* y aflatoxinas en las raciones para vacas lecheras.

Palabras clave: Producción lechera, *Aspergillus flavus*, ración total mezclada, aflatoxinas.

ABSTRACT

The food and feedstuffs contamination by toxigenic fungi and mycotoxins is a worldwide problem. It causes negative effects on agricultural and livestock production, and animal and human health. Although several researches has been done on this regard, at regional level information is limited. The objective of this study was to analyze the association of zootechnical, geographic and socioeconomic factors with contamination of total mixed ration (RTM) for dairy cows by *Aspergillus flavus* aflatoxigenic and aflatoxins (AF) in the Mexican central highlands (MCA); A sampling was carried out in 99 UPL of Aguascalientes to collect samples of total mixed ration (RTM) made with ingredients from the ACM; A data collection instrument was applied to those in charge, to obtain information on the management of dairy production units (UPL) and characteristics of the RTM. The *A. flavus* colonies present in the RTM samples were isolated, identified and quantified using the techniques of: pouring into serial dilution plates, staining with lactophenol blue and microscopic observation. With the ammonium hydroxide vapor technique in coconut agar, the aflatoxigenic capacity of the *A. flavus* isolates was characterized; By means of ELISA technique, the concentration of AF was quantified in the RTM samples and isolates. The results of the quantitative variables were analyzed by analysis of variance (ANDEVA) and Tukey's tests; categorical variables using chi square tests; a probability level $P < 0.05$ was considered. The results obtained in the different determinations confirmed the contamination by AF and by aflatoxigenic strains of *A. flavus* in the RTM. There was an association of UPL factors with the contamination by FA of the total mixed ration; A higher concentration of FA was found in UPL that included protein concentrates and nuclei, or ingredients from San Luis Potosí in the RTM or when the dairy farms were located in the municipalities of Aguascalientes, Pabellón de Arteaga and San José de Gracia. These results suggest the need to design more effective strategies to control the presence of *Aspergillus flavus* and aflatoxins in feed for dairy cows.

Keywords: Dairy production, *Aspergillus flavus*, mixed total ration, aflatoxins

ESTRUCTURA DE LA TESIS

La estructura de esta tesis se organiza de acuerdo a los lineamientos y Procedimientos institucionales vigentes¹ establecidos para la para la elaboración trabajo recepcional para la obtención de grado los estudios de nivel posgrado en la UAA. El documento inicia con una introducción que presenta y contextualiza el proyecto bajo estudio.

En el capítulo 2, se incluye el planteamiento del problema en el marco de una revisión de los principales estudios previos relevantes para la construcción y delimitación del objeto de estudio. Derivadas de los planteamientos anteriores, se presentan la hipótesis y los objetivos que guían el estudio. También se integra una justificación que destaca la relevancia e importancia que representa el estudio dentro del Sistema Agropecuario Nacional.

En el capítulo 3, Marco Teórico, se presentan las aportaciones de diversos autores para la construcción del objeto de estudio, desde las perspectivas teóricas y prácticas.

En el capítulo 4, Materiales y Métodos, se presenta el diseño de investigación empleado, así como las técnicas, instrumentos, formas de recolección de los datos y tipo de análisis de la información, que permitieron la integración analítica y metodológica requerida.

En el capítulo 5, Resultados, se presentan los resultados obtenidos, así como la influencia de los factores incorporados en el estudio, en las magnitudes y proporciones que refieren estudios comparables.

En el capítulo 6, Proyecto de Discusión, se presenta un análisis comparativo de los resultados obtenidos, con base a contrastes con diversas investigaciones comparables y se intenta expresar una reflexión acerca del significado de los hallazgos de este estudio.

En la Conclusión se especifica la factibilidad de alcance aceptable de cumplimiento de los objetivos, así como las implicaciones teóricas y productivas derivadas directamente de las evidencias más relevantes producidas por el estudio.

¹ Universidad Autónoma de Aguascalientes (2016). Manual para la elaboración del trabajo recepcional en los programas de posgrado: tesis o trabajo práctico. Dirección General de Investigación y Posgrado. Departamento de Apoyo al Posgrado Código. Sistema de Gestión de la Calidad de la UAA: DI-040200-29, Revisión: 02, Emisión: 29/08/16. 26 pp.

En la Bibliografía se enlistan las referencias mencionadas en todos los apartados referidos para la elaboración de este informe. También se incluyen diversos Anexos que detallan de manera pormenorizada las técnicas instrumentales que se aplicaron para la obtención de la información.



1. INTRODUCCIÓN

La presencia de micotoxinas u hongos relacionados con la alimentación animal es un problema importante para la salud animal y humana. Más de un cuarto de la producción agrícola del mundo está contaminada por micotoxinas (FAO, 2003). Hasta el momento han sido identificadas cerca de 400 micotoxinas (Chi y Broomhead, 2009), pero las aflatoxinas (AF) son consideradas las más peligrosas, debido a su potencial tóxico y carcinogénico. Las AF son un problema de salud pública, especialmente cuando se asegura que del 20 al 50% de todos los cánceres están relacionados con factores de la dieta (IARC, 2002; OMS, 2018). La exposición crónica a las AF induce efectos mutagénicos, teratogénicos, estrogénicos, inmunotóxicos, nefrotóxicos, y neurotóxicos (Iqbal *et al.*, 2015). Las AF también afectan la salud animal y provocan un descenso en la producción lechera (del Palacio *et al.*, 2016). La mayoría de hongos toxigénicos crecen en los cereales y se estima que del 25 al 40% están contaminados por micotoxinas (Pittet, 1998). Se han identificado cerca de 400 micotoxinas distintas. *Aspergillus flavus* es una especie telúrica dominante y abundante en el planeta. *A. flavus* tiene una gran importancia económica por ser el principal hongo asociado a la producción de AF en los granos, forrajes y otros sustratos (Geiser *et al.*, 2007; Perrone *et al.*, 2007).

Del 25 al 40% de la producción de cereales del mundo está contaminada por micotoxinas (Pittet, 1998). En la República Mexicana se estima que 57% de los alimentos destinados para la producción pecuaria están contaminados por micotoxinas; por otra parte, la incidencia de AF en maíz se ha estimado en 90% (Flores *et al.*, 2006). Aunque a nivel mundial y nacional se han realizado estudios sobre el panorama de contaminación de alimentos por hongos toxigenicos y micotoxinas, la información disponible en la región del Altiplano Central Mexicano sobre la contaminación de alimentos por *Aspergillus flavus* y aflatoxinas y sobre los factores que se asocian a su presencia es escasa y dispersa, por lo que el objetivo del estudio fue evaluar la contaminación por cepas toxigénicas de *Aspergillus flavus* y aflatoxinas de la ración total mezclada (RTM) empleada para la alimentación de vacas lecheras en el Altiplano Central Mexicano, así como analizar su asociación con el origen de los ingredientes, factores socioeconómicos y de manejo zootécnico de las unidades de producción lechera. La información resultante mostrará el panorama actual de contaminación de las raciones destinadas a la alimentación de vacas lecheras y permitirá diseñar estrategias para el control de *Aspergillus flavus* y reducir el

riesgo de exposición a aflatoxinas por parte del ganado lechero y de la población humana de la región del Altiplano Central Mexicano.



2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las micotoxicosis han sido descritas desde la antigüedad. Los primeros casos documentados de estas intoxicaciones datan de la Edad Media en Europa, donde se denominó a un cuadro clínico como “fuego del infierno”, debido a las alucinaciones, psicosis, delirios, convulsiones, sensación de quemazón y necrosis distal, que producían como resultado de la ingestión de alimentos preparados con cereales contaminados con alcaloides del cornezuelo o *Claviceps purpurea*.

La micotoxicología moderna nace en la década de los años 1960, después de que en Inglaterra se presentará una enfermedad en pavos de origen desconocido, que se denominó “enfermedad X de los pavos”. Las causantes fueron micotoxinas biosintetizadas por *Aspergillus flavus*, por lo que se nombraron aflatoxinas. La fuente de contaminación fue maní importado de Sudamérica (Toso *et al.*, 2018). Desde entonces *Aspergillus flavus* y las aflatoxinas han sido estudiadas ampliamente.

Para 1990 existían 8,000 artículos sobre aflatoxinas y se agregó a su toxicidad su efecto carcinogénico (Eaton y Groopman, 1994). Actualmente, a nivel mundial existen más de 12,000 estudios concernientes al tema. Sobre *Aspergillus flavus* y aflatoxinas en producción lechera existen alrededor de 9,300 artículos (Google académico, 2019)

En la república mexicana existen 114 estudios sobre aflatoxinas en general; en los últimos cinco años con relación a la producción lechera, hay menos de diez artículos. En el Altiplano Central Mexicano sólo existen cuatro estudios sobre aflatoxinas en vacas lecheras (EBSCOhost, 2019). Hay pocos estudios en México centrados en el estudio de *Aspergillus*, se da más importancia a las aflatoxinas que a su agente productor.

El Altiplano Central Mexicano, se ha consolidado como una región importante en la producción lechera del país. Es una de las actividades económicas más importantes para su población (Romo-Bacco *et al.*, 2015). Por estudios previos, se sabe que en dicha región es frecuente la presencia de cepas toxicogénicas de hongos del género *Aspergillus*, así como la contaminación subsecuente de aflatoxinas en las dietas de las vacas lecheras (Valdivia *et al.*, 2015). Sin embargo, existe poca información sobre los factores que se asocian a la presencia de este agente fúngico en el alimento, por lo que resulta importante su estudio, de esta manera, se podrán diseñar en un futuro estrategias de control para evitar el riesgo de exposición del ganado lechero y la población humana a las micotoxinas que produce *Aspergillus flavus*.

2.1. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Existe contaminación de la ración total mezclada destinada al consumo de vacas lecheras por *Aspergillus flavus* aflatoxigénico y aflatoxinas en el Altiplano Central Mexicano. La contaminación de la ración total mezclada está asociada a factores zootécnicos, geográficos y socioeconómicos de las UPL.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo general

Analizar la asociación de factores zootécnicos, geográficos y socioeconómicos con la contaminación de la ración total mezclada para vacas lecheras por *Aspergillus flavus* aflatoxigénico y aflatoxinas en el Altiplano Central Mexicano.

2.2.2. Objetivos específicos

2.2.2.1. Realizar un muestreo en unidades de producción lechera en el estado de Aguascalientes para recolectar muestras de ración total mezclada, fabricada con ingredientes procedentes del Altiplano Central Mexicano y aplicar un instrumento de recolección de datos para recopilar información sobre la ración total mezclada y manejo de las unidades de producción.

2.2.2.2. Cuantificar la concentración de aflatoxinas de las muestras de ración total mezclada empleada para la alimentación de vacas lecheras

2.2.2.3. Identificar, aislar y cuantificar las colonias de *Aspergillus flavus* presentes en las muestras de ración total mezclada empleada para la alimentación de vacas lecheras.

2.2.2.4. Caracterizar la capacidad aflatoxigénica y cuantificar la producción de aflatoxinas de las colonias compatibles con *Aspergillus flavus*.

2.2.2.5. Analizar los factores zootécnicos, geográficos y socioeconómicos que se asocian a la contaminación de la ración total mezclada por *Aspergillus flavus* aflatoxigénico y aflatoxinas.

2.3. JUSTIFICACIÓN

Aspergillus flavus es un habitante natural del suelo, es el principal agente asociado a la producción de aflatoxinas, por lo que resulta relevante su investigación. Coloniza por vía primaria o secundaria los cultivos y se acumulan en ellos las aflatoxinas que biosintetiza. Los productos agrícolas contaminados no son distinguibles y pueden ser destinados directamente al consumo humano o al consumo animal. Cuando las vacas lecheras consumen alimentos contaminados con AFB₁ o AFB₂, las moléculas se biotransforman a nivel hepático y son segregadas en leche en forma de AFM₁ y AFM₂ (OMS y FAO, 2012).

Las aflatoxinas son moléculas termoestables; sobreviven aun después de la pasteurización e industrialización de la leche. El consumidor final, al ingerir leche o productos lácteos contaminados con aflatoxinas, sufre daños a la salud (Iqbal *et al.*, 2015). Las aflatoxinas tienen efectos carcinogénicos, hepatotóxicos, teratogénicos, nefrotóxicos, neurotóxicos e inmunosupresores; el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial (OMS, 2018). Las aflatoxinas no solo afectan la salud animal y humana; también provocan descensos en la producción de leche y pérdidas económicas para los productores (del Palacio *et al.*, 2016).

El Altiplano Central Mexicano sobresale en ganadería lechera; es una de las actividades más practicadas y de mayor importancia económica para la región (Camacho Vera *et al.*, 2017). Se sabe que en la zona, es frecuente la presencia de cepas toxigénicas de hongos del género *Aspergillus*, así como la contaminación subsecuente de aflatoxinas en las dietas de las vacas lecheras (Valdivia *et al.*, 2015), sin embargo, hay poca información sobre si los factores zootécnicos, geográficos o socioeconómicos de las UPL se asocian a su presencia en el alimento.

Ante el déficit nacional en producción lechera y el problema de contaminación por aflatoxinas de los insumos destinados a la alimentación de las vacas lecheras, es necesario considerar las opciones que permitan aumentar la producción y calidad de la leche en las unidades de producción existentes.

Con la información que se genere, se conocerá el panorama actual de contaminación por *Aspergillus flavus* y aflatoxinas de alimentos provenientes del Altiplano Central Mexicano destinados al consumo de vacas lecheras y cuáles son los factores que se asocian a su presencia. Los resultados permitirán diseñar estrategias de control del hongo,

que a su vez contribuirán a reducir el riesgo de exposición a aflatoxinas, por parte del ganado lechero y de la población humana de la región.



3. MARCO TEÓRICO

3.1. GANADERÍA LECHERA

3.1.1. Importancia social de la leche

La leche de vaca es un producto de suma importancia para los humanos desde aproximadamente hace 10,000 años. No sólo por su aporte nutrimental, sino que ayuda a prevenir ciertos padecimientos, como: enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial y patologías óseas y dentales (Fernández *et al.*, 2015).

La leche es uno de los productos más importantes y de mayor producción a nivel mundial, además es una fuente de ingresos de alrededor de 150 millones de familias que se dedican a la ganadería lechera en todo el mundo. En la mayor parte de los países en desarrollo, la leche es producida por pequeños productores; dicha actividad, contribuye al bienestar económico, la seguridad alimentaria y la nutrición de los hogares. El ganado bovino aporta el 82% de la producción lechera mundial (FAO, 2019).

3.1.1.1. Aporte nutrimental. La leche está considerada como un alimento completo y equilibrado, brinda un gran contenido de nutrientes en relación a su contenido calórico. Aporta proteínas de alto valor biológico, carbohidratos (lactosa), grasas y vitaminas liposolubles, vitaminas del complejo B y minerales, principalmente, calcio (Ca) y fósforo (P) (Fernández *et al.*, 2015).

3.1.2. Producción de leche

3.1.2.1. Producción mundial. En el mercado mundial la producción de leche se divide en dos grandes grupos integrados, por un lado, los países altamente desarrollados como Estados Unidos de América y los ubicados en Europa, producción que obtienen con elevados programas de subsidios; y, por otro lado están los países con bajos costos de producción como Australia, Nueva Zelanda, Argentina y Uruguay, quienes poseen condiciones agroclimáticas muy favorables para la producción y cuentan con la infraestructura necesaria para una producción eficiente (Loera y Banda, 2017). La producción mundial está liderada por países como Estados Unidos de América, India, China, Brasil y Alemania (Figura 1). México ocupa el decimocuarto lugar en producción

lechera; de cada cien litros que se producen en el mundo, dos a tres litros son de origen mexicano.

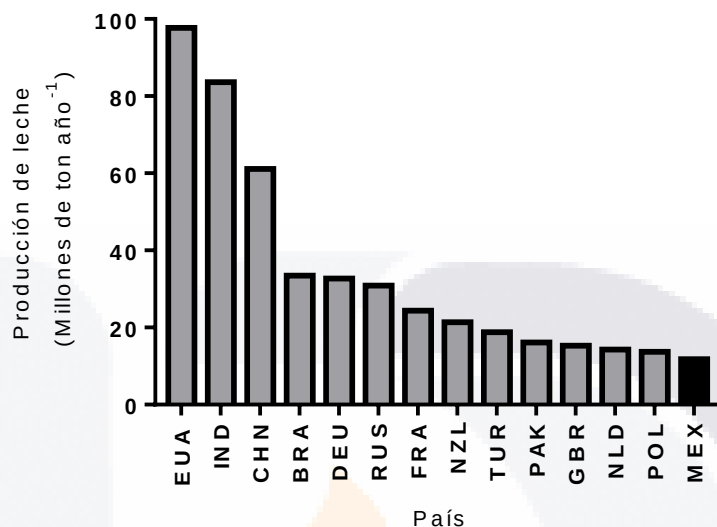


Figura 1. Principales países productores de leche en 2017
Elaboración propia a partir de (FAO, 2018)

3.1.2.2. Producción nacional. La producción nacional de leche de bovino ha presentado una tendencia creciente en los últimos 38 años (Figura 2), sin embargo, la tasa de crecimiento de la producción lechera ha sido menor a la de la población (Loera y Banda, 2017).

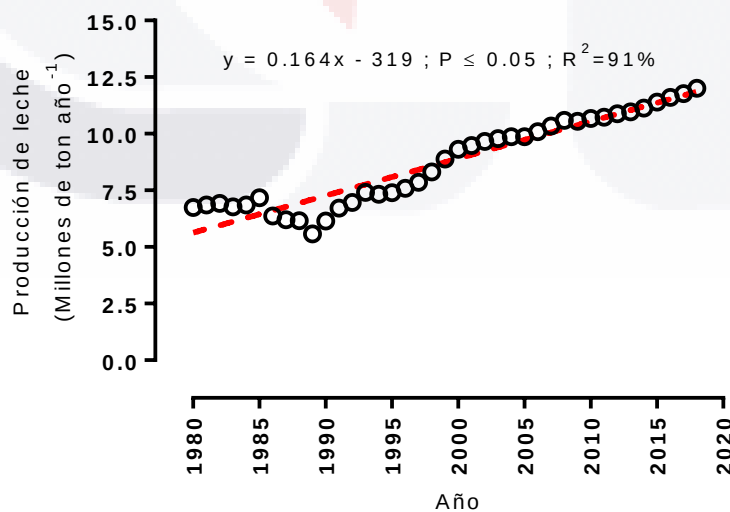


Figura 2. Evolución histórica de la producción de leche de bovino en México. Elaboración propia a partir de (SIAP, 2018a)

Los principales estados productores de leche en la última década fueron: Jalisco, Coahuila, Durango, Chihuahua, Guanajuato, Veracruz, México, Puebla, Hidalgo, Chiapas, y Aguascalientes (Figura 3).

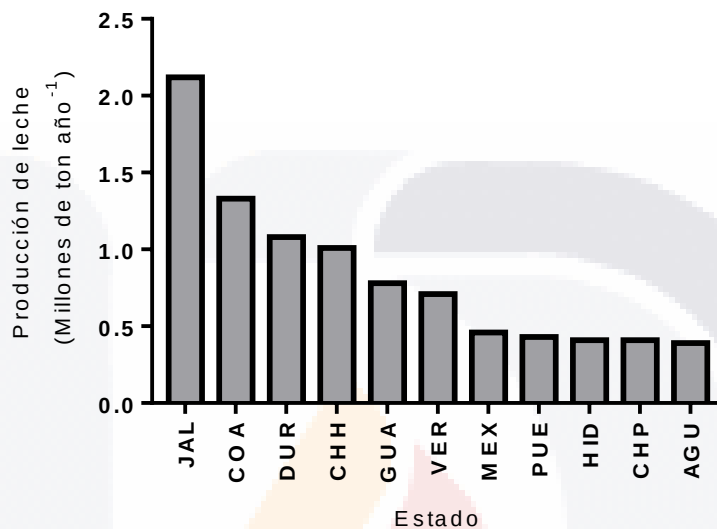


Figura 3. Principales estados productores de leche (2009-2018). Elaboración propia a partir de (SIAP, 2018b).

Los principales estados productores de volumen de leche por unidad de superficie (miles de L/Km²) en la última década, fueron: Aguascalientes, Querétaro, Jalisco, Tlaxcala, Guanajuato, México, Hidalgo, Durango, Puebla y Veracruz (Figura 4).

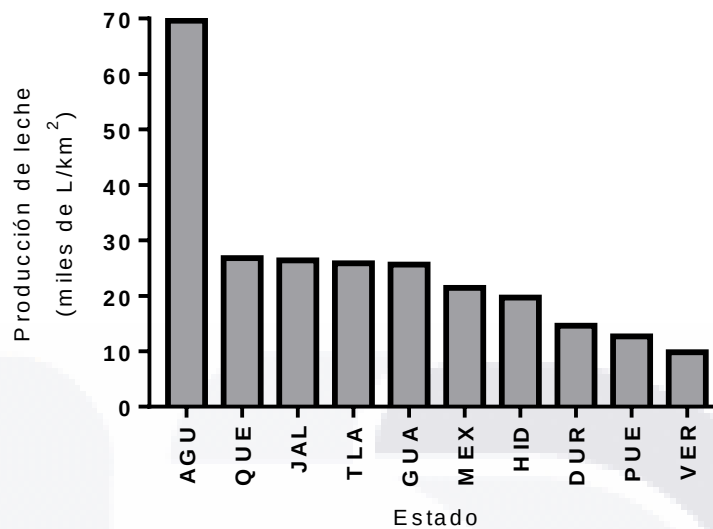


Figura 4. Principales estados productores de leche en relación a la superficie territorial (2009-2018). Elaboración propia a partir de (SIAP, 2018b)

3.1.2.3. Consumo y demanda potencial de leche. El consumo nacional aparente en el año 2018, fue de 15.3 millones de toneladas. La demanda estimada para satisfacer los requerimientos de leche de la población mexicana fue de aproximadamente 31 millones de toneladas (Cuadro 1); en el país solo se produjeron 12 millones de toneladas (SIAP, 2018a). El consumo per cápita nacional del año 2018 fue de 122 L por persona al año, lo que equivale a ingerir 334 mL de leche al día; este consumo está por debajo del recomendado, que es de 500 mL diarios; los países desarrollados consumen en promedio 531mL de leche al día. (OMS y FAO, 2012).

Cuadro 1. Demanda potencial de leche

Edad (años)	Recomendación (mL día ⁻¹) ¹	Población (N° de habitantes) ²	Demanda (10 ⁹ L año ⁻¹)
1 a 3	400	5,782,500	0.84
4 a 8	600	13,341,818	2.92
9 a 18	800	25,163,782	7.35
19 a 50	600	56,522,133	12.38
> 51	800	25,831,267	7.54
TOTAL		126,641,500	31.03

Fuente: Elaboración propia a partir de (INEGI, 2019; Institute of Medicine National Academies, 2019; OMS y FAO, 2012)

Aunque México ocupa el decimocuarto lugar en producción de leche a nivel mundial, no produce la cantidad necesaria para cubrir la demanda de su población; es un importador neto de este producto, ocupando el primer lugar mundial. El rubro más importante de sus importaciones es la leche en polvo, para completar los requerimientos de abasto de la industria, así como del Programa de Abasto Social de Leche de LICONSA (Loera y Banda, 2017)

3.2. PRODUCCIÓN LECHERA EN EL ACM

3.2.1. Altiplano Central Mexicano

El Altiplano Central Mexicano, es una región sobresaliente en la producción lechera, dentro de ella las cuencas lecheras más importantes son las de Aguascalientes, Querétaro y Jalisco. Aguascalientes, Jalisco y Guanajuato, comparten el 29.0% del total de la producción nacional. Aguascalientes cuenta con una posición estratégica, dada su ubicación pues en ella confluyen insumos para la alimentación animal, provenientes de otros estados (Carranza-Trinidad *et al.*, 2007).

3.2.1.1. Localización. El Altiplano Central Mexicano (ACM) o Mesa del Centro (MC) es una región ecológica localizada en la parte central de México (Figura 5). Esta región natural limita al sur con la depresión del Balsas y el eje neovolcánico, al este con la sierra madre oriental y al oeste con la sierra madre occidental. Abarca parte o la totalidad del territorio de los estados de Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, México, Tlaxcala, Puebla, Jalisco, Michoacán y Ciudad de México (Domínguez-Domínguez y Pérez-Ponce de León, 2009).

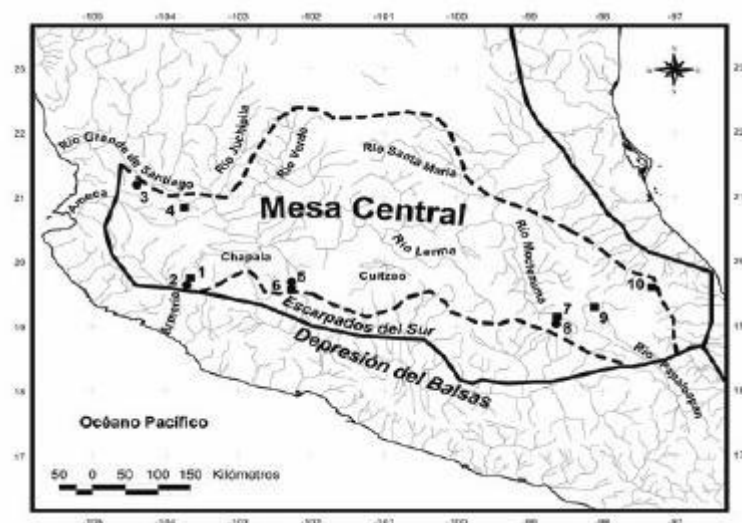


Figura 5. Localización del Altiplano Central Mexicano (Domínguez-Domínguez y Pérez-Ponce de León, 2009).

3.2.1.2. Características fisiográficas. Es una provincia que se caracteriza por amplias llanuras elevadas interrumpidas por algunas sierras. Las llanuras de mayor extensión se localizan en la zona de Ojuelos, en el estado de Jalisco y la zona con mayor presencia de sierras en los Altos de Guanajuato, partes de San Luis Potosí y Zacatecas. Su altitud de promedio es de 1700 a 2300 msnm, mientras que las mayores elevaciones se encuentran a 2500 msnm en la sierra de Guanajuato (INEGI, 2008).

3.2.1.3. Características hidrográficas. La Mesa del Centro está mayormente desprovista de grandes ríos. Algunos de los arroyos del sur de la Mesa alimentan las cuencas del río Lerma-Santiago o el río Pánuco, mientras que en la parte septentrional de la MC existen cuencas endorreicas que son embalsadas para su uso y consumo humano (INEGI, 2008).

3.2.1.4. Características climatológicas. La presencia de las altas cordilleras a los costados del Altiplano Central Mexicano es un factor determinante de su clima. La MC se localiza en una doble sombra orográfica; así, se produce un efecto Föhn que limita la precipitación. En esta región en general la lluvia no es abundante, pues solo hay precipitaciones entre abril y septiembre. Existe una variante de climas según la zona, las temperaturas se encuentran moderadas por la altitud, por lo que el clima no es tan cálido, sin embargo, el clima predominante es el semiseco templado. A causa de esto, los ecosistemas dominantes son el pastizal, el matorral xerófilo y el mezquital (INEGI, 2008).

3.2.2. Tipificación de la producción lechera del ACM

El altiplano central de México se ha consolidado como una región de estatus alto de producción de leche (Camacho Vera *et al.*, 2017).

3.2.2.1. Escala de producción. Con base a diferencias en las características de producción y productividad; en el Altiplano Central Mexicano se distinguen tres escalas de producción en la ganadería lechera: micro y pequeña escala, mediana escala y gran escala (Cuadro 2). En México, las pequeñas UPL constituyen la mayoría de las empresas lecheras, especialmente en las cuencas lecheras del Altiplano Central, este tipo de unidades ocupan a menos de 10 personas y poseen menos de 30 vacas en ordeño; las vacas se mantienen en estabulación libre (Romo *et al.*, 2013).

Cuadro 2. Producción y productividad por escalas de UPL del ACM			
Estrato de producción	Micro y Pequeña escala	Mediana escala	Gran escala
Tamaño del hato (No. de vacas)	Hasta 30	30-100	Mayor a 150
Producción promedio (L/vaca/día)	15.03	16.16	23.50
Vacas en producción (%)	84	83	86
Superficie agrícola de riego (Ha)	Hasta 10	10-100	Mayor de 100
Fuente: Adaptado de (Carranza-Trinidad <i>et al.</i> , 2007; Lozano-Santillán y Islas-Ojeda, 2009; Mariscal-Aguayo <i>et al.</i> , 2017; Romo-Bacco <i>et al.</i> , 2015)			

3.2.3. Alimentación del ganado lechero

La nutrición es importante en el desarrollo y producción del ganado lechero; con una dieta bien balanceada y un manejo adecuado se optimiza la producción de leche, la reproducción y la salud de la vaca. El correcto manejo nutricional del ganado lechero favorece el balance energético, proteico y mineral durante el ciclo de producción, lo cual, involucra aspectos como: el consumo de materia seca, los mecanismos metabólicos involucrados en la obtención de energía, el manejo de productos nitrogenados, la dinámica y función ruminal, así como la calidad y composición de los ingredientes utilizados, además de su manejo y administración (NRC, 2001). Un alimento completo (Figura 6) está constituido por agua, carbohidratos, lípidos, proteínas y minerales (McDonald *et al.*, 2013)

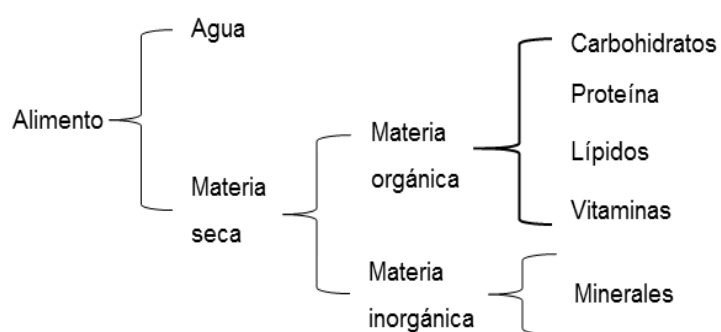


Figura 6. Composición nutrimental de los alimentos

3.2.3.1. Composición de la RTM.

Para cubrir las necesidades nutrimentales del ganado lechero, se les proporcionan alimentos que, son clasificados de acuerdo a sus características químicas y físicas y a los nutrimentos que aportan (Cuadro 3).

Cuadro 3. Clasificación de los alimentos para consumo animal

Clase	Descripción
1	Forrajes secos y alimentos toscos: Henos. Se llaman henos a aquellos forrajes que han sido secados al sol o deshidratados con calor. Estos pueden provenir de leguminosas o gramíneas. Pajas. Se llama paja a la parte aérea de las plantas. Después de la cosecha del grano o la semilla. No contienen espigas, mazorca o panojas. Estas pueden provenir de leguminosas o gramíneas. En México se da el nombre de rastrojo. Cascaras. Se da el nombre de cascaras a la cubierta de los cereales, del algodón, del cacahuete, etc. Cualquier otro producto que contenga más de 18% puede ser incluido en esta clase.
2	Forrajes frescos: Se consideran en esta clase aquellos forrajes que son consumidos frescos ya sean para sean cortados para ser ofrecidos al animal o pastoreados. Estos pueden ser forrajes cultivados y forrajes nativos.
3	Ensilados: Productos obtenidos por la fermentación controlada de un cultivo de alto contenido de humedad. Ensilaje es el nombre que se da al proceso y silo es el recipiente donde el cultivo se somete al proceso de ensilaje. Los ensilados pueden ser de gramíneas, leguminosas y otros cultivos.
4	Ingredientes energéticos: Ingredientes que contienen elevados porcentajes de almidón, carbohidratos solubles o grasas. Se incluyen los cereales de granos y subproductos, los cuales pueden ser con alto contenido en fibra cruda, las grasas, las melazas, las frutas, las raíces y los tubérculos. Cualquier producto con menos del 20% de proteína cruda y menos del 18% de fibra cruda.
5	Ingredientes proteínicos: Ingredientes con 20% o más de proteína cruda, pueden ser de origen animal vegetal. Fuentes de nitrógeno no proteico, dado que los rumiantes las emplean para sintetizar proteína microbiana.
6	Minerales: Elementos inorgánicos. Pueden ser de origen animal o propiamente de origen mineral.
7	Vitaminas: Componentes orgánicos indispensables para las funciones vitales del animal.
8	Aditivos: Substancias adicionadas a la dieta con propósitos particulares. Por ejemplo: medicamentos, pigmentos, aromatizantes y hormonas.

Fuente: (McDonald *et al.*, 2013)

3.3. CONTAMINACIÓN DE LOS PRODUCTOS AGRÍCOLAS

Aspergillus flavus es el hongo del que existe más información sobre su transmisión a los alimentos y es una de las especies contaminantes que se encuentra con más frecuencia en los alimentos almacenados, en particular en los granos; es capaz de prosperar en ambientes de baja actividad hídrica y alta temperatura (Dobson, 2011). Es uno de los hongos transmisibles del suelo, más abundantes en el planeta. Coloniza fácilmente cuando hay una rica fuente de carbono y nitrógeno, aunque puede utilizar una amplia gama de

sustratos naturales, incluidas las proteínas, la elastina y la mucina, así como los carbohidratos complejos como la celulosa, la quitina, la pectina y el xilano (Cotty y Mellon, 2006). La acumulación de micotoxinas en los alimentos y piensos se ven influenciados por múltiples variables, como la actividad del agua (a_w), la temperatura, el pH, la composición de la atmósfera, el sustrato, la interacción entre las especies y el tiempo (Davari *et al.*, 2015).

3.3.1. Situación actual de la contaminación de productos agrícolas

3.3.1.1. Mundial. La FAO (2003) estima que un cuarto de la producción agrícola mundial, está contaminada por alguna o varias micotoxinas. La mayoría de hongos toxigénicos crecen en cereales, se estima que del 25 al 40% están contaminados por micotoxinas (Pittet, 1998). La contaminación por aflatoxinas provoca grandes pérdidas económicas a la agricultura mundial: anualmente se afectan alrededor de 16 millones de toneladas de maíz, 12 millones de toneladas de arroz, 1.8 millones de toneladas de nueces y 2.3 millones de toneladas de soya, entre otros cultivos (Lyn, Abbas, Zablotowicz, y Johnson, 2009).

3.3.1.2. Nacional. En México se estima que el 57% de los alimentos destinados a la producción pecuaria está contaminado por una o varias micotoxinas (Cuadro 4); la incidencia de AF en maíz se ha estimado en 90 % cuyos valores están por encima de los encontrados en otros países (Flores, Hernández y Vázquez, 2006).

Cuadro 4. Ocurrencia natural de aflatoxina B₁ en alimento balanceado y granos en México (Flores, Hernández y Vázquez, 2006).

Tipo	Rango	Ocurrencia	Media	%P
Alimento balanceado	5-61	76	15.32	18.7
Gluten	8-77	83	31.42	60.0
Maíz	3-10	77	5.78	0.0
Sorgo	2-35	57	9.55	3.1

Rango= Concentración $\mu\text{g kg}^{-1}$

Ocurrencia= % de muestras positivas

Media= Concentración media de las muestras positivas $\mu\text{g kg}^{-1}$

%P= Muestras con concentración por encima de los niveles máximos permitidos

3.4. ASPERGILLUS FLAVUS

Aspergillus flavus, pertenece al género *Aspergillus* y a la sección flavi, es el hongo de mayor importancia económica y de más notoria producción de aflatoxinas (Geiser *et al.*, 2007). El término *Aspergillus* fue establecido por primera en 1729 por Micheli para describir a los hongos asexuales cuyo conidióforo se asemejaba al aspergilo, un dispositivo con el cual se rociaba el agua bendita (Scazzocchio, 2019).

3.4.1. Características morfológicas

Aspergillus es un género caracterizado, por la formación de conidióforos (estructura formadora de esporas) con estípites (amplias hifas aéreas especializadas) largos generalmente no septados y ápices usualmente ensanchados formando una vesícula aproximadamente esférica que presenta fiálides (uniseriada) o métulas y fiálides (biseriada) en toda su superficie o parte de ella (Figura 7). Los conidióforos y cabezuelas están originados a partir de una célula especializada denominada “célula pie” (célula de pared gruesa que forma la base del estípite) (Kroeger y Geitmann, 2012). El micelio vegetativo, está conformado por hifas (células tubulares) septadas (Segers *et al.*, 2017).

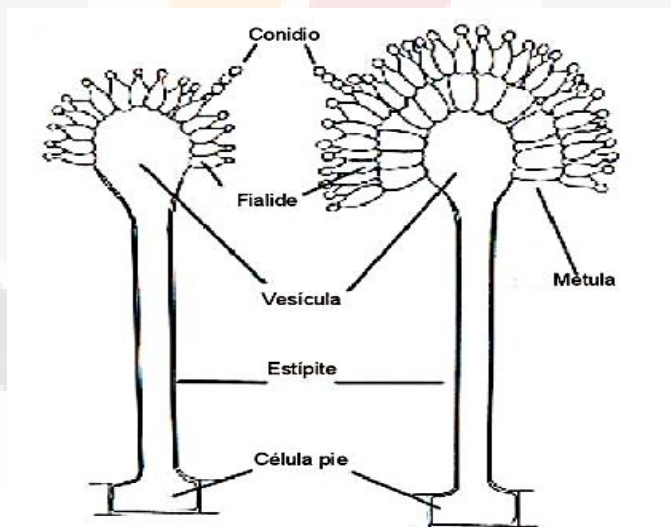


Figura 7. Estructura morfológica típica del genero *Aspergillus* (Pildain, 2006).

3.4.1.1. Clasificación taxonómica. *Aspergillus flavus* en el ámbito de la investigación científica, cuenta con diversas clasificaciones que han cambiado a través del tiempo, sin embargo, las más aceptada es la de Klich (2002). *Aspergillus flavus* pertenece a la sección flavi del genero *Aspergillus* (Cuadro 5).

Cuadro 5. Clasificación taxonómica *Aspergillus flavus*

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Eurotiomycetes
Orden	Eurotiales
Familia	Trichocomaceae
Género	<i>Aspergillus</i>
Subgénero	<i>Circumdati</i>
Sección	Flavi
Especie	<i>Flavus</i>
Nombre científico	<i>Aspergillus flavus</i> Link Fr.

Fuente: Klich (2002)

3.4.1.2. Características macroscópicas. El crecimiento de colonias puede variar, desde un crecimiento rápido que alcanza alrededor de 60 a 70mm de diámetro hasta un crecimiento más lento de 30 a 40mm de diámetro a temperatura ambiente (24 a 26°C) en 10 días. Las colonias, de color verde amarillento, suelen consistir en un micelio basal delgado y de textura estrecha (Frisvad *et al.*, 2019). En medio Czapeck y Agar a 25°C (Figura 8), las colonias toman un color verde oscuro a verde oliva, a veces superpuestas de blanco amarillo grisáceo o amarillo oliva. Micelio blanco; esclerocios, cuando están presentes, marrón oscuro a negro, variables en forma y tamaño. Exudado cuando lo hay, incoloro a marrón. El reverso de la colonia puede ser incoloro, marrón opaco u anaranjado. La textura de la colonia es variable, generalmente de 2-3 mm de profundidad, lanosa o algodonosa (Klich, 2002).



Figura 8. Crecimiento de colonias de *Aspergillus flavus* en distintos medios de cultivo, de derecha a izquierda: Czapeck y Agar, Czapeck y Agar a 37 °C, Czapeck y Agar a 42 °C, Agar Extracto de Levadura Sacarosa, Agar Extracto de Malta, Dicloran Glicerol Agar (Frisvad *et al.*, 2019)

3.4.1.3. Características microscópicas. Color conidial amarillo verdoso, las cabezuelas conidiales radiadas a columnares, conidióforos uni y biseriados. En la mayoría de los aislamientos en Czapeck y Agar a 25°C de incubación (CYA25) al menos 20% de

conidióforos biseriados, algunos casi completamente uniseriados en MEA. Estípites 400-800 x 8-17 μm de largo, paredes generalmente ásperas, ocasionalmente finamente rugosas, generalmente incoloras, a veces muy pálidas. Vesículas largas, globosas a subglobosas, 20-45 μm de diámetro. Métulas que cubren tres cuartos o la totalidad de la superficie de la vesícula; fiálides 7-12 x 3-4 μm . Conidios globosos a elipsoidales de 3-6 μm , con paredes lisas a finamente rugosas. Puede haber esclerocios en ocasiones (Klich, 2002).

3.1.4.4. Características distintivas. La especie se distingue fácilmente de otras especies por caracteres mencionados en claves de identificación. Las características más distintivas de esta especie son colonias de color verde amarillento con estípites de paredes rugosas y conidios lisos o finamente rugosos de 3-6 μm de diámetro. *A. flavus* puede distinguirse de *A. orizae* por su textura menos algodonosa, colores más verdes y conidios más pequeños, de *A. parasiticus* por sus esporas lisas y de *A. fumigatus* porque las vesículas maduras contienen fiálides en toda su superficie (Hoog, 2000; Klich, 2002; Zulkifli y Zakaria, 2017).

3.4.2. Características biológicas

Durante la mayor parte de su ciclo de vida, el hongo existe en forma de micelio o esporas asexuales conocidas como conidios. En condiciones adversas, como la falta de nutrientes adecuados o agua, el micelio fúngico se transformará en estructuras resistentes llamadas esclerocios, que pueden sobrevivir en condiciones ambientales extremas. El hongo sobrevive al invierno como esporas, esclerocios o como micelio en los desechos. Cuando las condiciones se vuelven favorables, los esclerocios germinan directamente para producir nuevas colonias o conidióforos con conidios (Dobson, 2011).

3.4.2.1. Ciclo biológico. Los conidióforos se forman rápidamente durante el ciclo de vida. La formación de la célula pie a partir del micelio y la posterior formación de estípites, son las primeras etapas distintivas dedicadas a la formación de esporas (Dijksterhuis, 2019). *WetA* y *mybA*, son los factores de transcripción en *Aspergillus flavus* y tienen un papel importante en la formación de esporas asexuales (Wu *et al.*, 2017).

El estípite es una carretera de transporte activo para grandes cantidades de bloques de construcción biológicos que garantizan la formación adecuada de hasta 10.000 conidios (esporas asexuales). Varias especies de *Aspergillus* forman una capa de métulas que

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

brotan de la vesícula, y cada métula forma varios fiálides, esto asegura una capa adicional de multiplicación de los extremos productores de esporas. Los núcleos tienen que ser transportados desde la vesícula a las células formadoras de esporas; de lo contrario no se puede formar una cadena de conidios viables. Dentro de las fiálides, los núcleos en continua división proporcionan núcleos hijos que se transfieren a los conidios más jóvenes (Ishi *et al.*, 2005)

La aparición de ciclos de vida pleomórficos en hongos (Figura 9), como el estado sexual (llamado telemorfo) y el estado asexual (el anamorfo), han resultado en una nomenclatura dual para las especies de hongos (Taylor, 2011). Recientemente se ha identificado el telemorfo de *Aspergillus flavus*, clasificado como *Petromyces flavus* (Paterson y Lima, 2011).

Las esporas fúngicas están presentes en agua y aire, que actúan como vehículos de contaminación de alimentos durante toda la cadena alimenticia. En muchos casos, las ascosporas tienen una mayor resistencia al estrés que los conidios y algunas especies producen ascosporas con una resistencia prolongada a temperaturas superiores a 70 ° C. Las ascosporas se pueden activar y germinar aun después de tratamientos como la pasteurización o el procesamiento a alta presión (Slongo y Aragao, 2006).

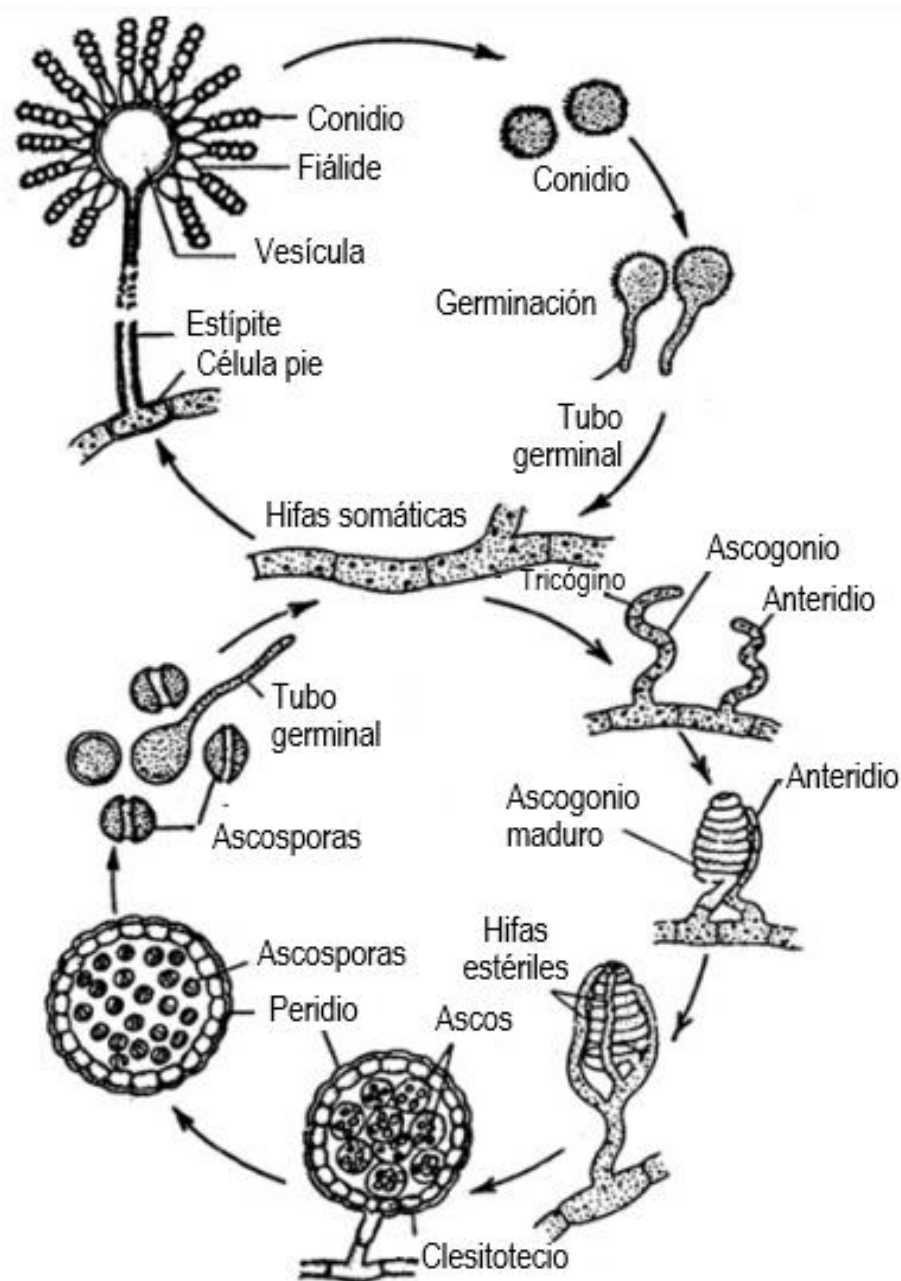


Figura 9. Ciclo biológico de *Aspergillus* spp. Adaptado de (Akar, Avci, y Dusunceli, 2004)

3.4.2.2. Biosíntesis de aflatoxinas. *A. flavus* produce principalmente aflatoxinas B₁ y B₂ y también otras micotoxinas como el ácido ciclopiazónico, ácido kójico, ácido beta-nitropropiónico, aspertoxina, aflatrem y ácido aspergílico. La biosíntesis de las aflatoxinas es afectada por factores genéticos y ambientales (Davari *et al.*, 2015).

Se ha descrito una mayor producción de micotoxinas en presencia de factores que disminuyen la inmunidad de las plantas hospederas, como daño por insectos, mala fertilización y sequía, entre otros. También, hay factores relacionados con el transporte, almacenamiento y procesamiento del alimento, en particular la humedad, la temperatura, el tiempo de almacenamiento y el grado de invasión fúngica inicial (Carreño-Venegas, Hurtado-Guerra, y Navas-Navas, 2014).

Existen dos morfotipos de cepas, S y L, en laboratorio, en medios de cultivo, los aislamientos de suelo de cepas tipo S, producen niveles más altos de aflatoxinas (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). La biosíntesis de aflatoxinas está regulada por un complejo mecanismo, dirigido por los genes reguladores específicos de la vía, aflR y en menor medida aflS (Meyers y Obrian, 1998; Yu, 2012); Su formación tiene lugar al final de la fase de crecimiento micelial, durante la fase estacionaria, estando a menudo asociada con la diferenciación y la esporulación (Santini y Ritieni, 2013).

3.4.3. Condiciones óptimas de crecimiento

Tiene la capacidad de sobrevivir a temperaturas que varían de 12°C a 48°C, pero su temperatura de crecimiento óptima varía de 28°C a 37°C, humedad del ambiente de 88 a 95%, actividad de agua de 0.99, temperatura óptima para la producción de micotoxinas entre 25 y 30°C, pH óptimo para el desarrollo de la cepa de 3.5-5.5 (Pitt y Hocking, 2009).

3.4.4. Mecanismo de contaminación

A. flavus tiene como fuentes de inóculo primario a los conidios desarrollados a partir de los esclerocios esporogénicos que permanecen en el suelo como estructuras de resistencia (Wicklowsky, 1983). Los esclerocios dispersados en la cosecha permanecen en el suelo durante el invierno produciendo conidióforos y conidios en primavera (Figura 9). Los conidios son diseminados por el aire y por insectos hacia las partes florales y hojas de los cultivos, constituyendo una fuente de inóculo secundario (Diener *et al.*, 1987).

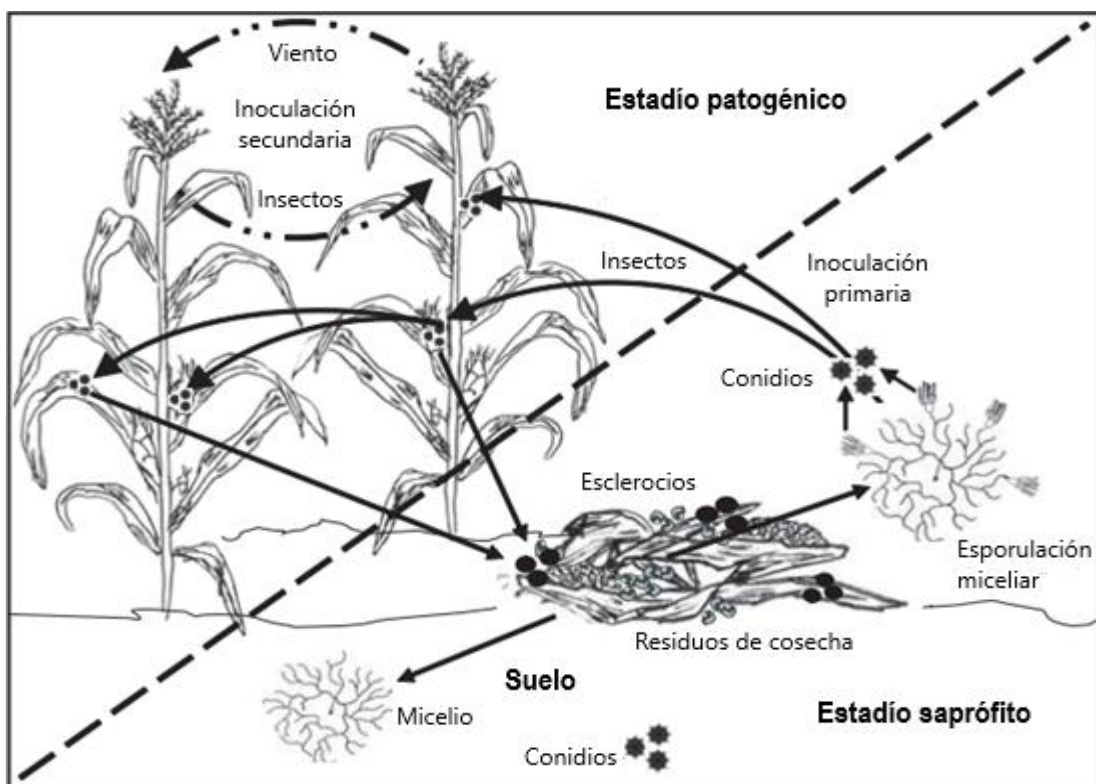


Figura 10. Mecanismo de contaminación de *A. flavus* en cultivos agrícolas. Adaptado de (Abbas *et al.*, 2009).

3.4.5. Métodos de control

3.4.5.1. Químicos. Los estudios han demostrado que los alimentos contaminados por aflatoxinas pueden ser detoxificados mediante el uso de sales inorgánicas y ácidos orgánicos, amonificación y el uso de los agentes aglutinantes de la AFB₁ (Dixon *et al.*, 2008).

3.4.5.2. Biológicos. El control biológico, se basa en el uso de cepas atoxigénicas de *Apergillus flavus*, para excluir competitivamente las cepas toxigénicas y reducir la contaminación potencial de los productos agrícolas por aflatoxinas. La competencia con las cepas toxigénicas es mejor cuando la primera en entrar en contacto con el huésped es la cepa atoxigénica y es independiente de la capacidad competitiva innata de las cepas atoxigénicas.

3.5. IMPACTO DE *ASPERGILLUS FLAVUS* Y AFLATOXINAS

3.5.1. Aflatoxinas

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios de alta actividad biológica producidos por hongos filamentosos específicos de la sección Flavi de *Aspergillus* (García y Heredia, 2006). En general, las micotoxinas actúan como antibióticos, favoreciendo la persistencia del hongo en determinados sustratos.

Las aflatoxinas por su estructura química se clasifican como difurano-cumarinas; las cuatro AF producidas naturalmente son B₁, B₂, G₁ y G₂ (Figura 11). Las letras B y G se refieren a la fluorescencia que presentan bajo luz UV en placas de cromatografía delgada: azul (blue) y verde (green). Los subíndices 1 y 2 se refieren al patrón de separación en las placas cromatográficas (Toso *et al.*, 2018).

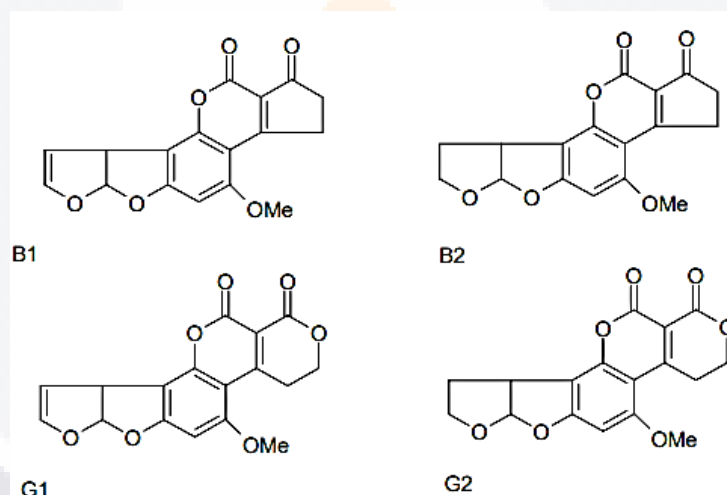


Figura 11. Estructura química de las aflatoxinas (Pildain, 2006).

3.5.2. Impacto en la salud animal y producción

Aspergillus flavus puede afectar directamente causando daño mecánico durante la alimentación, o indirectamente segregando y propagando aflatoxinas (Variane *et al.*, 2018). Los altos niveles de hongos y micotoxinas contenidos en los ingredientes destinados a la alimentación de vacas lecheras, afecta la salud de los animales y provoca pérdidas en la producción (del Palacio *et al.*, 2016).

3.5.3. Impacto en la salud humana

Cuando las aflatoxinas B₁ y B₂ son ingeridas por las vacas lecheras, una proporción del 0.17 al 3.33% se biotransforman a nivel hepático en el citocromo P₄₅₀ microsomial y son excretadas en leche como aflatoxinas M₁ y M₂, que son compuestos de menor toxicidad que las moléculas predecesoras, pero de gran importancia por el consumo de leche por los humanos, especialmente infantes (OMS y FAO, 2012).

Se han descrito en personas efectos tóxicos por aflatoxinas relacionados con inhibición de la síntesis de proteínas, síndromes de Reye y de Kwashiorkor especialmente en niños de los trópicos; inmunosupresión, irritación dérmica, disrupciones endocrinas, hepatitis aguda y otras perturbaciones metabólicas; el cuadro clínico incluye hígado graso y edema cerebral severo. La exposición a largo plazo favorece la presentación de efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, estrogénicos, inmunotóxicos, nefrotóxicos y neurotóxicos (Steyn y Stander, 1999).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. POBLACIÓN BAJO ESTUDIO

4.1.1. Ubicación espacio temporal

Los muestreos se realizaron de julio a septiembre de 2019 en unidades de producción lechera de Aguascalientes (Figura 12), dado que pertenece a la provincia del Altiplano Central Mexicano y en este confluyen productos agrícolas provenientes de los estados que lo conforman. De igual manera, el manejo de las unidades de producción lechera es similar en toda la región.

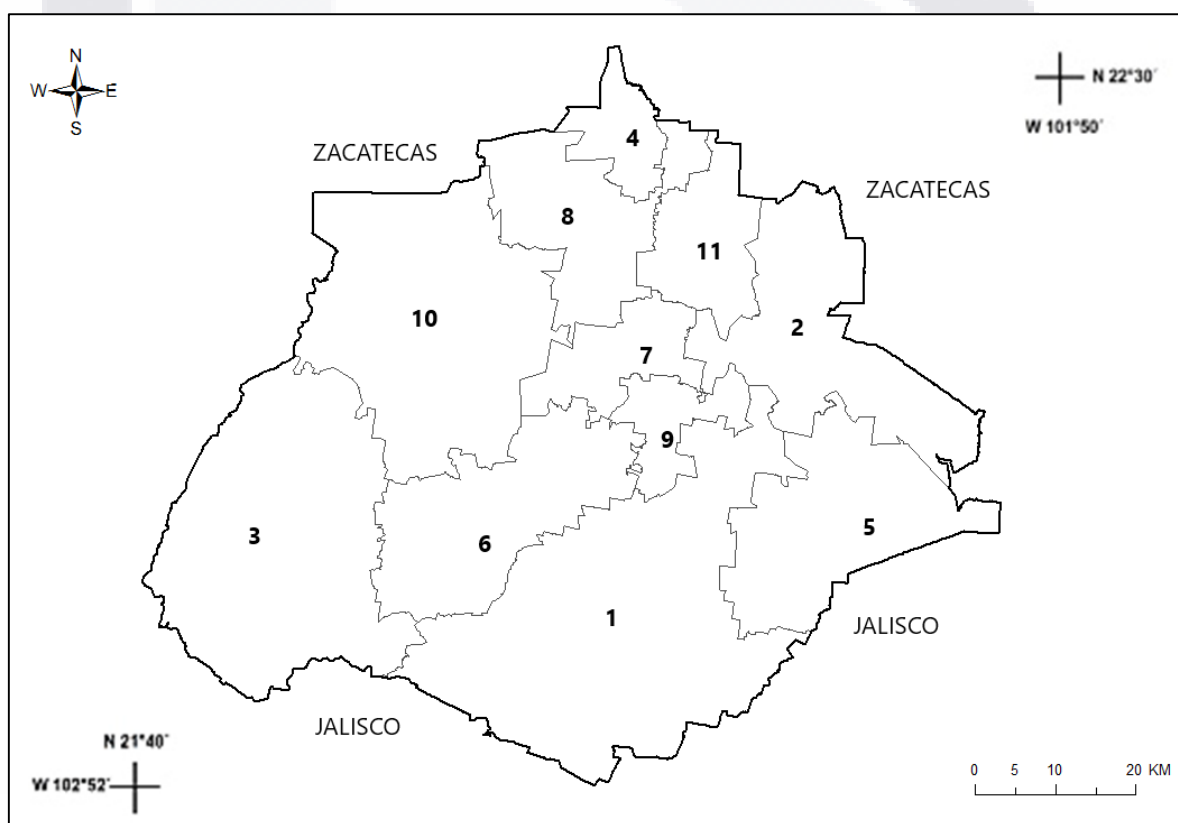


Figura 12. Ubicación del estado de Aguascalientes. Los números señalan los municipios. (1) Aguascalientes (2) Asientos (3) Calvillo (4) Cosío (5) El Llano (6) Jesús María (7) Pabellón de Arteaga (8) Rincón de Romos (9) San José de Gracia (10) San José de Gracia (11) Tepezalá. Elaboración propia con datos de INEGI, 2019.

4.1.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

Se incluyeron establos registrados en los padrones SADER (DPAI), la AGLPLA y centros de acopio LICONSA que proporcionaron el permiso para la toma de muestra de la RTM y la aplicación del instrumento de recolección de datos. Se excluyeron las unidades de producción de leche que no brindaron autorización para participar en el muestreo y las unidades en las que la ración total mezclada no incluyó al menos un ingrediente procedente de los estados que conforman el Altiplano Central Mexicano.

4.1.3. Métodos de muestreo

Para la selección de la muestra se usó el método de racimos o clústers (Figura 13), empleado para el estudio de poblaciones o unidades geográficas a gran escala (Hernández-Sampieri *et al.*, 2014b). la población de estudio de la investigación fue el alimento del Altiplano Central Mexicano destinado para consumo de vacas lecheras. En Aguascalientes, debido a su posición estratégica, confluyen insumos para la alimentación del ganado provenientes de los demás estados que conforman el ACM (Carranza-Trinidad *et al.*, 2007). Aguascalientes fue la unidad de análisis, de la que se obtuvo el marco muestral con base en el número total de unidades de producción lechera del estado.

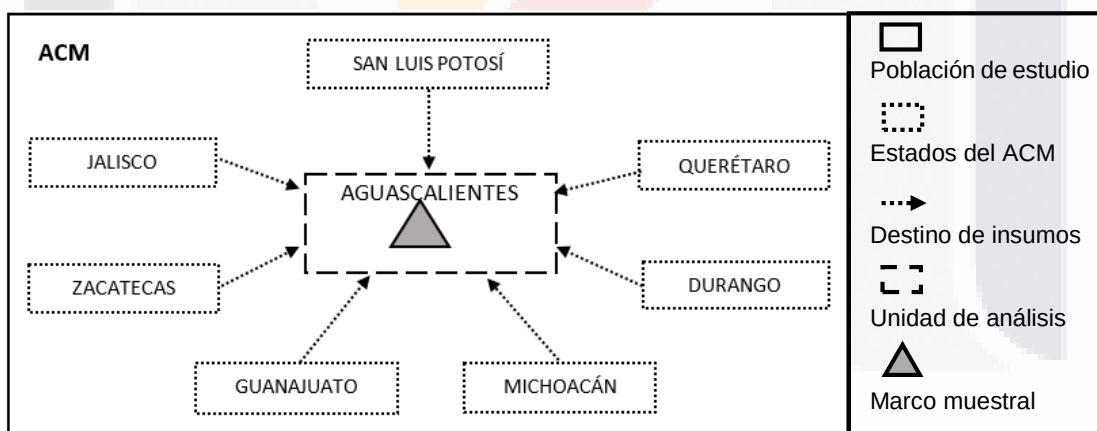


Figura 13. Selección de muestra por el método de racimos o clústers

4.1.3.1. Cálculo del tamaño de muestra. Se calculó el tamaño de muestra para una población finita (sin reemplazo) para estimar la proporción de unidades de observación se empleó la fórmula siguiente (Segura y Honhold, 2000):

$$n = \frac{NZ^2 pq}{Nd^2 + Z^2 pq}$$

Donde

n es el tamaño de muestra seleccionado

N es la población total disponible

Z , el valor crítico de la distribución

d , la precisión deseada

p , la proporción esperada de unidades de observación con la característica buscada

q , la proporción esperada de unidades de observación sin la característica buscada ($q = 1 - p$).

El cálculo para el tamaño de la muestra se realizó con un nivel de confianza del 95%, una proporción o prevalencia esperada de 0.5 unidades de producción de leche con ración total mezclada contaminada por *A. flavus*, una precisión de 10% y una población total disponible de 3155 unidades de producción lechera (SAGARPA, 2010).

$$N = \frac{(3155)(1.96^2)(0.5)(0.5)}{(3155(0.1^2)) + ((1.96^2)(0.5)(0.5))}$$

$$N = \frac{3030.062}{31.55 + 0.9604}$$

$$N = \frac{3030.062}{32.5104}$$

$$N = 93.20$$

Las unidades de producción se eligieron al azar de los padrones SADER (DPAI), la AGLPLA y centros de acopio LICONSA, se decidió coleccionar muestras de RTM en 99 UPL, previendo la eliminación o exclusión de alguna muestra.

4.2. TÉCNICAS DE MUESTREO Y ANÁLISIS DE LABORATORIO

4.2.1. Obtención de muestras

4.2.1.1. Muestreo de RTM. Dibujando imaginariamente una “M” sobre el pesebre como lo describe la Norma Oficial Mexicana (NOM-188-SSA1-2002) se identificaron cinco puntos de donde se tomó una muestra de un kg por cada sitio, se depositaron en una bolsa de plástico, se homogeneizaron y de la muestra compuesta homogénea de cinco kg, se tomó solamente un kg para la identificación y cuantificación de hongos del género *Aspergillus* y cuantificación de AF. Durante el muestreo, se aplicó un instrumento de recolección de datos para la obtención de información sobre el manejo de las UPL y características de la ración total mezclada (Anexo A).

4.2.1.2. Manejo de muestras de RTM. Las muestras de ración total mezclada se procesaron en las instalaciones del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes para su análisis.

Se secaron en una estufa de alta temperatura con circulación de aire forzado (OF-22G JEOI-TECH, Lab Companion, Corea) a 60°C durante 24 horas y se molieron en un molino universal de funcionamiento continuo (MF series 10 Basic, IKA®-Werke, Alemania) hasta obtener un tamaño de partícula de entre 500 y 800 μ .

Las muestras secas y molidas se almacenaron en refrigeración dentro de bolsas con cierre hermético, se identificaron con la fecha de muestreo, la UPL de donde se obtuvo y un número consecutivo indicando el orden en el que se realizaron los muestreos. Los datos se vaciaron en una hoja electrónica de cálculo usando el software Microsoft Excel 2016.

4.2.2. Aislamiento, identificación y cuantificación de colonias con morfología *Aspergillus flavus*

4.2.2.1. Técnica de vaciado en placa por dilución. A las muestras molidas se les agregó peptona de caseína estéril al 0.1%, se prepararon cuatro diluciones por cada muestra (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}), se sembraron en medios de cultivo rosa de bengala agar (RBA) y Czapeck, y se incubaron en obscuridad de 27-30°C de 5 a 7 días ([Anexo B](#)).

4.2.2.2. Preparaciones con azul de algodón-lactofenol. Se realizaron preparaciones con azul de algodón-lactofenol; se tomó una porción de la colonia de interés y se fijó con el lactofenol sobre un portaobjetos estéril (



[Anexo C](#)). Se observaron sus estructuras morfológicas en el microscopio óptico (Carl Zeiss, Axiostar plus, EUA) a diferentes magnificaciones para la identificación de los hongos a nivel de género, con base en las descripciones especializadas de Barnett y Hunter (1998). Con la ayuda de las claves taxonómicas de Klich (2002) se identificaron las colonias del género *Aspergillus* ([Anexo D](#)).

4.2.2.3. Cuantificación de UFC fúngicas. En una bitácora se realizó el registro del número de colonias y del género de la flora fúngica reconocida en cada muestra de RTM. De igual forma, se registraron las colonias con la morfología *Aspergillus flavus*. Se realizó la cuantificación de UFC/g de muestra de RTM con ayuda de una fórmula ([Anexo C](#)). Los resultados se clasificaron en recuentos nulos (0 UFC/g), bajos ($\leq 10^3$ UFC/g), moderados ($>10^3 \leq 10^5$ UFC/g) y altos ($>10^5$ UFC/g).

4.2.3. Extracción de ADN genómico de aislados con morfología *Aspergillus flavus* y amplificación de genes

A partir de cultivos monospóricos de posibles colonias *Aspergillus flavus*, se realizaron pases de disco de micelio a tubos Falcon con caldo papa y dextrosa. Después de un periodo de incubación de 48 horas a 30°C se realizó la extracción de ADN de la masa celular que creció. La calidad y cantidad del ADN genómico se visualizó mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las muestras de ADN se conservaron en congelación a -20°C ([Anexo H](#)).

Se realizó la amplificación de fragmentos del ADN genómico; se utilizaron los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 (Thermo Fisher Scientific) para la región ITS1-5.8S-ITS2-ARNr y los iniciadores CMDA7-F y CMDA8-R (Thermo Fisher Scientific) para el gen *CaM*. La amplificación de las secuencias ITS y *CaM* se basó en los protocolos descritos por White *et al.*, (1990) y Geiser *et al.*, (1998), respectivamente. La calidad de los productos de PCR se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, se incluyó una escalera de 100 pb como marcador de peso molecular (Thermo Fisher Scientific). Se visualizaron las bandas en el fotodocumentador de imágenes ([Anexo I](#)).

4.2.4. Caracterización de la capacidad aflatoxigénica de aislados con morfología *Aspergillus flavus*

4.2.4.1. Vapores de hidróxido de amonio. Para la caracterización aflatoxigénica de los *Aspergillus flavus* aislados y purificados de la ración total mezclada, se realizaron cultivos monospóricos en cajas Petri con medio de cultivo agar-coco y se incubaron a 25°C por tres días. Las placas Petri se colocaron boca abajo y en la tapa se adicionó hidróxido de amonio al 25%, el reverso de la colonia las cepas productoras de AF viró a color rosa después de aplicar la solución de amonio (Anexo E).

4.2.5. Cuantificación de aflatoxinas en muestras de RTM por ELISA

La cuantificación de AF totales en las muestras de RTM se realizó con un kit comercial de ELISA competitivo con un nivel mínimo de detección de 1.7 µg/kg y un nivel máximo de detección de 45.00 µg/kg (RIDASCREEN FAST® aflatoxin R-5202, R-Biopharm, Alemania). La extracción de aflatoxinas se hizo con metanol al 70% y cada muestra se depositó por duplicado en los pocillos de la placa y se leyó la absorbancia de las muestras en un lector de microplacas Biotek a 450 nm (ELx800TM, Bio Tek, EUA), cuyos resultados fueron comparados con una curva de calibración para concentración de AF (Anexo F).

4.2.6. Cuantificación de aflatoxinas en aislados con morfología *Aspergillus flavus* obtenidos de la RTM

La cuantificación de AF totales de los aislados obtenidos de la RTM (Anexo G), se realizó de igual forma con el kit comercial de ELISA competitivo con un nivel mínimo de detección de 1.7 µg/kg y un nivel máximo de detección de 45.00 µg/kg (RIDASCREEN FAST® aflatoxin R-5202, R-Biopharm, Alemania). La extracción de aflatoxinas se realizó con metanol a partir de los cultivos monospóricos de los aislados compatibles con la morfología de *Aspergillus flavus* aislados de la RTM; cada muestra se depositó por duplicado en los pocillos de la placa y se leyó la absorbancia de las muestras en un lector de microplacas Biotek a 450 nm (ELx800TM, Bio Tek, EUA), cuyos resultados fueron comparados con una curva de calibración para concentración de AF.

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.3.1. Variables y escalas de medición. Se consideraron variables categóricas y cuantitativas, de carácter geográfico, zootécnico y socioeconómico. Sus características se detallan en el Anexo J.

4.3.2. Proceso de captación de la información

Los datos de todas las variables cuantitativas y cualitativas obtenidos en los muestreos, análisis de laboratorio y aplicación de encuestas se capturaron en una hoja electrónica de Microsoft Excel® para facilitar su análisis.

4.3.3. Análisis e interpretación de la información

4.3.3.1. Pruebas estadísticas. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA), se realizaron también pruebas de Tukey o Bonferroni con un nivel de significancia menor o igual a 0.05 usando el software *Statistical Analysis System* (2004). Para identificar las diferencias significativas en las variables categóricas se realizaron pruebas de Chi cuadrada (χ^2). Se consideró un nivel de probabilidad $P < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA PRODUCTIVO LECHERO

5.1.1. Localización de las UPL por municipio

Las UPL del estudio se distribuyeron en seis municipios del estado de Aguascalientes (Figura 14). La mayor cantidad de establos se concentró en el municipio capital Aguascalientes (56.6%); el resto en los municipios de Rincón de Romos (19.2%), Pabellón de Arteaga (18.2%), Jesús María (3.0%), San José de Gracia (2.0%) y Tepezalá (1.0%).

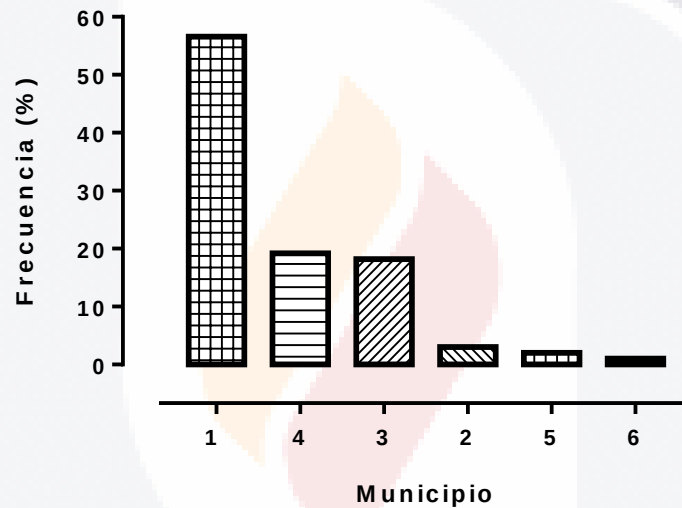


Figura 14. Frecuencia (%) de localización de las UPL por municipio. Aguascalientes (1), Jesús María (2), Pabellón de Arteaga (3), Rincón de Romos (4), San José de Gracia (5), Tepezalá (6).

En el municipio de Aguascalientes se localizó la mayor proporción de UPL de las tres categorías productivas (Cuadro 6): micro y pequeña (54.5%), mediana (54.5%) y grande (60.7%). En los municipios de Aguascalientes, Jesús María y Pabellón de Arteaga, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) entre las proporciones de establos de los estratos productivos. Sin embargo, en Rincón de Romos, los porcentajes sí mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$); hubo una cantidad mayor de establos grandes (33.3%), seguido de medianos (12.1%) y micro y pequeños (12.1%). En el municipio de San José de Gracia solamente se encontraron UPL micro y pequeñas (6.1%) y en Tepezalá sólo grandes (3.0%).

Cuadro 6. Distribución de las UPL (%) en los municipios de Aguascalientes por estrato de producción

Estrato de producción	Municipio						Total
	AGS (%)	JM (%)	PA (%)	RR (%)	SJG (%)	TEP (%)	
Micro y pequeña	54.5 ^a	6.1 ^a	21.2 ^{ab}	12.1 ^b	6.1 ^a	----	100
Mediana	54.5 ^a	3.0 ^{ab}	9.2 ^b	33.3 ^a	----	----	100
Grande	60.7 ^a	----	24.2 ^a	12.1 ^b	----	3.0 ^a	100
Total	56.6	3.0	18.2	19.2	2.0	1.0	100

AGS = Aguascalientes; JM = Jesús María; PA = Pabellón de Arteaga; RR = Rincón de Romos; SJG = San José de Gracia; TEP = Tepezalá.

^{a,b}. Medias con diferente literal en la columna de cada municipio, representan diferencias significativas ($P < 0.05$).

5.1.2. Composición de la RTM

La ración con la que se alimentó a las vacas lecheras en las UPL del estudio, resultó muy heterogénea en composición; se emplearon diversos ingredientes y en distintas proporciones en cada estable para su elaboración. De acuerdo a la clasificación de ingredientes para la alimentación animal, los insumos utilizados con mayor frecuencia en las UPL (Figura 15) fueron las pajas y alimentos toscos (89.9%), los ensilados (88.9%) y los forrajes frescos (81.8%); seguidos por los concentrados y/o núcleos proteínicos (78.8%), granos y semillas (41.4%), los alimentos y, por último, los subproductos (21.2%).

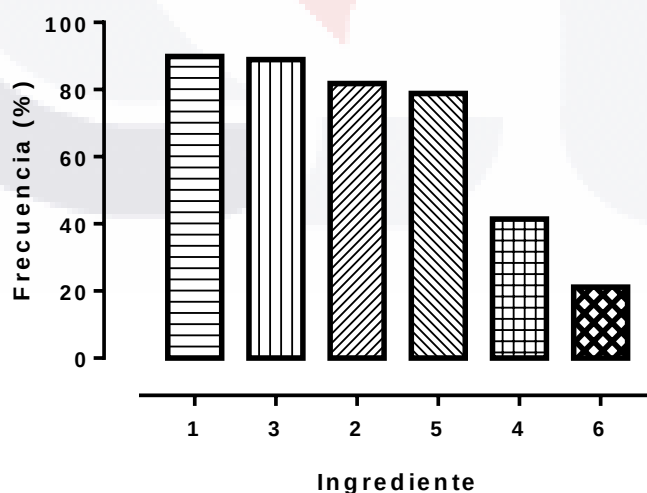


Figura 15. Frecuencia de inclusión (%) de ingredientes en la RTM. Pajas y alimentos toscos (1), forrajes frescos (2), ensilados (3), granos y semillas (4), concentrados y núcleos proteínicos (5), subproductos (6).

La proporción de UPL que incluyeron pajas y alimentos toscos, forrajes frescos y concentrados y/o núcleos proteínicos en la RTM, no presentó diferencias significativas ($P>0.05$) entre los distintos estratos de producción; sin embargo, sí se registraron diferencias significativas ($P<0.05$) en la frecuencia de inclusión de ensilados, granos y semillas y subproductos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Frecuencia de inclusión de los ingredientes en la RTM de las UPL por estrato de producción

Estrato de producción UPL	Inclusión ingredientes en la RTM					
	PyAT (%)	FF (%)	ENS (%)	GyS (%)	CyNP (%)	SUBP (%)
Micro y pequeña	87.9 ^a	81.8 ^a	75.8 ^b	27.3 ^b	72.7 ^a	12.1 ^b
Mediana	90.9 ^a	78.8 ^a	90.9 ^a	45.5 ^a	81.8 ^a	12.1 ^b
Gran	90.9 ^a	84.8 ^a	100 ^a	51.5 ^a	81.8 ^a	39.4 ^a
Total	89.9	81.8	88.9	41.4	78.8	21.2

UPL = Unidad de producción lechera; RTM = Ración total mezclada; PyAT = Pajas y alimentos toscos; FF = Forrajes frescos; ENS = Ensilados; GyS = Granos y semillas; CyNP = Concentrados y/o núcleos proteínicos; SUBP = Subproductos.

^{a,b}. Medias con diferente literal en la columna de cada ingrediente, representan diferencias significativas ($P<0.05$).

5.1.3. Procedencia de los insumos empleados en la alimentación de las vacas lecheras

En la caracterización de la alimentación de las vacas lecheras, se encontró que, el 100% de UPL incluyeron en la RTM ingredientes del estado de Aguascalientes. El 29.3% de los establos alimentaron a su hato solamente con ingredientes producidos en el estado y el 70.7% integró a su dieta insumos provenientes de otros estados pertenecientes al ACM. (Figura 16).

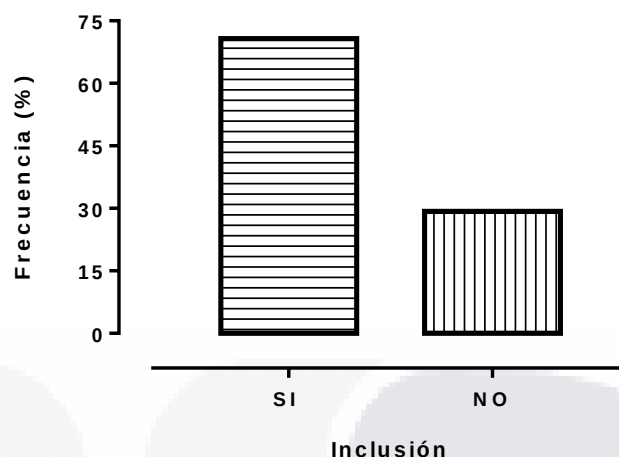


Figura 16. UPL que sí incluyen y no incluyen insumos provenientes de otros estados del ACM en la alimentación de las vacas lecheras.

La inclusión de insumos provenientes de otros estados del ACM en las UPL de acuerdo a su estrato de producción, mostró diferencias significativas ($P < 0.05$); existió una mayor proporción de establos grandes que incluyó ingredientes de otros estados, en comparación con los establos de micro y pequeña escala (Cuadro 8).

Cuadro 8. Frecuencia de UPL que incluyeron en la RTM ingredientes solamente de Aguascalientes y/o de otros estados del ACM.

Estrato de producción UPL	Inclusión de ingredientes en la RTM		Total
	Sólo Aguascalientes (%)	Otros estados del ACM (%)	
Micro y pequeña	42.4 ^a	57.6 ^b	100
Mediana	27.3 ^{ab}	72.7 ^{ab}	100
Gran	18.2 ^b	81.8 ^a	100
Total	29.3	70.7	100

UPL = Unidad de producción lechera; RTM = Ración total mezclada; ACM = Altiplano Central Mexicano.

^{a,b}. Medias con diferente literal en la columna de origen, representan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Los insumos de origen de otros estados del ACM empleados en mayor proporción en las UPL para la preparación de la RTM, fueron los de Jalisco (51.5%) y Zacatecas (36.4%). Los ingredientes provenientes de Durango, Guanajuato, Michoacán y San Luis Potosí se incluyeron en menores proporciones, 12.1%, 5.1%, 4.0% y 2.0%, respectivamente (Figura 17).

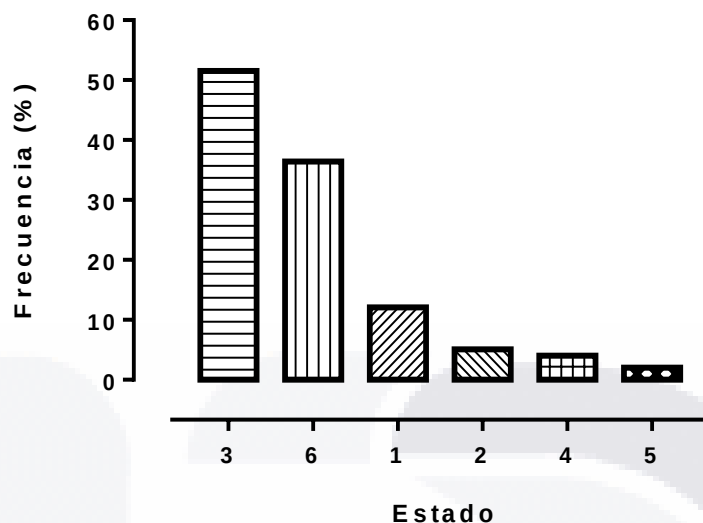


Figura 17. Utilización de ingredientes provenientes de los estados del ACM en la RTM empleada en las UPL para la alimentación de las vacas lecheras. Durango (1), Guanajuato (2) Jalisco (3), Michoacán (4), San Luis Potosí (5), Zacatecas (6).

Las UPL clasificadas como estrato de producción micro y pequeño, incluyeron en su ración insumos provenientes principalmente de los estados de Jalisco y Zacatecas, aunque en porcentajes bajos, 36.4% y 18.2%, respectivamente (Cuadro 9). Los establos de mediana escala incluyeron ingredientes de Jalisco y Zacatecas en proporciones mayores, 51.5% y 42.4%. Las UPL de la categoría grande, fueron las que obtuvieron el mayor porcentaje de inclusión de insumos de Jalisco (66.7%) y Zacatecas (48.5%). La proporción de UPL que incluyó ingredientes de los estados de Jalisco y Zacatecas entre los estratos de producción micro y pequeño y grande, mostró diferencias significativas ($P<0.05$); el porcentaje de establos que incluyeron ingredientes de los otros estados (Guanajuato, Durango, Michoacán y San Luis Potosí) no mostró diferencias significativas entre grupos ($P>0.05$).

Cuadro 9. Frecuencia (%) de inclusión en la RTM de ingredientes de los estados del ACM en las UPL por estrato de producción

Estrato de producción UPL	Estado						
	AGS (%)	DGO (%)	GTO (%)	JAL (%)	MICH (%)	SLP (%)	ZAC (%)
Micro y pequeña	100 ^a	12.1 ^a	9.1 ^b	36.4 ^b	3.0 ^a	0 ^a	18.2 ^b
Mediana	100 ^a	9.1 ^a	3.0 ^a	51.5 ^{ab}	6.1 ^a	3.0 ^a	42.4 ^a
Gran	100 ^a	15.2 ^a	3.0 ^a	66.7 ^a	3.0 ^a	3.0 ^a	48.5 ^a
Total	100	12.1	5.1	51.5	4.0	2.0	36.4

UPL = Unidad de producción lechera; AGS = Aguascalientes; DGO = Durango; GTO = Guanajuato; JAL = Jalisco; MICH = Michoacán; SLP = San Luis Potosí; ZAC = Zacatecas.

^{a,b}. Medias con diferente literal en la columna de cada estado, representan diferencias significativas ($P < 0.05$).

5.1.4. Producción y rendimiento de leche en las UPL

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la producción de leche del hato y el rendimiento de leche por vaca en relación al tamaño de las UPL. Sin embargo, la proporción de vacas en lactancia fue similar ($P > 0.05$) en las tres escalas. Existió una relación directa entre el tamaño del establo (Número de vacas) con la producción mensual del hato y la productividad por vaca; a mayor tamaño de la UPL, estos parámetros fueron mayores. (Cuadro 10).

Cuadro 10. Producción y rendimiento de leche por tamaño de UPL

Estrato de producción [†]	Tamaño (Número de vacas)	Producción mensual (ML/UPL)	Vacas en producción (%)	Productividad (L vaca ⁻¹ d ⁻¹)
Micro y pequeña	19.0 ^b ± 0.94	7.4 ^b ± 0.61	81.6 ^a ± 2.3	15.5 ^c ± 0.7
Mediana	86.1 ^b ± 4.9	45.3 ^b ± 3.2	84.9 ^a ± 1.1	20.0 ^b ± 0.7
Gran	458 ^a ± 57.7	302 ^a ± 43.9	83.2 ^a ± 0.96	25.1 ^a ± 0.5
Total	187	118	83.2	20.2

[†] Media +EE

ML/UPL = Miles de litros por unidad de producción lechera; L vaca⁻¹ d⁻¹ = litros por vaca por día.

^{a,b}. Medias con diferente literal en la misma columna, representan diferencias significativas ($P < 0.05$).

5.1.5. Activos productivos de las UPL

Se encontró, que el 35.4 % de las UPL del estudio no contaron con superficie agrícola, es decir, compran la totalidad de los insumos con los que alimentan al ganado, esta porción correspondió a la escala de producción micro y pequeña. El estrato mediano contó con una propiedad de superficie agrícola equivalente de riego de 4.9 ha, en esta categoría se ubicaron el 32.3% de las unidades. Los establos grandes (32.3%) contaron con un promedio de 47.4 ha de riego (Cuadro 11).

Cuadro 11. Cantidad de activos productivos con los que cuentan las UPL de acuerdo a su estrato de producción

Estrato de producción	Superficie agrícola		Tamaño del hato	
	Rango	(Ha equivalentes)	Rango	(Bovinos equivalentes)
Micro y pequeña	0	0	≤ 38.0	20.8 ^b $\pm$ 1.1
Mediana	$> 0 \leq 10$	4.9 ^b $\pm$ 0.37	$> 38.0 \leq 199$	95.8 ^b $\pm$ 5.4
Gran	> 10	47.4 ^a $\pm$ 7.7	> 199	555 ^a $\pm$ 74.0
Total		16.9		224

^{a,b}. Medias con diferente literal en la columna de cada activo productivo, representan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre el tamaño del hato (bovinos equivalentes) entre los estratos productivos de las UPL. Los establos de gran escala contaron con un promedio de 555 bovinos equivalentes, los medianos con 95.8 bovinos equivalentes y los pequeños con 20.8 bovinos equivalentes.

5.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS CON MORFOLOGÍA *Aspergillus flavus*

5.2.1. Frecuencia de géneros fúngicos y colonias con morfología *Aspergillus flavus*

Se registró crecimiento de una o varias colonias fúngicas en 88 (88.9%) de las muestras de RTM procesadas mediante la técnica de vaciado en placa por diluciones seriadas en medios de cultivo rosa de bengala agar (RBA) y Czapeck. Se identificaron en total 2496 colonias fúngicas, de los cuales el 55.5% correspondió a hongos compatibles con la morfología del género *Aspergillus* (Figura 18). También se encontraron hongos congruentes con los géneros *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Emericella* y *Candida*, aunque en menor proporción (21.0, 14.1, 3.6, 2.9, 1.6, 0.9, 0.3%, respectivamente). De las 1385 colonias *Aspergillus spp.* identificadas, el 3.5% correspondió a la morfología *Aspergillus flavus*.

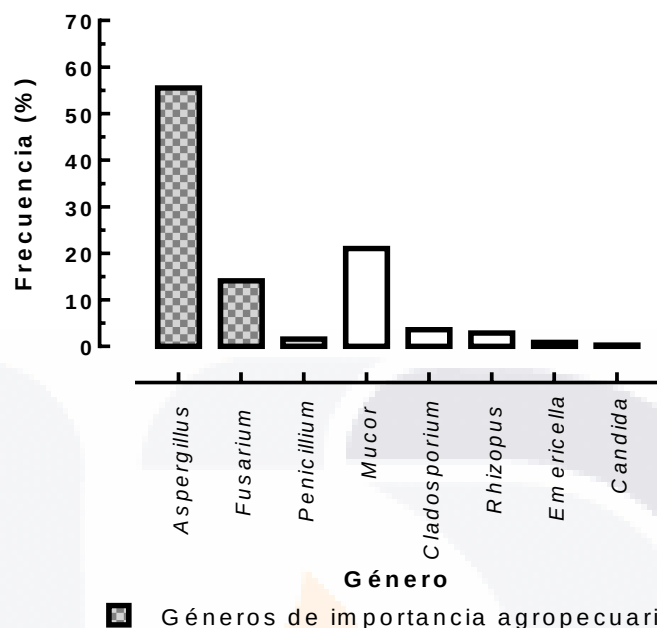


Figura 18. Géneros de colonias fúngicas identificadas por sus características morfológicas obtenidas de muestras de RTM

5.2.2. Cuantificación de colonias fúngicas totales y de colonias con morfología *Aspergillus flavus*

En el conteo de unidades formadoras de colonias fúngicas totales (UFC/g de muestra), se encontró que, el 11.1% de las muestras de RTM no presentó crecimiento fúngico, el 40.4% correspondió a un recuento bajo, el 38.4% a un recuento moderado y el 10.1% de las muestras a un recuento alto (Figura 19).

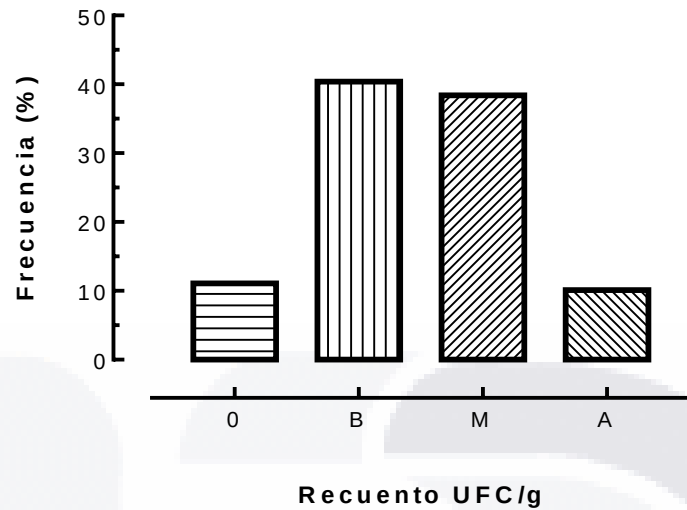


Figura 19. Recuento de unidades formadoras de colonias fúngicas totales (UFC/g de muestra) en las muestras de RTM. Sin crecimiento (0), recuento bajo (B), recuento moderado (M), recuento alto (A).

Se encontró presencia de colonias compatibles con morfología de *Aspergillus flavus* en el 21.2% de las muestras de RTM. De las colonias caracterizadas como atoxigénicas el 35.7% presento un recuento bajo y el 64.3% un recuento moderado. De las colonias identificadas como aflatoxigénicas, el 28.6% correspondió a un recuento bajo y el 71.4% a un recuento moderado (Figura 20).

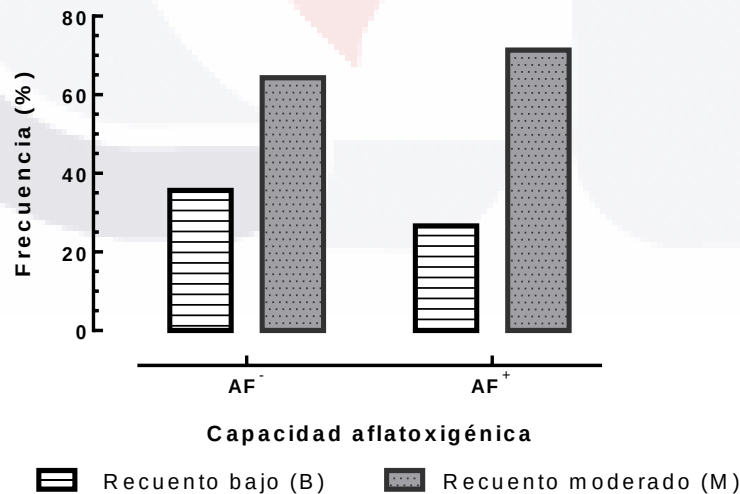


Figura 20. Cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC/g de muestra) compatibles con morfología *Aspergillus flavus* de acuerdo a su capacidad aflatoxigénica.

5.3. AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DIANA DE ADN GENÓMICO DE AISLADOS CON MORFOLOGÍA *Aspergillus flavus*

5.3.1. Región ITS y gen *CaM*

De los 21 aislados identificados morfológicamente como *Aspergillus flavus* el 90.5% amplificó para la región ITS en un rango de 600 a 800 pb (Figura 21). El 95.2% de los aislados amplificó para el gen *CaM* con un peso de entre 400 a 600 pb (Figura 22).

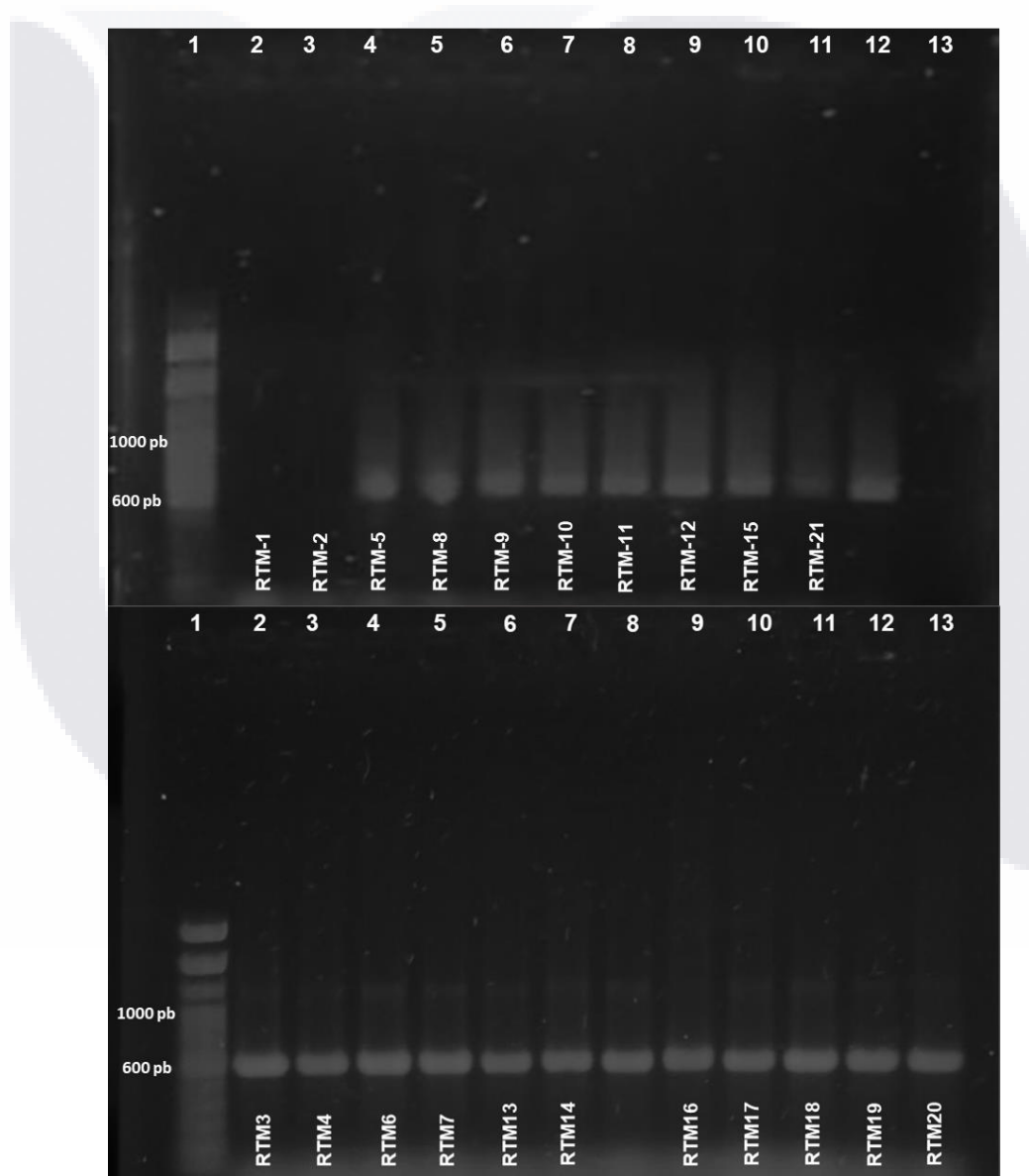


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados de la región ITS

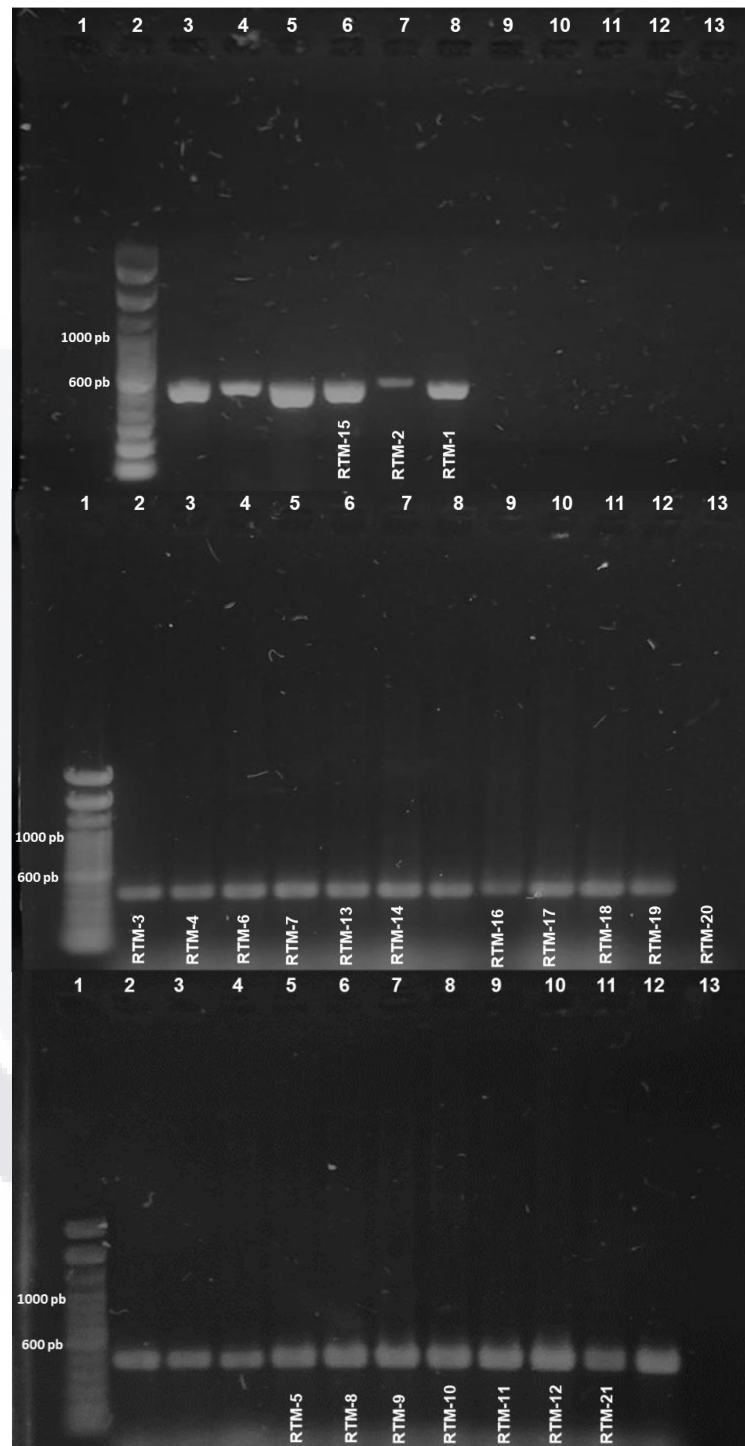


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados del gen calmodulina (*CaM*)

5.4. CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA DE AISLADOS CON MORFOLOGÍA *Aspergillus flavus*

De las 99 muestras de RTM, se obtuvieron veintiún aislados compatibles con la morfología de *Aspergillus flavus*, los cuales se sembraron en medio de cultivo agar-coco; pasado un periodo de incubación en oscuridad a 30°C de tres días se determinó su capacidad aflatoxigénica mediante la técnica vapores de hidróxido de amonio. El cambio de color del reverso de la colonia a tonalidad rosa fue el indicador de la capacidad aflatoxigénica de las colonias; siete de los aislados (33.3%) resultaron positivos a producción de AF (Figura 23).

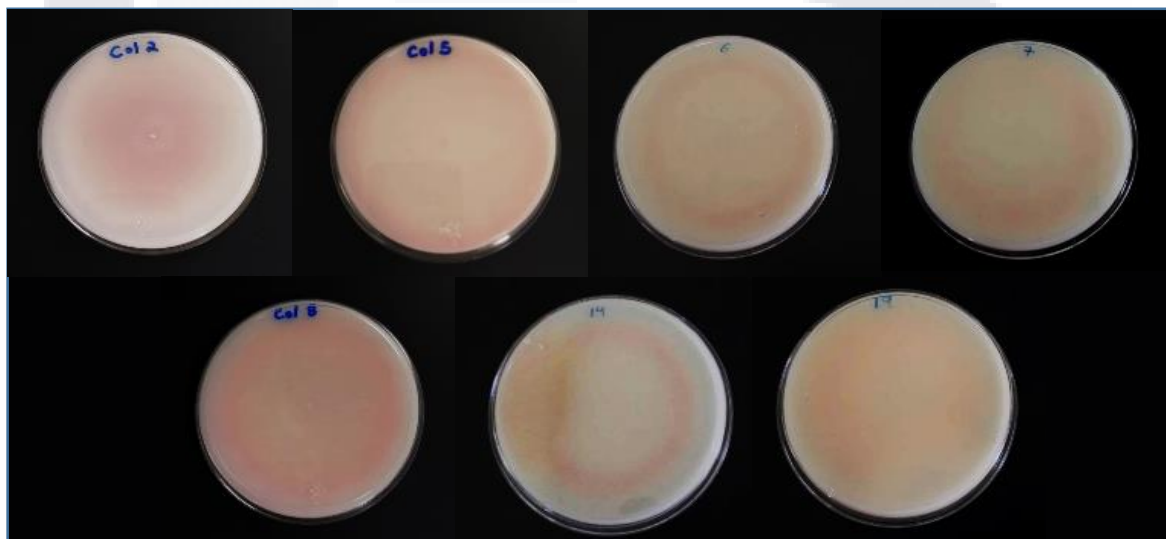


Figura 23. Viraje de color del reverso de cepas de *A. flavus* en agar-coco al contacto con vapores de hidróxido de amonio

5.5. CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN AISLADOS CON MORFOLOGÍA *Aspergillus flavus*

De las 99 muestras de RTM, se obtuvieron 21 aislados compatibles con la morfología *Aspergillus flavus* (Cuadro 12), el 33.3% resultó positivo a producción de AF. La concentración media de AF para los aislados aflatoxigénicos fue de 2,409 µg/kg, mientras que la de los aislados atoxigénicos fue de 17.43 µg/kg.

Cuadro 12. Proporción de aislados compatibles con la morfología *Aspergillus flavus* de acuerdo a su capacidad aflatoxigénica y producción de AF ($\mu\text{g/kg}$) cuantificada mediante prueba de ELISA

Capacidad Aflatoxigénica	Casos (%)	AF ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	Límite de confianza	
			Inferior	Superior
Aflatoxigénico	33.3	2409 ^a $\pm$ 755	1686	3132
Atoxigénico	66.7	17.43 ^b $\pm$ 0.76	16.5	18.3
Total	100	319.54		

^{a,b}. Medias con diferente literal en la columna de AF, representan diferencias significativas ($P < 0.05$).

* Intervalos de confianza al 95%, basados en el procedimiento de comparación múltiple de Tukey ($P > 0.05$)

5.6. CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN RTM

Se determinó la concentración de AF totales ($\mu\text{g/kg}$) en las 99 muestras de RTM. La concentración media de AF fue de $26.0 \pm 5.0 \mu\text{g/kg}$. El 90.4% de las muestras sobrepasó el límite máximo permisible (LMP) de AF para piensos destinados a la alimentación de vacas lecheras recomendado por las legislaciones internacionales en Latinoamérica y USA ($20 \mu\text{g/kg}$; FAO, 2004; Walte *et al.*, 2016). Mientras que el 100% de las muestras sobrepasó el LMP vigente para contenido de AF en raciones de la Unión Europea ($5 \mu\text{g/kg}$; FAO, 2004). El promedio de AF de las muestras con concentración menor al LMP, fue de $17.7 \pm 1.7 \mu\text{g/kg}$ y el de las muestras que excedieron el LMP fue de $26.9 \pm 4.5 \mu\text{g/kg}$ (Figura 24).

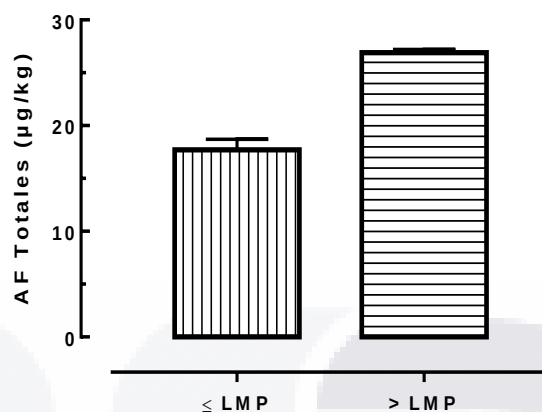


Figura 24. Concentración media de AF (µg/kg) en muestras de RTM por debajo del límite máximo permisible (≤ LMP) de AF y en muestras de RTM que excedieron el límite (>LMP) máximo permisible de AF.

5.7. ASOCIACIÓN DE LA PRESENCIA DE COLONIAS CON MORFOLOGÍA *Aspergillus flavus* CON LA CONTAMINACIÓN POR AF EN LA RTM

La contaminación por AF de la RTM fue independiente de la presencia de hongos compatibles con morfología *Aspergillus flavus* identificados como aflatoxigénicos; puesto que $P > 0.05$ en una prueba de comparación simple de la concentración de AF y la presencia de hongos compatibles con *Aspergillus flavus*, lo cual indicó que no hubo una asociación significativa (Cuadro 13).

Cuadro 13. Asociación de la presencia de hongos compatibles con morfología *Aspergillus flavus* aflatoxigénicos con la contaminación por aflatoxinas en la RTM

Presencia de <i>A. flavus</i> AF ⁺	Casos (%)	AF (µg/kg ± EE)	Límite de confianza		> LMP (%)
			Inferior	Superior	
Ausente	92.9	26.0 ^a ± 0.5	25.5	26.5	90.8
Presente	7.1	26.2 ^a ± 2.1	24.3	28.1	96.7
Total	100	26.0			90.4

^{a,b}. Medias con diferente literal en la columna de AF, representan diferencias significativas ($P < 0.05$).

* Intervalos de confianza al 95%, basados en el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni $P > 0.05$.

Se encontró, que las muestras de RTM de establos grandes en las que hubo presencia de colonias *Aspergillus flavus* con capacidad aflatoxigénica positiva, presentaron mayor concentración de AF ($P<0.05$) que las muestras de RTM de los establos de las categorías micro y pequeña y mediana (Cuadro 14).

Cuadro 14. Asociación de la presencia colonias con morfología *Aspergillus flavus* aflatoxigénicas con la contaminación por aflatoxinas en la RTM de acuerdo al estrato de producción de las UPL

Estrato de Producción UPL	Presencia A. flavus AF+ (%)	AF ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	Límite de confianza*	
			Inferior	Superior
Micro y pequeña	3	20.7 ^b $\pm$ 1.1	20.5	20.9
Mediana	9.1	22.9 ^b $\pm$ 1.9	21.0	24.8
Gran	9.1	31.3 ^a $\pm$ 0.2	30.2	32.4
Total	7.1	26.0		

^{a,b}, Medias con diferente literal en la columna de AF, representan diferencias significativas ($P<0.05$).

* Intervalos de confianza al 95%, basados en el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni $P>0.05$

5.8. ASOCIACIÓN DE FACTORES CON LA CONTAMINACIÓN POR AF DE LA RTM

5.8.1. Asociación de factores geográficos con la contaminación por AF de la RTM

5.8.1.1. Municipio de localización de la UPL. Se encontró, asociación ($P<0.5$) de la concentración de AF ($\mu\text{g/kg}$) en la RTM con el municipio de localización de la UPL. Los municipios con mayor concentración de AF en la RTM fueron Aguascalientes, Pabellón de Arteaga y San José de Gracia (Cuadro 15). Existió dependencia ($P<0.05$) entre el número de muestras que sobrepasaron el LMP de AF con la localización por municipio de los establos de este estudio. Hubo un mayor número de muestras que sobrepasaron el límite para piensos destinados a la alimentación de vacas lecheras establecido por las legislaciones ($20 \mu\text{g/kg}$), cuando las UPL se localizaron en el municipio de Aguascalientes.

Cuadro 15. Concentración media de AF ($\mu\text{g/kg}$) en muestras de RTM y frecuencia (%) de muestras que excedieron el LMP de AF, en relación a la localización por municipio de las UPL

Localización UPL (Municipio)	Casos (%)	AF ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	Límite de confianza*		> LMP (%)
			Inferior	Superior	
Aguascalientes	56.6	26.8 ^a ± 0.5	26.1	27.4	96.3**
Jesús María	3.0	24.0 ^{ab} ± 2.0	21.2	26.8	83.3
Pabellón de Arteaga	18.2	25.8 ^a ± 0.8	24.7	27.0	85.3
Rincón de Romos	19.2	24.6 ^{ab} ± 0.8	23.5	25.7	81.6
San José de Gracia	2.0	28.8 ^a ± 2.5	25.4	32.2	100**
Tepezalá	1.0	14.9 ^b ± 3.5	10.0	19.8	0.0
Total	100	26.0 ± 0.4			90.4

UPL = Unidad de producción lechera; AF = Aflatoxinas; LMP = Límite máximo permisible recomendado por las legislaciones internacionales para piensos destinados a la alimentación de vacas lecheras (20 $\mu\text{g/kg}$).

^{a,b}. Medias con diferente literal en la columna de AF, representan diferencias significativas ($P < 0.05$).

* Intervalos de confianza al 95%, basados en el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni $P > 0.05$.

** Significativo en prueba de χ^2 ($P < 0.05$)

No existieron diferencias ($P > 0.05$) en la concentración media de AF en las muestras de RTM de las UPL localizadas en los municipios de Aguascalientes, Pabellón de Arteaga y Rincón de Romos de las tres categorías de estrato de producción. Sin embargo, si se presentaron diferencias ($P < 0.05$) entre las escalas micro y pequeña y mediana del municipio de Jesús María, la contaminación por AF fue mayor en el alimento de los establos micro y pequeños. En el caso de San José de Gracia sólo se localizaron UPL de tamaño micro y pequeño, y en el municipio de Tepezalá solamente establos grandes (Cuadro 16).

Cuadro 16. Concentración media de AF ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$) en muestras de RTM, en relación al municipio de localización y estrato productivo de las UPL

Estrato de producción	Municipio					
	AGS ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	JM ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	PA ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	RR ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	SJG ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	TEP ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)
Micro y pequeña	27.7 ^a ± 0.87	27.1 ^a ± 3.2	23.6 ^a ± 1.4	25.5 ^a ± 1.7	28.8 ^a ± 3.2	-----
Mediana	25.9 ^a ± 0.88	17.8 ^b ± 3.1	27.1 ^a ± 1.1	23.8 ^a ± 1.0	-----	-----
Gran	26.7 ^a ± 0.75	-----	26.2 ^a ± 0.93	25.9 ^a ± 1.0	-----	14.9 ^a ± 0.28
Total	26.8	22.5	25.6	25.1	28.8	14.9

AGS = Aguascalientes; JM = Jesús María; PA = Pabellón de Arteaga; RR = Rincón de Romos; SJG = San José de Gracia; TEP = Tepezalá.

^{a,b}. Medias con diferente literal en la columna de AF para cada municipio, representan diferencias significativas ($P < 0.05$).

5.8.1.2. Origen de los insumos por estado. Respecto al origen de los ingredientes, se encontró que no existieron diferencias significativas ($P>0.05$) en la concentración de AF ($\mu\text{g/kg}$) en las muestras de RTM que incluyeron insumos provenientes de los estados de Durango, Guanajuato, Jalisco y Zacatecas, excepto en las muestras de RTM que incluyeron insumos provenientes de San Luis Potosí donde si hubo diferencia significativa (Cuadro 17). En cuanto a la frecuencia de muestras de RTM que sobrepasaron el LMP de AF de acuerdo con la inclusión de insumos provenientes de otros estados, se encontró, que hubo una asociación dependiente del porcentaje de muestras que sobrepasaron el LMP de AF con la inclusión de insumos provenientes de los estados de Jalisco, Guanajuato, Michoacán y San Luis Potosí ($P>0.05$).

Cuadro 17. Concentración media de AF ($\mu\text{g/kg}$) y frecuencia (%) de muestras que excedieron el LMP de AF, en relación a la inclusión en muestras de RTM de insumos provenientes de diferentes estados

Inclusión de insumos por estado	Casos (%)	AF ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	Límite de confianza*		> LMP (%)
			Inferior	Superior	
Aguascalientes	100	$26.0^b \pm 0.4$	25.3	26.7	90.4
Durango	12.1	$27.0^b \pm 1.0$	25.5	28.4	87.5
Guanajuato	5.1	$25.6^b \pm 1.6$	23.3	27.8	100**
Jalisco	51.5	$26.3^b \pm 0.5$	25.6	27.0	95.1**
Michoacán	4.0	$26.6^b \pm 1.8$	24.1	29.2	100**
San Luis Potosí	2.0	$32.1^a \pm 2.5$	28.6	35.6	100**
Zacatecas	36.4	$25.9^b \pm 0.6$	25.1	26.7	93.1
Total	100	26.0 ± 0.4			90.4

^{a,b}. Medias con diferente literal en la columna de AF para cada estado, representan diferencias significativas.

* Intervalos de confianza al 95%, basados en el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni $P>0.05$.

** Significativo en prueba de χ^2 ($P<0.05$).

En cuanto al uso de ingredientes por su origen en los distintos estratos productivos, se encontró, que cuando en la RTM se incluyeron insumos provenientes de los estados de Aguascalientes, Durango, Guanajuato, Jalisco y Zacatecas, no se presentaron diferencias significativas ($P>0.05$) en la concentración media de AF entre los estratos de producción. Sin embargo, si existieron diferencias ($P<0.05$) cuando se incluyeron insumos de San Luis Potosí o Michoacán (Cuadro 18).

Cuadro 18. Concentración media de AF ($\mu\text{g/kg}$) en muestras de RTM en relación a la inclusión de insumos por estado y su estrato de producción.

Estrato de producción	Estado						
	AGS ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	DGO ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	GTO ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	JAL ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	MICH ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	SLP ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	ZAC ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)
Micro y pequeña	26.8 ^a $\pm$ 0.66	27.8 ^a $\pm$ 2.0	26.4 ^a $\pm$ 0.61	27.3 ^a $\pm$ 0.70	32.2 ^a $\pm$ 0.87	-----	23.6 ^a $\pm$ 1.0
Mediana	25.1 ^a $\pm$ 0.64	25.2 ^a $\pm$ 3.2	23.8 ^a $\pm$ 1.6	26.2 ^a $\pm$ 0.91	23.0 ^b $\pm$ 0.91	38.7 ^a $\pm$ 3.1	26.0 ^a $\pm$ 0.91
Gran	26.2 ^a $\pm$ 0.57	27.4 ^a $\pm$ 2.0	24.9 ^a $\pm$ 0.68	25.8 ^a $\pm$ 1.1	28.3 ^{ab} $\pm$ 3.1	25.5 ^b $\pm$ 2.6	26.7 ^a $\pm$ 0.74
Total	26.0	26.8	25.0	26.4	27.8	32.1	25.4

AGS = Aguascalientes; DGO = Durango; GTO = Guanajuato; JAL = Jalisco; MICH = Michoacán; SLP = San Luis Potosí; ZAC = Zacatecas.

^{a,b}. Medias con diferente literal en la columna de AF para cada estado, representan diferencias significativas ($P < 0.05$).

5.8.2. Asociación de factores zootécnicos con la contaminación por AF de la RTM

5.8.2.1. Composición de la RTM. Sobre la composición de la RTM, se encontró que, cuando las UPL del estudio, incluyeron pajas y alimentos toscos, el 89.3% de las muestras sobrepasó el LMP de AF; en el caso de forrajes frescos el 92.0%, ensilados el 90.3%, granos y semillas el 92.7%, concentrados y/o núcleos proteínicos el 89.1% y subproductos el 90.5% (Cuadro 19). Cuando se incluyeron concentrados y/o núcleos proteínicos en la RTM, existió una mayor concentración de AF ($P < 0.05$), en comparación a cuando no se incluyeron.

Cuadro 19. Concentración media de AF ($\mu\text{g/kg}$) en muestras de RTM y frecuencia (%) de muestras que excedieron el LMP de AF, en relación a la inclusión de ingredientes.

Ingrediente	Casos (%)	Se incluye en la RTM	No se incluye en la RTM	> LMP (%)
		AF ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	AF ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	
PyAT	89.9	25.9 ^a $\pm$ 0.4	27.2 ^a $\pm$ 0.7	89.3
FF	81.8	26.3 ^a $\pm$ 0.4	24.8 ^a $\pm$ 0.9	92.0
ENS	88.9	25.9 ^a $\pm$ 0.4	26.9 ^a $\pm$ 1.2	90.3
GyS	41.4	26.3 ^a $\pm$ 0.6	25.8 ^a $\pm$ 0.5	92.7
CyNP	78.8	26.5 ^a $\pm$ 0.4	24.4 ^b $\pm$ 0.6	89.1
SUBP	21.2	25.2 ^a $\pm$ 0.8	26.3 ^a $\pm$ 0.4	90.5
Total	100	26.0 $\pm$ 0.4		90.4

^{a,b}. Medias con diferente literal en la columna de AF, representan diferencias significativas ($P < 0.05$).

* Intervalos de confianza al 95%, basados en el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni ($P > 0.05$).

En el análisis de inclusión de los tipos de ingredientes por el estrato productivo de las UPL, no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) en la concentración media de AF de las muestras de RTM, cuando se incluyeron pajas y alimentos toscos, forrajes frescos, ensilados, granos y semillas y subproductos; sin embargo, si existieron diferencias ($P<0.05$) cuando se incluyeron concentrados y/o núcleos proteínicos (Cuadro 20).

Cuadro 20. Concentración media de AF ($\mu\text{g/kg}$) en muestras de RTM en relación a la inclusión de ingredientes y estrato de producción de las UPL

Estrato de producción	Ingredientes					
	PyAT ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	FF ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	ENS ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	GyS ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	CyNP ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	SUBP ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)
Micro y pequeña	26.9 a ± 0.75	26.7 a ± 0.69	26.2 a ± 0.72	27.2 a ± 1.2	27.6 a ± 0.78	25.5 ab ± 1.0
Mediana	24.9 b ± 0.69	26.2 a ± 0.71	25.4 a ± 0.70	25.5 a ± 1.1	25.4 bc ± 0.75	21.8 b ± 1.2
Gran	25.9 ab ± 0.60	26.1 a ± 0.64	26.1 a ± 0.56	26.5 a ± 0.84	26.5 ab ± 0.67	26.1 a ± 0.89
Total	25.9	26.3	25.9	27.9	26.5	24.46

^{a,b} Medias con diferente literal en la columna de AF para cada estado, representan diferencias significativas ($P<0.05$).

5.8.2.2 Escala de producción. No existieron diferencias ($P>0.05$) en la concentración de AF en RTM de los diferentes tamaños de las UPL. Las muestras de alimento de los establos pequeños obtuvieron una concentración media de AF de 26.8 $\mu\text{g/kg}$, los medianos de 26.5 $\mu\text{g/kg}$ y los grandes 26.2 $\mu\text{g/kg}$. Tampoco existieron diferencias significativas ($P>0.05$) en las muestras de RTM que sobrepasaron el LMP entre las escalas productivas (Cuadro 21).

Cuadro 21. Concentración media de AF ($\mu\text{g/kg}$) en muestras de RTM en relación al estrato de producción

Escala de producción	Tamaño (N° de vacas)	Casos (%)	AF ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	Límite de confianza* > LMP		> LMP (%)
				Inferior	Superior	
Micro y pequeña	≤ 34	33.4	26.8 ^a ± 0.66	26.1	27.5	92.4
Mediana	$> 34 \leq 178$	33.3	25.1 ^a ± 0.64	24.4	25.7	86.4
Gran	> 178	33.3	26.2 ^a ± 0.57	25.6	26.8	92.4
Total		100	26.0 ± 0.4			90.4

^{a,b} Medias con diferente literal en la columna de AF para cada estado, representan diferencias significativas ($P<0.05$).

* Intervalos de confianza al 95%, basados en el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni ($P>0.05$).

5.7.3. Asociación de factores socioeconómicos con la contaminación por AF de la RTM

5.7.3.1. Bovinos equivalentes. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la concentración media de AF de la RTM entre las escalas productivas en función del número de bovinos equivalentes con el que contaban. La escala que presentó mayor contaminación fue la micro y pequeña ($27.1 \mu\text{g/kg}$), seguida por la grande ($26.0 \mu\text{g/kg}$) y, por último, la mediana ($25.0 \mu\text{g/kg}$); Todas las escalas estuvieron por encima de LMP de AF que establece las legislaciones internacionales para piensos destinados a la alimentación de vacas lecheras (Cuadro 22). No se encontró dependencia de la cantidad de bovinos equivalentes que poseían las UPL con el número de muestras (%) que sobrepasaron el LMP de concentración de AF.

Cuadro 22. Concentración media de AF ($\mu\text{g/kg}$) en muestras de RTM y frecuencia (%) de muestras que excedieron el LMP de AF, en relación a la cantidad de bovinos equivalentes (N°) que poseen las UPL.

Escala de producción	Bovinos equivalentes (Rango)	Casos (%)	AF ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	Límite de confianza*		> LMP (%)
				Inferior	Superior	
Micro y pequeña	≤ 38.0	33.4	$27.1^a \pm 0.68$	26.4	27.8	92.4
Mediana	$> 38.0 \leq 199$	33.3	$25.0^b \pm 0.61$	24.4	25.6	86.4
Gran	> 199	33.3	$26.0^{ab} \pm 0.57$	25.4	26.5	92.4
Total		100	26.0 ± 0.4			90.4

^{a,b} Medias con diferente literal en la columna de AF para cada estado, representan diferencias significativas ($P < 0.05$).

* Intervalos de confianza al 95%, basados en el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni ($P > 0.05$)

5.7.3.2. Superficie agrícola equivalente de riego. No se encontró asociación de la cantidad de hectáreas equivalentes de riego con la contaminación de la RTM por AF (Cuadro 23). Tampoco se encontró dependencia ($P > 0.05$) de la frecuencia de muestras que sobrepasaron el LMP de AF, con la cantidad de hectáreas equivalentes de riego por escala de producción.

Cuadro 23. Concentración media de AF (µg/kg) en muestras de RTM y frecuencia (%) de muestras que excedieron el LMP de AF, en relación a la cantidad de hectáreas equivalentes de riego (Ha) de las UPL

Escala de producción	Superficie agrícola (Has equivalentes)	Casos (%)	AF (µg/kg ± EE)	Límite de confianza*		> LMP (%)
				Inferior	Superior	
Micro y pequeña	0	35.4	25.6 ^a ± 0.59	25.0	26.1	92.9
Mediana	> 0 ≤ 10	32.3	26.7 ^a ± 0.61	26.1	27.3	90.6
Gran	> 10	32.3	25.9 ^a ± 0.69	25.2	26.6	87.5
Total		100	26.0 ± 0.4			90.4

^{a,b} Medias con diferente literal en la columna de AF, representan diferencias significativas (P<0.05).
 * Intervalos de confianza al 95%, basados en el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni (P>0.05)



6. DISCUSIÓN

6.1. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA PRODUCTIVO LECHERO

6.1.1. Producción y rendimiento de leche en las UPL

En 2007, Carranza-Trinidad *et al.*, realizaron un estudio sobre la competitividad de la cadena productiva láctea; en relación al tamaño de UPL por número de vacas, encontraron, que en la escala micro y pequeña el promedio fue de 15.3 (vacas), en la mediana de 68.7 (vacas) y en la grande de 458 (vacas); los resultados para la escala grande correspondieron a los valores encontrados en este estudio, en las categorías micro y pequeña (19.1 vacas) y mediana (86.1 vacas) los valores del presente estudio fueron superiores.

En cuanto a la productividad por vaca ($L \text{ vaca}^{-1} d^{-1}$), el promedio encontrado por Carranza-Trinidad *et al.* (2007), para los establos de pequeña ($16.1 L \text{ vaca}^{-1} d^{-1}$) y gran escala ($26.2 L \text{ vaca}^{-1} d^{-1}$), fueron superiores a los obtenidos en este estudio, $15.5 L \text{ vaca}^{-1} d^{-1}$ y $25.1 L \text{ vaca}^{-1} d^{-1}$, respectivamente. Sin embargo, el promedio de la escala mediana en esa investigación ($19.3 L \text{ vaca}^{-1} d^{-1}$) fue inferior ($20.0 L \text{ vaca}^{-1} d^{-1}$).

El promedio de producción de leche por UPL (miles de litros mes^{-1}) para los estratos productivos micro y pequeño y mediano, fue mayor en este estudio que en el de Carranza-Trinidad *et al.* (2007): micro y pequeño escala (7.4 vs 6.9 miles de litros mes^{-1}/UPL), mediana (45.3 vs 33.3 miles de litros mes^{-1}/UPL). sin embargo, el promedio de la gran escala fue menor (302 vs 323 miles de litros mes^{-1}/UPL).

Lo anterior, indica que, del 2007 a la fecha, aumentó la producción de leche de las UPL, pero no la productividad de las vacas, el incremento en el volumen de leche se debió al aumento del inventario ganadero de los establos.

6.1.2. Activos productivos de las UPL

En 2009, Lozano-Santillán e Islas-Ojeda, realizaron un estudio sobre la estratificación de productores del estado de Aguascalientes, en el que obtuvieron el rango de la propiedad de superficie agrícola equivalente de riego para los estratos de producción de las UPL. para la escala pequeña, el rango fue de 0 a 3.5 ha equivalentes, en la escala mediana, de 3.6 a 10 ha equivalentes y en la gran escala, mayor a 10 ha equivalentes. Los valores de los rangos de la micro y pequeña y mediana escala, difirieron a los encontrados en el

presente estudio, en donde se obtuvo que las UPL pequeñas no contaron con superficie agrícola de riego, los establos medianos contaron con menos de 10 ha equivalentes de riego. El rango de la categoría de establos grandes fue el mismo, mayor a 10 ha equivalentes de riego.

Mariscal-Aguayo *et al.* (2017), realizaron un estudio de estratificación de UPL en el estado de Jalisco, encontraron, que la propiedad agrícola de riego para los estados fueron: micro y pequeña escala (menor o igual a los 10 ha equivalentes de riego), mediana escala (mayor a 10 a menor o igual que 100 ha equivalentes de riego) y gran escala (mayor a 100 ha equivalentes de riego); estos rangos fueron superiores a los encontrados en la presente investigación.

En el estudio de Lozano-Santillán e Islas-Ojeda (2009), también se obtuvo el rango de bovinos equivalentes de las UPL de cada estrato, se encontró que la propiedad de bovinos equivalentes de la escala micro y pequeña fue menor o igual a 30, la mediana mayor a 30 y menor o igual que 150, y la grande, mayor a 150. En el estudio de Mariscal-Aguayo *et al.* (2017), los rangos fueron: micro y pequeña escala, menor o igual a 25, mediana escala, mayor a 25 a menor o igual que 150, y gran escala, mayor que 150. En la presente investigación los rangos obtenidos fueron: escala micro y pequeña, menor o igual a 38, la mediana mayor a 38 y menor o igual que 199, y la grande, mayor a 199; dichos rangos fueron superiores a los encontrados en los otros estudios.

6.2. PRESENCIA DE COLONIAS CON MORFOLOGÍA *Aspergillus flavus* EN RTM

6.2.1. Frecuencia de géneros fúngicos y colonias con morfología *Aspergillus flavus*

En el estado de Jalisco, Santibáñez *et al.* (2011) realizaron un estudio para identificar y cuantificar hongos presentes en alimento para ganado bovino. Los géneros fúngicos encontrados fueron *Cladosporium* (26.67%), *Penicillium* (21.62%), *Aspergillus* (16.89%), *Fusarium* (9.45%), *Absidia* (6.08%), *Mucor* (4.72%), *Trichoderma* (3.37%), *Epicocum* (2.02%), *Paecilomices* (2.01%), *Alternaria* (1.9%) y *Phoma* (0.67%).

En 2019, Rangel-Muñoz *et al.* realizaron un estudio en unidades de producción lecheras del Altiplano Central Mexicano, encontraron que los géneros fúngicos de mayor frecuencia en aislados obtenidos de 96 muestras de RTM fueron *Aspergillus* (35.4%), *Cladosporium* (15.4%), *Penicillium* (13.8%), *Mucor* (13.8%), *Rhizopus* (12.3%), *Fusarium* (3.1%), *Alternaria* (3.1%), *Curvularia* (1.5%) y *Bipolaris* (1.5%); de los aislados *Aspergillus*

spp que obtuvo, el 6.8% correspondió a características morfométricas y moleculares de la especie *Aspergillus flavus*.

Los géneros de mayor frecuencia encontrados en este estudio corresponden a los obtenidos por Santibáñez y Rangel, aunque los porcentajes variaron. En el presente trabajo la frecuencia del género *Aspergillus* fue de 55.5%; de las colonias identificadas de este género, sólo el 3.5% correspondió a colonias compatibles con la morfología *A. flavus*.

6.2.2. Cuantificación de colonias fúngicas totales y de colonias con morfología *Aspergillus flavus*

En su estudio, Santibáñez *et al.* (2011), encontraron que el 100% de las muestras de alimento para ganado bovino, mostró contaminación por hongos, el 56.7% de las muestras presentaron contenido alto de UFC, el 36.66% contaminación moderada y el 6.66% contaminación baja. Los resultados de la presente investigación son inferiores a los obtenidos por Santibáñez, los niveles de contaminación fúngica, correspondieron a recuentos bajos (40.4%) y moderados (38.4%) de UFC.

En el estado de Sonora, Ortega-Beltrán, Jaime y Cotty (2015) analizaron la contaminación por colonias *Aspergillus* en muestras de suelo agrícola, mediante la técnica de vaciado en placa por diluciones seriadas; cuantificaron colonias (UFC g⁻¹ de suelo) *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Las cuantificaciones que obtuvieron, correspondieron a recuentos bajos y moderados, los resultados coinciden con los obtenidos en este estudio: hubo una mayor cantidad de recuentos bajos (28.6%) y moderados (71.4%) de UFC g⁻¹ de colonias aflatoxigénicas compatibles con la morfología *Aspergillus flavus*.

6.3. AMPLIFICACIÓN DE REGIÓN ITS Y GEN CaM DE AISLADOS *Aspergillus flavus*

En la amplificación de secuencias diana, un gran porcentaje de los aislados con morfología *Aspergillus flavus* amplificaron tanto para la región ITS (90.5%), como para el gen de calmodulina (92.5%). La Subcomisión Internacional de códigos de barras fúngicos, ha propuesto la región ITS como el código de barras predeterminado para la identificación de hongos *Aspergillus* spp (Balajee *et al.*, 2009). También, se ha referido que el gen CaM proporciona una mejor resolución para identificar casi todas las especies de *Aspergillus* (Samson *et al.*, 2014) .

6.4. CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA DE AISLADOS CON MORFOLOGÍA *Aspergillus flavus*

En 2020, Rangel-Muñoz *et al.*, determinaron en su estudio la capacidad aflatoxigénica de aislados *Aspergillus flavus* mediante la técnica vapores de hidróxido de amonio, cinco de seis aislados resultaron positivos a producción de AF. En su estudio de Ortega-Beltrán, Jaime y Cotty (2015), reportaron que el 95% de las 405 colonias *Aspergillus* spp. aisladas de muestras de suelo agrícola, resultó positivo a producción de AF mediante la técnica de cromatografía de capa fina (TLC). En otra investigación realizada en Argentina, se encontró una frecuencia de 82.5% de cepas *Aspergillus flavus* aflatoxigénicas en aislados obtenidos de muestras de cacahuete, la producción de aflatoxinas se determinó placas de cromatografía de sílica gel (Pildain, Cabral, y Vaamonde, 2005). En este estudio, 33.3% de los aislados resultaron positivos a producción de AF, lo que muestra que son frecuentes las cepas capaces de contaminar los productos agrícolas con aflatoxinas, e incluso que estos metabolitos persisten aun en ausencia de las cepas que los generaron.

6.5. CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN RTM

En (2006) Flores *et al.* cuantificaron la contaminación e incidencia de micotoxinas en 133 muestras de alimentos balanceados y granos de uso pecuario en México. Encontraron que el 57% de las muestras presentó alguna cantidad detectable de micotoxinas; registraron presencia de AF en el 62.5% de las muestras, una concentración media de AF de 12.47 µg/kg, en un rango de 2 µg/kg a 77 µg/kg. El 11.3% de las muestras sobrepasó el límite máximo permisible recomendado por las legislaciones internacionales para raciones destinadas a la alimentación de vacas lecheras (20 µg/kg).

En (2009) Reyes-Velázquez *et al.* cuantificaron AF en raciones destinadas al consumo de vacas lecheras en Jalisco, encontraron que el 92.5% presentó alguna cantidad detectable de AF, la concentración media de AF fue de 10.84 µg/kg, en un rango de 4.82 µg/kg a 24.89 µg/kg. El 9.3% de las muestras sobrepasó el nivel de AF recomendado por las legislaciones internacionales.

En el presente estudio, se encontró una frecuencia del 90.4% de muestras RTM que excedieron el LMP de AF, porcentaje mayor a los obtenidos por Flores *et al.* y Reyes-Velázquez *et al.* La concentración media de AF encontrada en el presente trabajo (26.0 µg/kg), fue superior a las medias encontradas en los otros estudios, el rango de

concentración de AF fue de 14.6 a 41.8 $\mu\text{g/kg}$, intermedio a los rangos encontrados en los estudios mencionados.

6.6. ASOCIACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR AF EN LA RTM CON LA PRESENCIA DE COLONIAS CON MORFOLOGÍA *Aspergillus flavus*

La contaminación por AF fue independiente ($P>0.05$) de la presencia de cepas aflatoxigénicas en la RTM. Aunque sólo se encontró presencia de cepas aflatoxigénicas en el 7.1% de las muestras, el 100% de ellas contuvo alguna concentración detectable de AF. Al respecto, Carvajal (2013) señala, que la presencia de hongos aflatoxigénicos en un alimento, no indica la presencia de AF o viceversa. Las micotoxinas se biosintetizan al final de la fase estacionaria del ciclo de vida de los hongos (Santini y Ritieni, 2013), por lo que pueden estar presentes las aflatoxinas, sin encontrarse el hongo productor. De igual forma, puede haber presencia de un hongo micotoxigénico en un sustrato sin haber micotoxinas, debido a factores como el viento o vectores que transportan las esporas y las instalan en los productos agrícolas.

6. 7. ASOCIACIÓN DE FACTORES CON LA CONTAMINACIÓN POR AF DE LA RTM

Existen pocos estudios que asocien la contaminación por AF de la RTM o de alimentos de uso pecuario a factores propios de las UPL. Los estudios más cercanos estudian la incidencia de AF en distintos tipos de alimentos. En 2006, Flores *et al.* analizaron muestras de alimentos balanceados y granos destinados a la alimentación animal, cuantificaron el contenido de AF ($\mu\text{g/kg}$) en muestras de alimento balanceado, gluten de maíz, maíz y sorgo; encontraron una mayor contaminación por AF en el gluten de maíz (31.42 $\mu\text{g/kg}$), el 60% de las muestras sobrepasó el LMP de AF recomendado para Latinoamérica; el alimento balanceado presentó una concentración media de AF de 15.32 $\mu\text{g/kg}$, el 18.7% de las muestras sobrepasó el LMP. La contaminación por AF del maíz y del sorgo fueron menores, 5.78 $\mu\text{g/kg}$ y 9.55 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente. En el caso del maíz, ninguna muestra sobrepasó el LMP y en sorgo solo el 3.1%.

En 2020, Rangel-Muñoz *et al.* analizaron (266) muestras de ensilaje, concentrado y ración total mezclada provenientes del ACM, encontraron, que el ensilaje de maíz presentó una contaminación por AF mayor a la de los otros tipos de alimentos. El 99% de las muestras analizadas presentó contaminación por AF, valor que corresponde al de este estudio, en el que el 100% de las muestras contuvo AF. En la presente investigación, se

encontró, que hubo una mayor concentración de AF cuando en la RTM se incluyeron alimentos concentrados y/o núcleos proteínicos.



7. CONCLUSIONES

Se encontró alguna cantidad detectable de AF en la totalidad de muestras de RTM, el 90.4%, sobrepasó el límite máximo permisible recomendado para Latino América por las legislaciones internacionales para raciones destinadas a la alimentación de vacas lecheras. Se encontró presencia de colonias de uno o varios géneros fúngicos en las muestras de RTM, el principal género identificado fue *Aspergillus*; de igual forma se encontraron cepas aflatoxigénicas de *Aspergillus flavus* en la RTM. se registró asociación de los factores de las UPL con la contaminación por AF de las muestras de AF, fue mayor la contaminación en concentrados y/o núcleos proteínicos y en ingredientes provenientes de San Luis Potosí, establos localizados en Aguascalientes, Pabellón de Arteaga y San José de Gracia. Los resultados obtenidos en este estudio confirmaron la existencia de contaminación por *Aspergillus flavus* aflatoxigénico y por aflatoxinas en la dieta destinada a la alimentación de vacas lecheras de la región del Altiplano Central Mexicano.

Estos resultados sugieren que es necesario diseñar estrategias más efectivas para el control de la presencia de *Aspergillus flavus* y aflatoxinas tanto en los productos agrícolas, así como en la persistencia de sus metabolitos en la leche destinada al consumo humano. Es indispensable en la producción pecuaria, supervisar la calidad y la inocuidad de los ingredientes que se emplean en la alimentación animal, a fin de mantener la salud animal y alcanzar la productividad potencial de las vacas lecheras, así como para obtener el mejor equilibrio económico y ofrecer productos nutritivos e inocuos al consumidor.

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.

Biótico: Hace referencia a aquello que resulta característico de los organismos vivos 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 estos. Conversión de un químico desde una forma a otra por un organismo biológico.

Carcinogénico: Habilidad de una sustancia para causar cáncer.

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

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

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

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

Cuerpo fructífero: 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.

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.

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

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

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

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

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

Hepatotóxico: Sustancia nociva para las células del hígado.

Hongo: Organismo eucariota que pertenece al reino fungi.

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

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

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

Métula: Célula de un conidióforo que lleva las fiálides.

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

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

Monooxigenasas, citocromo P₄₅₀: Enzimas que usan O₂ e incorporan un átomo de oxígeno dentro de un sustrato y reducen el otro átomo a agua; importante en la síntesis de hormonas esteroideas 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 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 este, 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.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, H. K., Wilkinson, J. R., Zablotowicz, R. M., Accinelli, C., Abel, C. A., Bruns, H. A., y Weaver, M. A. (2009). Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews*, 28(2–3), 142–153. <https://doi.org/10.1080/15569540903081590>
- Akar, T., Avci, M., y Dusunceli, F. (2004). Barley: Post-harvest Operations. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, pp. 1–64. Consultado en <http://www.fao.org/3/a-au997e.pdf>
- Balajee, S. A., Borman, A. M., Brandt, M. E., Cano, J., Cuenca-Estrella, M., Dannaoui, E., ... Wickes, B. L. (2009). Sequence-based identification of aspergillus, fusarium, and mucorales species in the clinical mycology laboratory: Where are we and where should we go from here? *Journal of Clinical Microbiology*, 47(4), 877–884. <https://doi.org/10.1128/JCM.01685-08>
- Barnett, H. L., y Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. New York: McMillan.
- Camacho Vera, J. H., Cervantes Escoto, F., Palacios Rangel, M. I., Cesín Vargas, A., Ocampo Ledesma, J., Camacho Vera, J. H., ... Ocampo Ledesma, J. (2017). Especialización de los sistemas productivos lecheros en México: la difusión del modelo tecnológico Holstein. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(3), 259. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i3.4191>
- Carranza-Trinidad, R., Macedo, R., Cámara, J., Sosa, J., Meraz, A., y Valdivia, A. (2007). Competitividad en la cadena productiva de leche del estado de Aguascalientes, México. *Agrociencia*, 41(6), 701–709. Consultado en http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952007000600701
- Carreño-Venegas, A., Hurtado-Guerra, J. J., y Navas-Navas, M. C. (2014). Exposición a aflatoxina: Un problema de salud pública. *Iatreia*, 27(1), 42–52.
- Carvajal, M. (2013). Transformación de la aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1-ADN. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 109–120. [https://doi.org/10.1016/s1405-888x\(13\)72082-5](https://doi.org/10.1016/s1405-888x(13)72082-5)
- Chi, F., y Broomhead, J. (2009). Micotoxinas y Aves. Una Revisión para productores de Aves. *Amlan International*, p. 15. Chicago, Illinois.

- Cotty, P. J., y Mellon, J. E. (2006). Ecology of aflatoxin producing fungi and biocontrol of aflatoxin contamination Adaptations of aflatoxin-producing fungi Aflatoxins in the Sonoran desert. *Mycotoxin Research*, 22(2), 110–117. <https://doi.org/10.1007/BF02386244>
- Davari, E., Mohsenzadeh, M., Mohammadi, G., y Rezaeian-Doloei, R. (2015). Characterization of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* strain isolates from animal feedstuffs in northeastern Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 16(2), 150–155. Consultado en <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=108667732&lang=es&site=ehost-live&scope=site>
- del Palacio, A., Bettucci, L., y Pan, D. (2016). Fusarium and Aspergillus mycotoxins contaminating wheat silage for dairy cattle feeding in Uruguay. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(4), 1000–1005. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.004>
- Diener, U. L., Cole, R. J., Sanders, T., Payne, G., Lee, L. S., y Klich, M. A. (1987). Epidemiology of Aflatoxin Formation by *Aspergillus Flavus**. *Annual Review of Phytopathology*, 25(1), 249–270. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.25.090187.001341>
- Dijksterhuis, J. (2019). Fungal spores: Highly variable and stress-resistant vehicles for distribution and spoilage. *Food Microbiology*, 81, 2–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.11.006>
- Dixon, J. B., Kannewischer, I., Tenorio Arvide, M. G., y Barrientos Velazquez, A. L. (2008). Aflatoxin sequestration in animal feeds by quality-labeled smectite clays: An introductory plan. *Applied Clay Science*, 40(1), 201–208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clay.2007.10.010>
- Dobson, A. D. W. (2011). Yeasts and Molds. *Aspergillus flavus*. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 785–791. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374407-4.00367-8>
- Domínguez-Domínguez, O., y Pérez-Ponce de León, G. (2009). ¿La mesa central de México es una provincia biogeográfica? Análisis descriptivo basado en componentes bióticos dulceacuícolas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 80(3), 835–852. Consultado en http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532009000300025&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- Eaton, D. L., & Groopman, J. D. (1994). Preface. In D. L. Eaton y J. D. Groopman (Eds.), *The toxicology of aflatoxins, human health, Veterinary and agriculture significance* (pp.

- xxi–xxiii). San Diego: Academic press.
- EBSCOhost. (2019). *Aspergillus flavus*, aflatoxins and dairy cows in México. Consultado en <http://web.b.ebscohost.com.dibpxy.uaa.mx/ehost>
- FAO. (2019). Producción lechera. Consultado 1 de mayo de 2019, en Portal lacteo website: <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/es/>
- FAO Food and Agriculture Organization. (2003). Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de control. *Estudio FAO Alimentación Nutrición* 73, p. 136. Roma, Italia.
- FAO Food and Agriculture Organization. (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003: Summary of study. *Food and Nutrition Paper*, Vol. 81, p. 165. Roma, Italia.
- FAO Food and Agriculture Organization. (2018). Ganadería primaria. Consultado 28 de enero de 2019, en <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL>
- Fernández, E. F., Martínez, J. A., Martínez, V., Moreno, J. M., Collado, L. R., Hernández, M., y Morán, F. J. (2015). Documento de Consenso: Importancia nutricional y metabólica de la leche. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1), 92–101. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.8253>
- Flores Ortiz, C. M., Hernández Portilla, L. B., y Vázquez Medrano, J. (2006). Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Téc Pecu Méx*, 44(2), 247–256.
- Frisvad, J. C., Hubka, V., Ezekiel, C. N., Hong, S.-B., Nováková, A., Chen, A. J., ... Houbraken, J. (2019). Taxonomy of *Aspergillus* section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology*, 93, 1–63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.001>
- García, S., y Heredia, N. (2006). Mycotoxins in Mexico : Epidemiology , management , and control strategies. *Mycopathologia*, 162(3), 255–264. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0058-1>
- Geiser, D. M., Klich, M. A., Frisvad, J. C., Peterson, S. W., Varga, J., y Samson, R. A. (2007). *The current status of species recognition and identification in Aspergillus*. 1–10. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.01>
- Google. (2019). Aflatoxin and dairy cows. Consultado en <https://scholar.google.com.mx/scholar?hl=>
- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., y Baptista Lucio, P. (2014). Selección de

- la muestra. In *Metodología de la Investigación* (pp. 170–191).
- Hoog, G. S. de. (2000). *Atlas of clinical fungi* (2nd ed.). CBS, Utrecht.
- IARC International Agency for Research on Cancer. (2002). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks To Humans. *Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans II*, Vol. 96, p. 590. Lyon, Francia.
- INEGI. (2008). *Características edafológicas, fisiográficas, climáticas e hidrográficas de México*. 31 p. Consultado en http://www.inegi.org.mx/inegi/spc/doc/INTERNET/1-GEOGRAFIADÉMEXICO/MANUAL_CARAC_EDA_FIS_VS_ENERO_29_2008.pdf
- INEGI. (2019). “*Estadísticas a Propósito Del ... Día Mundial De La Población (11 De Julio)* .” Consultado en https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2019/Poblacion2019_Nal.pdf
- Institute of Medicine National Academies. (2019). *Dietary References Intakes (DRIs) – Food and Nutrition Board*. Consultado en <http://sialaleche.org/recomendaciones-de-consumo-de-porciones-de-lacteos-diarias/>
- Iqbal, S., Jinap, S., Abbasi Pirouz, A., y Abdull Razis, A. F. (2015). Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.08.005>
- Ishi, K., Maruyama, J., Juvvadi, P., Nakajima, H., y Kitamoto, K. (2005). Visualizing Nuclear Migration during Conidiophore Development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus oryzae*: Multinucleation of Conidia Occurs through Direct Migration of Plural Nuclei from Phialides and Confers Greater Viability and Early Germination i. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(4), 747–754. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.747>
- Klich, M. A. (2002). *Identification of common Aspergillus species* (1st ed.). Lousiana: Centraalbureau voor Schimmelcultures. Utrecht. NETHERLANDS.
- Kroeger, J., y Geitmann, A. (2012). Pollen tube growth: Getting a grip on cell biology through modeling. *Mechanics Research Communications*, 42, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.mechrescom.2011.11.005>
- Loera, J., y Banda, J. (2017). Industria lechera en México: parámetros de la producción de leche y abasto del mercado interno. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 19(1), 419–426. <https://doi.org/10.18271/ria.2017.317>
- López-Jácome, E., Hernández, M., Colin, C., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., y Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología.

- Investigación En Discapacidad.*, 3, 10–18.
- Lozano-Santillán, J., y Islas-Ojeda, E. (2009). Metodología para el Proceso de Estratificación de Productores en el Estado de Aguascalientes. *Gobierno Del Estado de Aguascalientes CODAGEA, Universidad Autonoma de Aguascalientes, SAGARPA*.
- Lyn, M. E., Abbas, H. K., Zablotowicz, R. M., y Johnson, B. J. (2009). Delivery systems for biological control agents to manage aflatoxin contamination of pre-harvest maize. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 26(3), 381–387. <https://doi.org/10.1080/02652030802441521>
- Mariscal-Aguayo, V., Pacheco-Cervantes, A., Estrella-Quintero, H., Huerta-Bravo, M., Rangel-Santos, R., y Núñez-Domínguez, R. (2017). Estratificación de productores lecheros en los altos de Jalisco. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 14, 547–563.
- McDonald, P., Ewdwas, R. A., & Greenhalgh, J. (2013). *Nutrición animal* (7th ed.). Acribia.
- Meyers, D. M., y Obrian, G. (1998). Characterization of aflJ, a Gene Required for Conversion of Pathway Intermediates to Aflatoxin... *Applied & Environmental Microbiology*, 64(10), 3713. Consultado en <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=1177669&lang=es&site=ehost-live&scope=site>
- NRC. (2001). *7th Revised Edition, Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture and Natural Resources, National Research Council, National Academy Press*.
- OMS, y FAO. (2012). *Prevención y reducción de la contaminación de los alimentos y piensos* (1st ed.). Roma, Italia.
- OMS Organización Mundial de la Salud. (2018). Las 10 principales causas de defunción. Consultado 20 de septiembre de 2019, en <https://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/index2.html> %0A
- Ortega-Beltran, A., Jaime, R., y Cotty, P. J. (2015). Aflatoxin-producing fungi in maize field soils from sea level to over 2000masl: A three year study in Sonora, Mexico. *Fungal Biology*, 119(4), 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.006>
- Paterson, R., y Lima, N. (2011). Further mycotoxin effects from climate change. In *Food Research International* (Vol. 44). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.038>
- Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J., ... Samson, R. (2007). Biodiversity of Aspergillus species in some important agricultural products. *Studies in Mycology*, 59, 53–66. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.07>

- Pildain, M. B. (2006). *Caracterización fenotípica y molecular de Aspergillus sección Flavi. Estudio de la genética poblacional y capacidad toxigénica de Aspergillus flavus en maní*. "Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. <http://digital.bl.fcen.uba.ar>."
- Pildain, M. B., Cabral, D., y Vaamonde, G. (2005). Poblaciones de *Aspergillus flavus* en maní cultivado en diferentes zonas agroecológicas de la Argentina, caracterización morfológica y aflatoxigénica. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 34(3), 3–19.
- Pitt, J. I., y Hocking, A. A. D. (2009). The ecology of fungal food spoilage. In *Fungi and food spoilage* (pp. 3–9). <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Pittet, A. (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds - An updated review. *Revue de Medecine Veterinaire*, 149, 479–492.
- Rangel-Muñoz, E. J. (2019). *Caracterización morfológica y molecular de aislados nativos de aspergillus flavus eficaces para el control de la contaminación con aflatoxinas del ensilaje de maíz en Aguascalientes*. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Rangel-Muñoz, E., Valdivia-Flores, A., Moreno-Rico, O., Hernández-Delgado, S., Cruz-Vázquez, C., De-Luna-López, M., ... Máyek-Pérez, N. (2020). Caracterización de *Aspergillus Flavus* y cuantificación de aflatoxinas en pienso y leche cruda de vacas en Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11, 435–454. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i2.5686>
- Reyes Velázquez, W., Patricio Martínez, S., IsaíasEspinosa, V. H., Nathal Vera, M. A., Lucas Palacios, E. de, y Rojo, F. (2009). Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM1 en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. *Tecnica Pecuaria En Mexico*, 47(2), 223–230.
- Romo-Bacco, C. E., Valdivia-Flores, A. G., Carranza-Trinidad, R. G., Cámara-Córdova, J., Zavala-Arias, M. P., Flores-Ancira, E., y Espinosa-García, J. A. (2015). Brechas de rentabilidad económica en pequeñas unidades de producción de leche en el altiplano central mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 5(3), 273. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v5i3.3975>
- SAGARPA. (2010). *Diagnóstico Sectorial del Estado de Aguascalientes 2010* (p. 147). p. 147. Consultado en http://www.aguascalientes.gob.mx/sedrae/see/info-estatales/Otrostrabajosrealizados/Diagnostico_AGS_mat_2010.pdf
- Saito, M., y Machida, S. (1999). A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience*, 40, 205–208.

- <https://doi.org/10.1007/BF02464300>
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hubka, V., Perrone, G., Seifert, K. A., ... Kocsub, S. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78, 141–173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Santibáñez Escobar, R., Alejandro Martínez Ibarra, J., María Tapia Gonzalez, J., Avellaneda, J., Hernandez Gallardo, M., y Montañez-Valdez, O. (2011). IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HONGOS MICOTOXIGÉNICOS EN ALIMENTO PARA BOVINOS. *Ciencia y Tecnología*, 4, 19–23. <https://doi.org/10.18779/cyt.v4i1.52>
- Santini, A., y Ritieni, A. (2013). Aflatoxins: Risk, Exposure and Remediation. In M. Razzaghi-Abyaneh (Ed.), *Aflatoxins-Recent Advances and Future Prospects*. <https://doi.org/10.5772/52866>
- Scazzocchio, C. B. T.-R. M. in L. S. (2019). *Aspergillus: A Multifaceted Genus*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20803-0>
- Segers, F., van Laarhoven, K., A.B. Wösten, H., & Dijksterhuis, J. (2017). Growth of indoor fungi on gypsum. *Journal of Applied Microbiology*, 123(2), 429–435. <https://doi.org/10.1111/jam.13487>
- Segura, J., y Honhold, N. (2000). *Métodos de muestreo para la producción y la salud animal*. Mérida, Yucatán.
- SIAP. (2018a). Boletín de Leche. Consultado 25 de abril de 2019 , en [http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Boletín de Leche octubre-diciembre 2018.pdf](http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Boletín%20de%20Leche%20octubre-diciembre%202018.pdf)[http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Boletín de Leche enero-marzo 2018.pdf](http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Boletín%20de%20Leche%20enero-marzo%202018.pdf)
- SIAP. (2018b). Producción Ganadera. Consultado 1 de Marzo de 2019, en <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pecuaria>
- Slongo, A. P., y Aragao, G. (2006). Factors affecting the thermal activation of *Neosartorya fischeri* in pineapple and papaya nectars. *Brazilian Journal of Microbiology - BRAZ J MICROBIOL*, 37, 312–316. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000300021>
- Steyn, P. or P. S., y Stander, M. (1999). Mycotoxins as Causal Factors of Diseases in Humans. *Toxin Reviews - TOXIN REV*, 18(3–4), 229–243. <https://doi.org/10.3109/15569549909009255>
- Taylor, J. (2011). One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years

- after PCR. *IMA Fungus*, 2(2), 113–120.
<https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.02.01>
- Toso, R. E., Toribio, M. S., Diesser, M., Borrello, A. B., y Ardoino, S. M. (2018). Afecciones en animales y humanos por ingesta o exposición a las Aflatoxinas. Medidas preventivas para evitar los efectos tóxicos. *Ciencia Veterinaria*, 20(1), 51–67. Consultado en <http://10.0.74.193/cienvet-20182013%0Ahttp://dibpxy.uaa.mx/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=133358600&lang=es&site=eds-live&scope=site>
- Valdivia, A. G., Erika Janet Rangel Muñoz, C. A. M.-C., Tristán, T. Q., Ortiz, R., Vázquez, C. R. C.-, Esparza, L. E. M., y Mora, D. L. M. O. (2015). Control de la contaminación por aflatoxinas en sistemas intensivos de producción lechera del altiplano central mexicano. *V Congreso Internacional de Producción Animal Tropical 2015*.
- Variane, A. C. F., Santos, F. C. dos, Castro, F. F. de, Barbosa-Tessmann, I. P., Santos, G. T. dos, y Pozza, M. S. dos S. (2018). The occurrence of aflatoxigenic *Aspergillus* spp. in dairy cattle feed in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(4), 919–928. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.05.005>
- Walte, H. G., Schwake-Anduschus, C., Geisen, R., y Fritsche, J. (2016). Aflatoxin: Food chain transfer from feed to milk. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 11(4), 295–297. <https://doi.org/10.1007/s00003-016-1059-8>
- Wicklow, D. T. (1983). Taxonomic features and ecological significance of *Sclerotia*. In N. D. Diener, R. L. Asquith, & J. W. Dickens (Eds.), *Aflatoxin and Aspergillus flavus in Corn*. Southern Cooperative Series Bulletin 279. Auburn, University. Ala: Ala. Agric. Exp.Stn.
- Wilkinson, H., Ramaswamy, A., Sim, S.-C., y Keller, N. (2004). Increased conidiation associated with progression along the sterigmatocystin biosynthetic pathway. *Mycologia*, 96(6), 1190–1198. <https://doi.org/10.1080/15572536.2005.11832867>
- Wu, M., Mead, M., Kim, S.-C., Rokas, A., y Yu, J.-H. (2017). WetA bridges cellular and chemical development in *Aspergillus flavus*. *PLoS ONE*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179571>
- Yu, J. (2012). Current Understanding on Aflatoxin Biosynthesis and Future Perspective in Reducing Aflatoxin Contamination. *Toxins*, 4(11), 1024–1057. Consultado en <http://10.0.13.62/toxins4111024>
- Zulkifli, N. A., y Zakaria, L. (2017). Morphological and Molecular Diversity of *Aspergillus*

From Corn Grain Used as Livestock Feed. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24(1), 26–34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hjb.2017.05.002>



ANEXOS

Anexo A. Formato de encuesta para recolección de datos durante muestreo de RTM

Anexo B. Técnica de vaciado en placa por diluciones para el aislamiento de hongos microscópicos (Santibáñez-Escobar *et al.*, 2011)

Anexo C. Preparaciones azul de algodón-lactofenol para identificación de hongos microscópicos (López-Jácome *et al.*, 2014)

Anexo D. Claves taxonómicas para la identificación de especies de hongos *Aspergillus* (Klich, 2002)

Anexo E. Técnica de caracterización de la capacidad aflatoxigénica de *Aspergillus flavus* con siembra en agar-coco y vapores de hidróxido de amonio (Saito y Machida, 1999)

Anexo F. Técnica de ELISA para la cuantificación de aflatoxinas totales en muestras de RTM

Anexo G. Técnica de Elisa para la cuantificación de aflatoxinas totales de aislados compatibles con la morfología *Aspergillus flavus*

Anexo H. Extracción de ADN genómico de aislados *Aspergillus flavus*

Anexo I. Amplificación de genes mediante PCR

Anexo J. Variables y unidades de medición

Anexo K. Tablas para la conversión bovinos equivalentes y hectáreas de riego equivalentes, SAGARPA (2008) y Lozano-Santillán e Islas Ojeda (2009).

Anexo L. Programación de actividades

Anexo M. Etapas de realización del proyecto

Anexo A. Formato de encuesta para recolección de datos durante muestreo de RTM



MONITOREO

I. DATOS GENERALES

NOMBRE DE LA EXPLOTACIÓN:

FECHA:

UBICACIÓN:

RESPONSABLE:

PROPIETARIO:

II. CARACTERÍSTICAS DE LA EXPLOTACIÓN

Sistema de Producción:

Población total:

Superficie Agrícola:

Ha de riego:

Ha de temporal:

III. ALIMENTACIÓN

A) CONSTITUCIÓN DE LA DIETA

Ingredientes	Cantidad kg/Lote						
	Super altas	Altas	Medias	Bajas	Secas	Preparto	Frescas
Ensilajes							
Concentrado							
Granos y semillas							
Pajas							
Total							
Consumo de RTM/ vaca / día							

90

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Aplica secuestrante:	
Dosis:	
Nombre y marca:	

B) ORIGEN DE LOS INSUMOS

Producción propia:	
Compra Local:	
Compra Regional (estados vecinos):	
Compra Nacional:	
Compra Internacional:	

IV. PRODUCCIÓN Y REPRODUCCIÓN

	Producción	Secas	Vaquilla	Becerras
N° de animales:				
Producción promedio del Hato:				
Producción promedio (L/vaca/día):				

DESTINO DE LA LECHE (Señalar la cantidad de leche que se vende a cada destinatario)

Presencia de abortos en los últimos 4 meses?

Observaciones:

Anexo B. Técnica de vaciado en placa por diluciones para el aislamiento de hongos microscópicos (Santibáñez-Escobar *et al.*, 2011)

Las siembras de las muestras de RTM se realizaron en dos medios de cultivo, Czapeck y rosa de bengala agar (RBA). Para la preparación del medio Czapeck, se pesaron en una balanza semi analítica (BBADAM PGW 453e, Adam Equipment, EUA) 49 g de medio de cultivo Czapeck (Bioxon®, BD Becton Dickinson, EUA), se disolvieron en un litro de agua destilada; el preparado se agitó frecuentemente hasta su ebullición. Para la preparación del medio de cultivo RBA, se pesaron 26.6 g de extracto de malta (Bioxon®, BD Becton Dickinson, EUA), 20 g de Agar-Agar (Bioxon®, BD Becton Dickinson, EUA) y 0.025 g de rosa de bengala, se disolvieron en un litro de agua destilada; el preparado se agitó frecuentemente hasta su ebullición. Las preparaciones se esterilizaron en autoclave a 16 libras de presión durante 15 minutos.

Los medios estériles se vertieron dentro de una campana de flujo laminar vertical clase II tipo A2 (LVC-180, LuministellMR, México). Se limpió la superficie de la campana con alcohol, se introdujeron los medios de cultivo estériles, cajas de petri estériles, marcador permanente, tijeras, atomizador con alcohol al 96% y algodón; todo el material requerido para vaciar los medios se dejó dentro de la campana de flujo laminar bajo luz ultravioleta (UV) durante 15 minutos.

Pasados los 15 minutos se vaciaron 15 ml de los medios en cada caja de petri estéril, se dejaron enfriar durante 20 minutos dentro de la campana y se taparon, se almacenaron en refrigeración después de solidificado el medio, para su uso posterior. Se retiró el material utilizado y se limpió la superficie con alcohol al 96% y se cerró por completo la puerta de seguridad.

Se pesó un gramo del polvo de peptona de caseína (Bioxon®, BD Becton Dickinson, EUA) y se disolvió en un litro de agua destilada, se esterilizó en autoclave a 16 libras de presión durante 15 minutos, para obtener 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% para preparar 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% para obtener 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 pasó a un tubo estéril con 9 mL de peptona de caseína al 0.1% para obtener una dilución final de 1:10000.

Se inocularon 100 μ L de cada dilución en una caja petri con RBA y otra con czapeck, las cajas se taparon, se sellaron con parafilm y se incubaron en oscuridad a 27°C durante un periodo de 72 a 120 hrs.

Las cajas se revisaron diariamente y las observaciones se registraron en una bitácora. Se hicieron preparaciones con azul de algodón-lactofenol de las colonias fúngicas para identificar sus características morfológicas microscópicamente y determinar el género del hongo. La identificación de hongos del género *Aspergillus*, se basó en las claves taxonómicas para esta especie descritas por Klich (2002).

Anexo C. Preparaciones azul de algodón-lactofenol para identificación de hongos microscópicos (López-Jácome *et al.*, 2014)

Se limpió la campana de extracción con alcohol al 96%, se introdujeron portaobjetos, cubreobjetos, agujas de disección, gotero con azul de lactofenol y cajas con RBA y CYA en las que se observó crecimiento fúngico.

Se dejó bajo luz UV durante 15 min, después de pasar una torunda con alcohol por ambas superficies de los portaobjetos se flamearon con ayuda del mechero. 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 algodón-lactofenol en el centro del portaobjetos previamente desinfectado, con la aguja de disección se tomó una porción de la colonia de interés y se colocó sobre la gota de colorante, se extendió la preparación cuidadosamente con ayuda de otra aguja de disección, se cubrió con un cubreobjetos previamente esterilizado.

Las laminillas se identificaron con número de la muestra a la que pertenecía la colonia, número de aislado, fecha de preparación e iniciales de quien realizó la tinción. Al terminar las preparaciones, 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 cerró por completo la puerta de seguridad.

Las preparaciones se observaron al microscopio óptico (Carl Zeiss, Axiostar plus, EUA) a diferentes aumentos (5x, 10x y 40x), se registró en una bitácora el género del aislado y se realizó la cuantificación de UFC/g con la fórmula:

$$\frac{UFC}{mL} \text{ ó } \frac{UFC}{g} = \frac{No. de colonias por placa * factor de dilución}{g de muestra sembrada}$$

Los resultados se clasificaron en recuentos nulos (0 UFC/g), bajos ($\leq 10^3$ UFC/g), moderados ($>10^3 \leq 10^5$ UFC/g) y altos ($>10^5$ UFC/g).

Los aislados compatibles con morfología *Aspergillus flavus* se sembraron bajo las mismas medidas de esterilidad en una caja de Petri con medio de cultivo Czapeck, para lograr su purificación.

Anexo D. Claves taxonómicas para la identificación de especies de hongos

Aspergillus (Klich, 2002)

Importante:

Diámetro de colonias a los 7 días de incubación

* Indica que hay especies relacionadas que deben considerarse. Estos se discuten en la parte inferior de la descripción de la especie

1. Predominantemente biseriados.....	2
1. Predominantemente uniseriados.....	43
2(1) Diámetro de colonia mayor de 45 mm en CYA25 y / o MEA.....	3
2(1) Diámetro de colonia menor de 45 mm en CYA25 y / o MEA.....	22
3(2) Conidios en tonos de verde a azul verdoso en CYA25.....	4
3(2) Conidios no verdes en CYA25.....	11
4(3) Vesículas más grandes menores de 20 µm de ancho, los estípites se vuelven marrones con la edad	5
4(3) Vesículas más grandes de más de 25 µm de ancho, los estípites permanecen incoloros.....	7
5(4) Diámetro de la colonia inferior a 35 mm en CYA37, cleistotecios ausentes.....	<i>A. caespitosus</i>
5(4) Diámetro de la colonia mayor de 50 mm en CYA37, cleistotecios presentes.....	6
6(5,28) Ascosporas con 2 bridas longitudinales delgadas.....	<i>Emericella nidulans</i>
6(5,28) Ascosporas con 4 bridas longitudinales delgadas, 2 bastante pequeñas.....	<i>Emericella quadrilineata</i>
7(4,50) Paredes conidiales lisas a finamente rugosas.....	8
7(4,50) Paredes conidiales extremadamente rugosas.....	9
8(7) Conidios usualmente amarillo grisáceo a marrón oliva en edad en CYA25, diámetro conidial 4-8.5 µm.....	<i>A. orizae</i>
8(7) Conidios restantes verde oliva a verde loro en CYA25, diámetro conidial 6-8 µm.....	<i>A. flavus</i> *
9(7) Conidios usualmente de 3-6 µm de diámetro, colonias restantes en tonos verde oliva o verde oscuro CYA25 en edad.....	<i>A. parasiticus</i>
9(7) Conidios usualmente de 5-8 µm de diámetro, colonias generalmente de bronce a marrón en edad CYA25.....	10
10(9) Cabezas conidiales predominantemente uniseriadas, conidios no adornados con tubérculos de color oscuro.....	<i>A. sojae</i>
10(9) Cabezas conidiales variables, uniseriadas y biseriadas, ambas generalmente presentes, conidios adornados con tubérculos de color oscuro.....	<i>A. tamarii</i> *
11(3) Conidios en colores negro, marrón oscuro o bronce.....	12
11(3) Conidios en colores canela, ante o amarillo.....	16

12(11) Diámetro conidial máximo menor o igual a 6 μm	13
12(11) Diámetro conidial máximo de 7 μm o más.....	15
13(12) Conidios de pared rugosa.....	<i>A. niger</i> *
13(12) conidios con paredes lisas a finamente rugosas.....	14
14(13) Diámetro de colonia de 65-70 mm en CYA37, micelios en CY20S incoloros a amarillo pálido.....	<i>A. awamori</i>
14(13) Diámetro de colonia en CYA37 predominantemente menor que 65mm, micelios en CY20S a menudo claramente amarillo.....	<i>A. foetidus</i>
15(12) Colonias menores de 30 mm en CYA37, área conidial negro.....	<i>A. carbonarius</i>
15(12) Colonias mayores de 40 mm en CYA37, área conidial de oliva a bronce.....	<i>A. tamarii</i> *
16(11,34) Conidios de 4-6 μm de largo.....	<i>A. ostianus</i>
16(11,34) Conidios predominantemente 3.5 μm o de menor longitud.....	17
17(16) Cabezas conidiales compactamente columnares, conidios en colores camel a canela, diámetro de la colonia en CYA37 generalmente menos de 55 mm....	<i>A. terreus</i>
17(16) Cabezas conidiales radiadas cuando son jóvenes, los conidios en colores amarillo a ocre, los diámetros de colonias en CYA37 generalmente menos de 55 mm.....	18
18(17) Paredes de la estípita lisas.....	<i>A. alliaceus</i>
18(17) Paredes de la estípita rugosas.....	19
19(18) Conidios maduros amarillos.....	20
19(18) Conidios maduros ocre, crema o ante.....	21
20(19) Colonias en CYA25 dominadas por esclerocios de amarillo a naranja.....	<i>A. auricomus</i>
20(19) Esclerocios, cuando presentes, de color blanco a ante.....	<i>A. sclerotium</i>
21(19) Esclerocios, cuando están presentes, rosas opaco a púrpuras, los estípites más largos generalmente mayores a 1000 μm en MEA.....	<i>A. ochraceus</i>
21(19) Esclerocios abundantes, pequeños, de color amarillo que se vuelven de color marrón, los estípites más largos generalmente menores de 800 μm en MEA....	<i>A. melleus</i>
22(2) Conidios predominantemente mayores de 4 μm de longitud.....	23
22(2) Conidios predominantemente menores a 4 μm de longitud.....	26
23(22) Vesículas predominantemente de menos de 20 μm de diámetro y áreas conidiales de color verde grisáceo a verde oscuro.....	<i>A. caespitosus</i>
23(22) Vesículas predominantemente mayores de 20 μm de diámetro, conidios variables	24
24(23) Conidios de café oscuro a negro, colonias mayores a 45 mm en CYA37.....	<i>A. foetidus</i>
24(23) Conidios amarillos, ante o verdes, colonias menores de 35 mm en CYA37.....	25
25(24) Conidios de color amarillo a ante, diámetro de las colonias de 38-50 mm en CYA25.....	<i>A. ostianus</i>
25(24) Conidios dispersos, de color azul verdoso, diámetro de la colonia 10-25 mm en CYA25.....	<i>Chaetosartorya crenea</i>
25(24) Conidios bronce a café oliva, diámetro de la colonia 25-35 mm en CYA25....	<i>A. wentii</i>

26(22) Conidios en colores verde a verde azul en CYA25.....	27
26(22) Conidios en otros colores en CYA25.....	34
27(26) Crecimiento en CYA37 mayor de 50 mm, cleistotecios presentes, rodeado de células de Hülle.....	28
27(26) Crecimiento en CYA37 menor de 50 mm, cleistotecios, si está presente, no rodeado de células de Hülle.....	29
28(27) Colonias en CYA25 menores a 35 mm.....	<i>Emericella rugulosa</i>
28(27) Colonias en CYA25 mayores a 35 mm.....	Volver al 6
29(27) Vesículas predominantemente mayores a 20µm de diámetro.....	30
29(27) Vesículas predominantemente menores a 20µm de diámetro.....	31
30(29) Colonias en CY20S mayores de 50 mm de diámetro, conidios en MEA oliva a amarillo-naranja.....	<i>A. wentii</i>
30(29) Colonias en CY20S menores a 40 mm, conidios en MEA de crema a ante....	<i>A. sparsus</i>
31(29) Hifas estériles de paredes gruesas que se elevan por encima de las cabezas conidiales.....	<i>A. unguis</i>
31(29) Hifas estériles de paredes gruesas ausentes.....	32
32(31) Diámetro de la colonia en CY20S y en CYA25 mayor de 35 mm.....	<i>A. caespitosus</i>
32(31) Diámetro de la colonia en CY20S y en CYA25 menor de 35 mm.....	33
33(32) Colonias de azul grisáceo a gris azulado, conidios de pared rugosa.....	<i>A. sydowii</i>
33(32) Colonias verde opaco a verde grisáceo, conidios lisas a finamente ásperas....	<i>A. versicolor*</i>
34(26) Conidios de color amarillo a ochraceus y colonias de más de 40 mm en CY20S y de menos de 40 mm en CYA37.....	Regresar al 16
34(26) Color conidial y diámetros de colonias no como arriba.....	35
35(34) Vesículas predominantemente mayores de 20 µm en diámetro.....	36
35(34) Vesículas predominantemente menores de 20 µm en diámetro.....	37
36(35) Conidios blancos a amarillo pálido.....	<i>A. candidus</i>
36(35) Conidios ante, bronce u oliva.....	Regresar al 30
37(35) Diámetro de colonias de 55-70 mm en CYA37 y CY20S, cabezas conidiales compactamente columnares.....	<i>A. terreus</i>
37(35) Diámetro de colonias menores de 55 mm en CYA37 y CY20S, cabezas conidiales no compactamente columnares.....	38
38(37) Conidios en CYA25 blancos a amarillo pálido.....	39
38(37) Conidios en CYA25 rosa o bronceados.....	40
39(38,45) Vesículas predominantemente mayores de 15 µm, métulas que cubren toda la superficie de la vesícula.....	<i>A. candidus</i>
39(38,45) Vesículas predominantemente menores de 15 µm, métulas que cubren uno o dos tercios superiores de la vesícula.....	<i>A. niveus</i>
40(38) Conidios de paredes lisas, conidios de rosa a tostado en MEA y CY20S.....	41
40(38) Conidios finamente rugosas, conidios verdes, marrones u olivas en MEA o CY20S.....	42

41(40) Conidios rosa pálido en CYA25 o MEA.....	<i>A. corneus</i>
41(40) Conidios de color naranja parduzco opaco en CYA25 o MEA.....	<i>A. flavipes</i>
42(40) Color general en CYA25 naranja pálido/rosa a tostado, los conidios generalmente se endurecen finamente.....	<i>A. puniceus</i>
42(40) Color general en CYA25 marrón pálido a marrón grisáceo, conidios de pared rugosa, espinosa.....	<i>A. ustus</i>
43(1) Conidios en CYA25 negros, blancos, bronceado, amarillos o rosas.....	44
43(1) Conidios en CYA25 en tonos de verde, oliva o turquesa.....	47
44(43) Conidios en CYA25 marrón muy oscuro a negro, paredes ásperas.....	<i>A. japonicus*</i>
44(43) Conidios no negros/café en CYA25, paredes lisas.....	45
45(44) Conidios de blanco a blanquecino en CYA25, colonias en MEA de menos de 40 mm de diámetro.....	Regresar al 39
45(44) Conidios de crema a amarillo en CYA25, colonias 65-70 mm en MEA.....	<i>A. alliaceus</i>
45(44) Conidios naranja pálido a rosa en CYA25, colonias 40-65 mm en MEA.....	46
46(45) Crecimiento en CY20S predominantemente 5-10 mm, estípites más largas mayores a 450 μ m.....	<i>A. kanagawaensis</i>
46(45) Crecimiento en CY20S predominantemente 10-19 mm, estípites más largas menores a 450 μ m.....	<i>A. cervinus</i>
47(43) Diámetro de las colonias en MEA mayor de 30 mm.....	48
47(43) Diámetro de las colonias en MEA menor de 30 mm.....	53
48(47) Sin crecimiento en CYA37.....	49
48(47) Crecimiento en CYA37.....	50
49(48) Reverso y pigmento soluble generalmente amarillo brillante en CYA25, paredes conidiales lisas a finamente rugosas.....	<i>A. paradoxus</i>
49(48) Reverso incoloro a mate opaco, pigmento soluble ausente en CYA25, paredes conidiales muy rugosas.....	<i>Sclerocleista ornata</i>
50(48) Conidios verde amarillos, oliva o bronce.....	Regresar al 7
50(48) Conidios verde gris a gris azulado.....	51
51(50) Cabezas conidiales predominantemente clavadas, colonias en CYA37 de menos de 30 mm de diámetro.....	<i>A. clavatus*</i>
51(50) Cabezas conidiales predominantemente piriformes a espatuladas, colonias en CYA37 de más de 55 mm de diámetro.....	52
52(51) Cleistotecios presentes.....	<i>Neosartorya fischeri*</i>
52(51) Cleistotecios ausentes.....	<i>A. fumigatus</i>
53(47) Cleistotecios ausentes.....	54
53(47) Cleistotecios presentes.....	55

- 54(53) Diámetro de las colonias 8 mm o menor en CYA25 y menor a 12 mm en CY20S, fiálides que cubren más de la mitad de la vesícula, conidios que se presentan como elipses..... *A. penicilloides*
- 54(53) Diámetro de la colonia predominantemente mayor de 8 mm en CYA25, y mayor de 15 mm en CY20S, fialides restringidas al tercio superior de la vesícula, conidios que se presentan como cilindros..... *A. restrictus*
- 55(53) Ascosporas de paredes ásperas..... *Eurotium amstelodami*
- 55(53) Ascosporas de paredes lisas..... 56
- 56(55) Ascosporas con dos bridas distintas..... *Eurotium chevalieri*
- 56(55) Ascosporas sin bridas..... *Eurotium herbariorum**



Anexo E. Técnica de caracterización de la capacidad aflatoxigénica de *Aspergillus flavus* con siembra en agar-coco y vapores de hidróxido de amonio (Saito y Machida, 1999)

En condiciones asépticas, se pesaron 200 g de coco rallado y se agregaron a 1000 mL de agua destilada caliente, se mezclaron en licuadora durante 5 min, se pasaron por tres capas de manta de cielo y se ajustó el pH a 6.5. Por cada litro de producto filtrado se agregaron 20g de agar, se mezclaron con frecuencia hasta su ebullición. El medio agar-coco (CAM) se esterilizó en autoclave a 16 libras de presión durante 20 min; se vertieron 15 mL del medio en cajas de Petri estériles, dentro de la campana de flujo laminar, previamente desinfectada. Las cajas con el medio se dejaron enfriar hasta su gelificación, posteriormente, se taparon y se guardaron en refrigeración debidamente selladas hasta su uso. Por inoculación única al centro, se transfirieron a las cajas Petri con medio de cultivo CAM, las colonias de *Aspergillus flavus* purificadas obtenidas de la ración total mezclada. Se incubaron en obscuridad a 30°C por tres días. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las cajas Petri se colocaron bocabajo y en las tapas se adicionaron 300 µL de hidróxido de amonio al 25%. El reverso de la colonia de las cepas productoras de AF viró a color rosa después de aplicar la solución de amoniaco. La intensidad del color estuvo relacionada con una mayor producción de AF.

Anexo F. Técnica de ELISA para la cuantificación de aflatoxinas totales en muestras de RTM

De las muestras secas y molidas se pesaron cinco gramos, 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 μ L del filtrado para cada uno de los pocillos de la microplaca. Todos los reactivos se llevaron a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F). Como solución de lavado se usó un tampón PBS-Tween, el sobre completo del tampón se disolvió en un litro de agua destilada, el tampón se mantiene estable entre cuatro y seis semanas a una T° de 2 a 8°C (35-46°F). Los estándares de aflatoxina están listos para su uso.

Se colocaron pocillos suficientes en el soporte de la microplaca para los estándares y las muestras que se analizaron. Se registró la posición de los estándares y las muestras en una hoja impresa donde se representó la microplaca. Se agregaron 50 μ L de los estándares y de las muestras a analizar en los pocillos correspondientes, usando una punta nueva y estéril para cada estándar y cada muestra. Se agregaron 50 μ L del conjugado aflatoxina-enzima a los pocillos correspondientes. Después se agregaron 50 μ L del anticuerpo anti-aflatoxina a los pocillos correspondientes, se mezcló el contenido de la microplaca suavemente y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. El contenido de los pocillos se vació en un recipiente con golpes enérgicos en el marco del portapocillos (tres veces consecutivas) sobre un papel absorbente limpio para eliminación completamente los restos de líquido.

Se lavaron los pocillos con 250 μ L de tampón de lavado utilizando una micropipeta multicanal y se vaciaron nuevamente los pocillos de la forma indicada anteriormente. Este paso se repitió dos veces más. Se agregaron 100 μ L de sustrato/cromógeno a cada pocillo, mezclando el contenido de la microplaca suavemente y se incubó 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se agregaron 100 μ L de la solución stop a cada pocillo y se mezcló el contenido de la microplaca suavemente. Se midió la absorbancia a 450nm, para tomar la lectura no se dejaron pasar más de 10 minutos. 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 AF correspondiente a la absorción se leyó directamente en la curva de calibración (Figura 22).

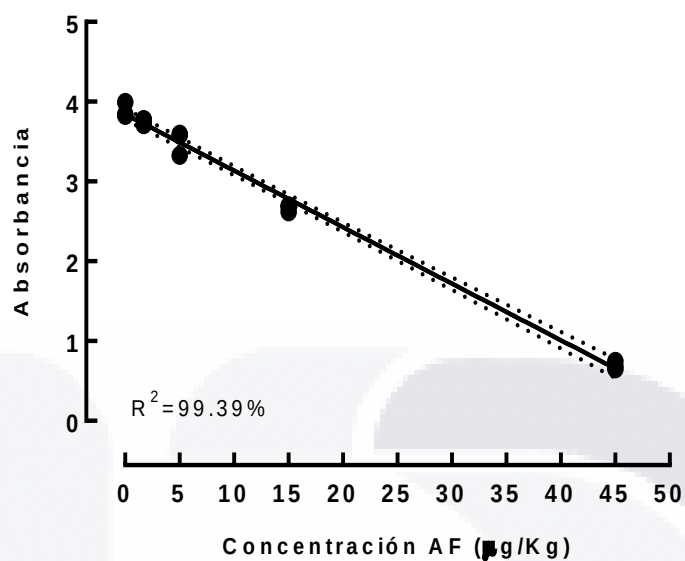


Figura 25. Curva de estándar para aflatoxinas totales cuantificadas con ELISA

Anexo G. Técnica de Elisa para la cuantificación de aflatoxinas totales de aislados compatibles con la morfología *Aspergillus flavus*

Dentro de la campana de flujo laminar, en ambiente estéril, se tomó una porción del micelio poliespórico de los aislados purificados de colonias compatibles con la morfología de *Aspergillus flavus* y se diluyó en un tubo con 40 mL de agua destilada estéril. En cajas Petri con medio de cultivo PDA se colocaron de 6 a 8 perlas de vidrio y se vertieron 100 µL de la solución de esporas. Se agitó la caja de Petri para esparcir homogéneamente la solución sobre la superficie y se retiraron las perlas de vidrio. Se incubó la caja Petri en obscuridad a 26°C por 24 horas. Con la ayuda de un palillo estéril, se tomó sólo una colonia y se realizó la inoculación de ésta en una caja Petri con medio de cultivo Agar-coco (CAM). Se incubó en obscuridad a 27°C por cinco días. Se obtuvo y registró el peso de los cultivos monospóricos, dentro de la campana de extracción los cultivos fueron cortados en tiras y colocados con ayuda de una espátula en matraces de 250 mL, se añadió metanol al 70% en una proporción 1:5 (cultivo monospórico:metanol) y se agitaron durante tres minutos, se filtraron sobre papel filtro con porosidad 1, se usaron 50 µL del filtrado para cada uno de los pocillos de la microplaca del kit comercial de ELISA (RIDASCREEN FAST® aflatoxin R-5202, R-Biopharm, Alemania) y se realizó el procedimiento descrito en el anexo F para la cuantificación de aflatoxinas totales. 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 AF correspondiente a la absorción se leyó directamente en la curva de calibración (Figura 22).

Anexo H. Extracción de ADN genómico de aislados *Aspergillus flavus*

A partir de cultivos monospóricos, dentro de la campana de flujo laminar, se obtuvieron discos de micelio de 1 mm de diámetro con ayuda de un palillo estéril; el micelio se depositó en tubos Falcón con 5 mL de caldo papa y dextrosa. Los tubos cerrados e identificados se incubaron a 30°C durante 48 horas. Posteriormente, se centrifugaron a 3500rpm por 30 minutos. La masa celular rescatada se lavó con 500 µL de agua destilada estéril, se transfirió a un vial limpio y estéril y se centrifugó a 8000 rpm durante cinco minutos y se descartó el sobrenadante. La pastilla de micelio se resuspendió en 300 µL de buffer de lisis (NaCl, 0.1 M; Tris-HCl pH8, 10mM y EDTA, 1mM), 20 µL de SDS 2% y 10 µL Tritón X-100, 2%. Se agregaron 300 µL de fenol-cloroformo y 300 mg de perlas de vidrio de 1mm de diámetro. Los viales se agitaron durante un minuto en el mezclador de vórtice y se reposaron en hielo por un minuto, esta operación se repitió por 3 veces y se reposaron en congelación por un lapso de 30 minutos; posteriormente se agitaron en el mezclador de vórtice (un minuto) y se reposaron en hielo (un minuto) tres veces más. Se añadieron 300 µL de TE (10:1; Tris y EDTA) y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos.

En un vial nuevo se transfirieron 500 µL del sobrenadante y se agregaron 6 µL de ARNasa (Biotech), se incubó en la estufa de aire forzado a 37°C durante 15 minutos. Se agregaron 10 µL de acetato de amonio 4M y 1mL de etanol absoluto. Se agitó por inversión suave y se dejó reposar a -20°C durante 30 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante con cuidado de no desechar la pastilla de ADN. La pastilla se lavó con 100 µL de etanol al 70%; el etanol se descartó y se dejó secar en la estufa de aire forzado por 2 minutos o hasta la evaporación total del alcohol. La pastilla de ADN de resuspendió en 35 µL de TE 1X, se agitó suavemente el vial y se conservó a 20°C.

Se visualizó la calidad y la cantidad de ADN total obtenida con la técnica de electroforesis en gel. Para preparar el gel de agarosa al 1%, se pesaron 0.318 g de agarosa y se depositaron en un matraz de 250mL, se añadieron 31.8 mL de TAE 1X. La preparación se disolvió mediante calor en el horno de microondas. Se dejó enfriar la solución hasta que se pudiera soportar la temperatura del matraz con la palma de la mano y se agregaron 0.5 µL de intercalante GelRed, se vertió en una caja con peine y se dejó gelificar. Se retiró el peine y se colocó la caja dentro de la cámara electroforética. La cámara se llenó con TAE 1X.

Se colocó un trozo de parafilm sobre una superficie plana y se desprendió el recubrimiento, se depositó sobre el parafilm 1 µL de buffer de carga con colorante, se agregaron 4 µL de

ADN genómico y se mezcló con la micropipeta. Al terminar de cargar todas las muestras, la cámara se tapó y se conectaron los electrodos a la fuente de poder. Se corrió el gel a 95 volts durante 40 minutos, posteriormente se visualizó el bandeo en el fotodocumentador.



Anexo I. Amplificación de genes mediante PCR

En la amplificación de fragmentos del ADN genómico se utilizaron los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 (Thermo Fisher Scientific) para la región ITS1-5.8S-ITS2-ARNr y los iniciadores CMDA7-F y CMDA8-R (Thermo Fisher Scientific) para el gen *CaM*. La amplificación de las secuencias ITS y *CaM* se basó en los protocolos descritos por White *et al.*, (1990) y Geiser *et al.*, (1998), respectivamente.

Gen/Región diana	Peso molecular (pb)	Iniciador	Dirección	Secuencia iniciador (5'-3')
ITS (Espaciador transcrito interno)	----	ITS1	Foward	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
		ITS4	Reverse	5'-TCCTCCGCTTATTGATATG -3'
<i>CaM</i> (Calmodulina)	468	CMDA7-F	Foward	5'-GCCAAAATCTTCATCCGTAG-3'
		CMDA8-R	Reverse	5'-ATTTCGTTTCAGAATGCCAGG-3'

Para ambas pruebas de amplificación se utilizó la Taq-polimerasa Platinum Green Hot Start PCR 2X Master Mix (Buffer con Mg^{2+} y dNTPs) de Thermo Fisher Scientific. El volumen total de mezcla para la reacción de amplificación de la región ITS fue de 25 μ L (ADN: 5 μ L, Taq-Polimerasa: 12.5 μ L, oligonucleótido forward: 1 μ L, oligonucleótido reverse: 1 μ L y agua libre de nucleasas: 5.5 μ L). Las condiciones para la reacción de PCR para la amplificación de un fragmento de la región ITS1-5.8S-ITS2 RNAr fueron: un periodo de desnaturalización de 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos (desnaturalización a 94°C/1 min, alineación a 54°C/1 min y extensión a 72°C/1min), con una extensión final de 9 min a 72°C (White *et al.*, 1990). El volumen total de la mezcla para la reacción de amplificación de gen *CaM* fue de 25 μ L (ADN: 5.5 μ L, Taq-Polimerasa: 12.5 μ L, oligonucleótido forward: 0.4 μ L, oligonucleótido reverse: 0.4 μ L y agua libre de nucleasas: 6.7 μ L). Las condiciones para la reacción de PCR del gen de *CaM* fueron las siguientes: periodo de desnaturalización un ciclo de 1min/94°C seguido de 30 ciclos (1min/94 °C, para el alineamiento 1 min/53 °C y para la extensión 1min/72 °C) y se agregó un período de extensión final de 10 min a 72°C (Geiser *et al.* 1998). Las reacciones de amplificación (ITS y *CaM*) se realizaron en un termociclador (TECHNE).

La calidad de los productos de PCR se verificó mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, con 4 μ L de producto de PCR (ADN amplificado). En el primer carril del gel se incluyó 1 μ L de una escalera de 100 pb como marcador de peso molecular

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(Thermo Fisher Scientific) 1 μ L de teñidor 10X BlueJuice (Thermo Fisher Scientific). Se visualizó el bandeo en el fotodocumentador.



Anexo J. Variables y unidades de medición

Variables	Cualitativa	Cuantitativa	Unidad de medición
Geográficas			
Ubicación del establo	X		Nominal
Origen de los insumos	X		Nominal
Zootécnicas			
Composición de la RTM	X		Pajas y/o rastrajos, forrajes frescos, granos y semillas, ensilados, concentrados y/o núcleos proteínicos, subproductos
Tamaño del establo	X	X	N° vacas
Producción de leche		X	Miles de L/mes/UPL
Productividad de leche		X	L/Vaca/d
Vacas en producción		X	%
Socioeconómicas			
Tamaño del hato	X	X	N° de bovinos equivalentes
Superficie agrícola de riego	X	X	Ha equivalentes de riego
Estrato de producción	X		Micro y pequeño, mediana, grande
De respuesta			
Contaminación de RTM por <i>Aspergillus flavus</i>		X	UFC/g de muestra
Nivel de contaminación UFC/g	X		Bajo, moderado, alto
Contaminación de RTM por AF		X	µg/kg
Muestras que exceden LMP de AF	X		Si, No

Anexo K. Tablas para la conversión bovinos equivalentes y hectáreas de riego equivalentes, SAGARPA (2008) y Lozano-Santillán e Islas Ojeda (2009).

Cuadro 24. Equivalencia a superficie agrícola de riego de los tipos de superficie agrícola

Tipo de hectáreas (Ha)	Hectáreas equivalentes de riego (Ha)
Riego	1.00
Temporal	0.50

Cuadro 25. Bovinos equivalentes de acuerdo a la etapa de ganado bovino

Tipo de animal	Bovinos equivalentes
Vaca de 400-500 kg	1.00
Vaca adulta con su cría (< 7 meses)	1.00
Cría de bovino destetada	1.25
Bovino añojo (> 12 meses ≤ 17 meses)	0.60
Bovino añojo (> 17 meses ≤ 22 meses)	0.70
Bovino de dos años	0.75

Anexo L. Programación de actividades

Etapa	Actividad	Semestre 1	Semestre 2	Semestre 3	Semestre 4
		Ene-Jun	Jul-Dic	Ene-Jun	Jul-Dic
		2019	2019	2020	2020
Objetivo específico 1	Integración unidades de producción	XXXXXX			
	Visitas a unidades productoras	X	XXXXXX		
	Elaboración y prueba de encuesta para recolección de datos	XXX			
	Obtención de muestras RTM		XXXXXX		
	Aplicación de encuesta a encargados de UPL		XXXXXX		
Objetivo específico 2	Preparación de muestras (secado y molido)		XXXXXX		
	Cuantificación de AF en muestras de RTM		XXXXXX	XXXXXX	
Objetivo específico 3	Siembra en medios de cultivo de diluciones seriadas de muestras de RTM		XXXXXX	XXXXXX	
	Preparaciones con azul de algodón-lactofenol		XXXXXX	XXXXXX	
	Observación de laminillas al microscopio para identificación de colonias		XXXXXX	XXXXXX	
	Aislamiento de A. flavus de muestras de RTM		XXXXXX		
	Extracción de ADN genómico y amplificación de ITS y CaM				XXXXXX
Objetivo específico 4	Siembra de aislados A. flavus en agar-coco			XXXXXX	
	Determinación de capacidad aflatoxigénica con vapores de hidróxido de amonio			XXXXXX	
	Cuantificación de AF en muestras de aislados A. flavus			XXXXXX	
Objetivo específico 5	Captura de información en base de datos		XXXXXX	XXXXXX	XXX
	Análisis estadístico de resultados		XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX
	Interpretación de resultados				XXXXXX
Actividades académicas	Cursos académicos de maestría	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX
	Estandarización de técnicas	XXXXXX	XX		XXX
	Escritura de protocolo	XXXXXX			
	Seminario de avances	X	X	X	X
	Acreditación de idioma inglés		XXX		
	Actividades complementarias	XXXXXX	XXXXXX		XXXXXX
	Redacción de artículo				XXXXXX
	Escritura de Tesis		XX		XXXXXX
	Participación en congresos		XX		XX
	Preparación del examen de grado				X

Nota: Cada "X" corresponde a un mes, el color verde señala actividades realizadas.

Anexo M. Etapas de realización del proyecto

Número de Etapa:	001
Descripción:	Puesta en Marcha
Duración (meses):	6
Fechas	Inicio: 14 de enero de 2019 Fin: 30 de junio de 2019
Descripción de la Etapa:	Se realizará la integración de las unidades de producción y, ante la declaración de confidencialidad, se obtendrá el consentimiento informado del productor o encargado, afirmando que proporcionará la información real y confiable que se solicite. Se estandarizarán las técnicas de laboratorio.
Descripción de la Meta:	Formación de un grupo de unidades de producción representativo de la región.
Productos de la Etapa:	Protocolo sobre la puesta en marcha del proyecto.
Número de Etapa:	002
Descripción:	Realización del estudio y análisis de resultados
Duración (meses):	12
Fechas	Inicio: 01 de julio de 2019 Fin: 30 de junio de 2020
Descripción de la Etapa:	Se realizará la obtención de muestras y se procesarán en el laboratorio, se registrarán los resultados en una base de datos para su posterior análisis estadístico, se presentarán avances en seminarios de investigación.
Descripción de la Meta:	Obtención de muestras en las unidades de producción, preparación y análisis de muestras en laboratorio. Análisis de resultados.
Descripción de la Actividad:	Obtención y procesamiento de las muestras; Análisis de resultados y presentación en los seminarios de avances de investigación.
Productos de la Etapa:	Informe fundamentado e interpretado acerca de los resultados y alcance de los objetivos parciales propuestos.
Número de Etapa:	003
Descripción:	Difusión de resultados en eventos académicos
Duración (meses):	6
Fechas	Inicio: 01 de julio de 2020 Fin: 30 de diciembre de 2020
Descripción de la Etapa:	Se realizará la presentación de los resultados y sus repercusiones teóricas y prácticas en eventos académicos y en reuniones con productores interesados en el tema.
Descripción de la Meta:	Redacción de borrador de un artículo en el formato de una revista reconocida por el JCR o por el CONACYT. Redacción de una versión de la tesis en el formato institucional y con las autorizaciones correspondientes. Participación como ponente en al menos en un congreso. Cumplimiento de los requisitos para la autorización del examen de grado.
Productos de la Etapa:	Al menos la redacción de un borrador de artículo científico, una participación como ponente en un congreso y en una reunión con productores; Obtención de autorizaciones correspondientes a la tesis y del cumplimiento de los requisitos para el examen de grado.