

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

INFLUENCIA DE FACTORES CLIMÁTICOS, AGRONÓMICOS Y ZOOTÉCNICOS EN LA CONTAMINACIÓN POR AFLATOXINAS EN ALIMENTO PARA VACAS LECHERAS EN AGUASCALIENTES, MÉXICO

QUE PRESENTA

M. EN C. MARÍA FERNANDA ÁLVAREZ DÍAS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Tutor

DR. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES

Comité Tutoral

DR. JOAQUÍN SOSA RAMÍREZ

DR. JOSÉ ISIDRO ALEJOS DE LA FUENTE

Aguascalientes, Ags., 12 de noviembre de 2024

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente le informamos que en calidad de **Miembros del Comité Tutorial** designado de la **M. EN C. MARÍA FERNANDA ÁLVAREZ DÍAS**, egresada del Doctorado en Ciencias Biológicas con ID 266235, hemos revisado su tesis titulada **INFLUENCIA DE FACTORES CLIMÁTICOS, AGRONÓMICOS Y ZOTÉCNICOS EN LA CONTAMINACIÓN POR AFLATOXINAS EN ALIMENTO PARA VACAS LECHERAS EN AGUASCALIENTES, MÉXICO** y las correcciones indicadas se han incorporado apropiadamente a la versión final del documento. Consideramos que esta tesis es un trabajo propio, innovador, relevante e inédito, por lo que con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia y el Artículo 136, Apartado I del Reglamento General de Posgrado, nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO** con el que damos nuestro consentimiento para que ella pueda imprimir su tesis y continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

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

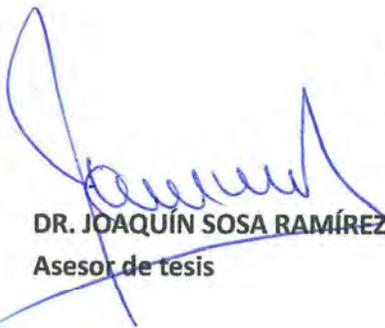
ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 12 de noviembre de 2024



Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores
Tutor de tesis



DR. JOAQUÍN SOSA RAMÍREZ
Asesor de tesis



DR. JOSÉ ISIDRO ALEJOS DE LA FUENTE
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado

c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 28/11/2024

NOMBRE: María Fernanda Álvarez Díaz **ID** 266235

PROGRAMA: Doctorado en Ciencias Biológicas **LGAC (del posgrado):** Toxicología y Bioingeniería Ambiental

TIPO DE TRABAJO: () Tesis () Trabajo Práctico

TÍTULO: Influencia de factores climáticos, agronómicos y zootécnicos en la contaminación por aflatoxinas en alimento para vacas lecheras en Aguascalientes, México

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Se generó información sobre el panorama actual de contaminación por aflatoxinas en la cadena productiva láctea de bovinos del estado de Aguascalientes y de cepas toxigénicas. Esto contribuirá al diseño de estrategias para reducir el riesgo de exposición a las aflatoxinas por parte del ganado lechero y la población humana de la región. De esta manera, se podrán evitar problemas de salud relacionados a la ingesta de dichos contaminantes.

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

INDICAR	SÍ	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:				
<i>SÍ</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
<i>SÍ</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
<i>SÍ</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
<i>SÍ</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
<i>SÍ</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
<i>SÍ</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
<i>SÍ</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
<i>NO</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
<i>SÍ</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
El egresado cumple con lo siguiente:				
<i>SÍ</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
<i>SÍ</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
<i>SÍ</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
<i>N.A.</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
<i>SÍ</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Coincide con el título y objetivo registrado
<i>SÍ</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Tiene congruencia con cuerpos académicos
<i>SÍ</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Tiene el CVU del Consejo actualizado
<i>SÍ</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
En caso de Tesis por artículos científicos publicados				
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Aceptación o publicación de los artículos según el nivel del programa
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	El estudiante es el primer autor
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	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 No

FIRMAS

Elaboró:

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

Dr. Edgar Eduardo Hernández Cuellar

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Dr. Gilberto Alejandro Ocampo Acosta

* En caso de conflicto de intereses, firmar las veces 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. Alejandro Padilla Díaz

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL TUTOR:

M en C. Jorge Martín Alférez Chavez

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 a cabo los siguientes procedimientos:



toxins

an Open Access Journal by MDPI



CERTIFICATE OF PUBLICATION



Certificate of publication for the article titled:

Aspergillus flavus and Total Aflatoxins Occurrence in Dairy Feed and Aflatoxin M₁ in Bovine Milk in Aguascalientes, Mexico

Authored by:

Fernanda Álvarez-Días; Barenca Torres-Parga; Arturo Gerardo Valdivia-Flores; Teófilo Quezada-Tristán; José Isidro Alejos-De La Fuente; Joaquín Sosa-Ramírez; Erika Janet Rangel-Muñoz

Published in:

Toxins 2022, Volume 14, Issue 5, 292



Academic Open Access Publishing

Basel, April 2022



AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Ciencias Básicas, por darme la oportunidad de cursar el Doctorado en Ciencias Biológicas. Al Centro de Ciencias Agropecuarias por facilitarme el acceso a sus instalaciones y el uso de laboratorios y equipos. A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el apoyo financiero para la realización de esta investigación a través del proyecto institucional denominado “Control de micotoxinas en ración total mezclada de vacas lecheras con base en información climática” con clave PIP/SA22-2. Al CONAHCYT por la asignación de la beca de posgrado 2021-000018-02NACF-24198. Al Ministerio de Educación de Argentina y al Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (Idlcal) INTA-CONICET por todo el apoyo proporcionado para la realización de la estancia doctoral “Identificación de factores de riesgo y evaluación del riesgo por micotoxinas en la cadena productiva láctea de bovinos” .

A los Doctores: Arturo Valdivia Flores, Joaquín Sosa Ramírez, José Isidro Alejos De La Fuente y Marcelo Signorini por su invaluable apoyo y acertada guía. A la Dra. Lizbeth Martínez Martínez, por su labor técnica en laboratorio y a las Maestras, María Magdalena Soto y Paulina Silva Serna, al Maestro Héctor Hugo Esquivel Reyes e Ing. Eustaquio Briano Ramos por su apoyo y acompañamiento durante la fase de campo.

A los Doctores Alfonso Peña Ramos y Omar Iván Santana del INIFAP Campo Experimental Pabellón por facilitarnos el acceso a sus instalaciones y permitirnos el uso de sus equipos para la preparación de muestras.

A los amigos de siempre, Ivonne, Pahola, Keny, Magdalena, Liz, Barenca, Jhony y Raúl que fueron soporte fundamental durante el posgrado. A Tade, por ser el faro al final del proceso. A los nuevos amigos Chelo, Vicky, Ana, Ceci, Joaquín, Guille, Mati, Wanda, Cami, Diego y Anita que llegaron a mi vida para expandir mis horizontes y enseñarme otra forma de desarrollar la Ciencia desde el humanismo, el compañerismo y el trabajo colectivo.

A mi abuelita, Ma de Jesús, por sus oraciones. A mis tíos, hermanos, sobrinos y familia por brindarme ánimos y por sus buenos deseos.

DEDICATORIAS

A mis padres por su amor incondicional, por la fortaleza y soporte brindados en cada etapa de mi vida, por enseñarme que mi imaginación es el límite cuando se trata de soñar.

A mi hijo, Miguel Alejandro, mi centro de fuerza e inspiración, el hombre que alegra mis días con sus preguntas, mi gran amor. La razón para levantarme cada día para esforzarme por el hoy y el mañana, mi principal motivación. Te amo hijo.

A Dios, por brindarme sabiduría y fortaleza para sortear las adversidades y obstáculos que se presentan en la vida



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE CUADROS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ACRÓNIMOS	10
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	14
1. ESTRUCTURA DE LA TESIS	16
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	19
2.2.2.1. Objetivo 1.	19
2.2.2.2. Objetivo 2.	19
2.2.2.3. Objetivo 3.	19
2.2.2.4. Objetivo 4.	19
2.2.2.5. Objetivo 5.	19
2.3. JUSTIFICACIÓN	19
3. MARCO TEÓRICO	22
3.1. GANADERÍA LECHERA	22
3.1.1. Importancia económica y social de la leche	22
3.1.1.1. Aporte nutrimental de la leche.....	22
3.1.2. Producción de leche.....	22
3.1.2.1. Producción mundial.	22
3.1.2.2. Producción y demanda nacionales de leche.	23
3.1.2.3. Producción estatal.	26
3.2. SISTEMA DE PRODUCCIÓN LECHERO EN AGUASCALIENTES	26

3.3. CONTAMINACIÓN DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS.....	27
3.3.1. Géneros fúngicos y micotoxinas de mayor importancia en la producción agropecuaria.....	27
3.3.2. Situación Actual de la contaminación de productos agrícolas	28
3.3.2.1. Mundial	28
3.3.2.2. Nacional.....	35
3.3.2.3. Estatal.....	37
3.4. HONGOS TOXIGÉNICOS DE INTERÉS PECUARIO	38
3.4.1. Clasificación taxonómica.....	38
3.4.2. Características morfológicas	40
3.4.2.1. Características macroscópicas.	42
3.4.2.2. Características microscópicas.....	44
3.4.3. Condiciones óptimas de crecimiento de los principales hongos toxigénicos	46
3.4.4. Condiciones óptimas de producción de micotoxinas	47
3.4.5. Características biológicas	47
3.4.5.1. Ciclo biológico de los hongos.....	47
3.4.5.2. Biosíntesis de micotoxinas.....	52
3.4.6. Mecanismos de contaminación	57
3.5. PRINCIPALES MICOTOXINAS DE INTERÉS PECUARIO	58
3.5.1. Toxicocinética	61
3.5.2. Metabolismo de micotoxinas en el rumen	69
3.6. MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICOTOXINAS	70
3.6.1. Extracción de micotoxinas.....	70
3.6.2. Técnica de ELISA	71
3.6.3. Técnica TLC.....	71
3.6.4. Técnica HPLC.....	71
3.7. EFECTOS SANITARIOS Y PRODUCTIVOS DE LAS MICOTOXINAS	72
3.7.1. Impacto en la salud humana	72
3.7.2. Impacto en la salud animal y producción.....	74
3.7.3. Impacto económico	75

3.8.	REGULACIÓN LEGISLATIVA DE MICOTOXINAS	75
3.9.	CLIMA.....	76
3.9.1.	Condiciones climáticas en Aguascalientes.....	76
3.9.2.	Influencia ambiental en el crecimiento de hongos toxigénicos y producción de micotoxinas.....	77
3.9.3.	Efecto de cambio climático en el fenómeno de contaminación por micotoxinas	77
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	80
4.1.	DISEÑO METODOLÓGICO	80
4.2.	POBLACIÓN BAJO ESTUDIO	80
4.2.1.	Ubicación espacio temporal	80
4.2.2.	Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	81
4.2.3.	Métodos de muestreo	81
4.3.	TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y PRUEBAS DE LABORATORIO	81
4.3.1.	Recolección de muestras.....	81
4.3.1.1.	Recolección de muestras de RTM.....	82
4.3.1.2.	Manejo de muestras de RTM.....	82
4.3.1.3.	Recolección de muestras de leche	82
4.3.2.	Aislamiento, identificación y cuantificación de colonias fúngicas.....	82
4.3.2.1.	Técnica de vaciado en placa por diluciones seriadas.....	82
4.3.2.2.	Preparaciones con azul de algodón-lactofenol.....	83
4.3.2.3.	Cuantificación de UFC fúngicas	83
4.3.3.	Cuantificación de aflatoxinas en muestras de RTM por ELISA.....	83
4.3.4.	Cuantificación de AFM ₁ en muestras de leche cruda por ELISA	83
4.3.5.	Caracterización toxicológica de aislados micotoxigénicos.....	83
4.3.5.1.	Capacidad aflatoxigénica de aislados con morfología <i>Aspergillus flavus</i> mediante vapores de hidróxido de amonio.	83
4.3.5.2.	Cuantificación de micotoxinas en aislados con morfología de especies micotoxigénicas.....	84
4.4.	DISEÑO ESTADÍSTICO.....	84

4.4.1. Variables y escalas de medición	84
4.4.2. Proceso de captación de la información.....	84
4.4.3. Análisis estadístico.....	84
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	85
5.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS UNIDADES DE ESTUDIO.....	85
5.1.1. Caracterización climática	85
5.1.1.1. Estatal.....	85
5.1.1.2. Unidades de estudio.	85
5.2. CUANTIFICACIÓN DE AF EN RTM.....	86
5.3. CUANTIFICACIÓN DE AFM ₁ EN LECHE.....	86
5.4. ASOCIACIÓN DE FACTORES CON LA CONTAMINACIÓN DE LA RTM POR AF.....	86
5.4.1. Factores climáticos	86
5.4.1.1. Asociación de la estación del año con la concentración de AF en RTM.	86
5.4.1.2. Asociación de la temperatura media mensual con la concentración de AF en RTM.	87
5.4.2. Factores zootécnicos	88
5.4.2.1. Composición de la RTM por tipo de pienso.....	88
5.4.2.2. Inclusión de ingredientes en la RTM.	89
5.4.2.3. Marca de núcleo o concentrado proteínico incluido en la RTM.	89
5.4.3. Factores agronómicos.....	90
5.4.3.1. Empresa proveedora de semilla de maíz con el que se elabora el ensilado	90
5.5. ASOCIACIÓN DE FACTORES CON LA CONTAMINACIÓN DE LECHE CRUDA POR AFM ₁	90
5.5.1. Factores climáticos	90
5.5.1.1. Asociación de la estación del año de recolección de muestras de leche cruda con la concentración de AFM ₁	90
5.5.1.2. Asociación de la precipitación pluvial mensual con la concentración de AFM ₁ en leche cruda.	91

5.5.1.3. Asociación de la amplitud térmica con la concentración de AFM ₁ en leche cruda.	92
5.5.2. Factores zootécnicos	92
5.5.2.1. Asociación del tipo de ingrediente presente en la RTM con la concentración de AFM ₁ en leche cruda	92
5.5.2.2. Asociación de la marca de concentrado y/o núcleo proteínico con la concentración de AFM ₁ en leche cruda.	93
5.5.3. Factores agronómicos.....	93
5.5.3.1. Empresa proveedora de semilla de maíz con el que se elabora el ensilado	93
5.6. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS CON MORFOLOGÍA <i>Aspergillus flavus</i>	94
5.6.1. Frecuencia de géneros fúngicos y colonias con morfología <i>Aspergillus flavus</i> .	94
5.6.2. Cuantificación de colonias fúngicas totales y de colonias con morfología <i>Aspergillus flavus</i>	95
5.6.3. Capacidad aflatoxigénica de aislados con morfología <i>Aspergillus flavus</i> mediante vapores de hidróxido de amonio.	97
5.6.4. Caracterización aflatoxigénica de aislados con morfología <i>Aspergillus flavus</i> mediante técnica de ELISA.....	98
6. CONCLUSIONES.....	100
GLOSARIO	101
BIBLIOGRAFÍA	107
ANEXOS	128

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Demanda estimada de leche de acuerdo con el consumo recomendado para cada segmento de edad y la población de México en 2020.....	23
Cuadro 2. Producción y productividad por escalas de UPL del ACM.....	27
Cuadro 3. Principales especies productoras de micotoxinas en la producción agropecuaria y principales cultivos que contaminan.	28
Cuadro 4. Evidencia de la contaminación de micotoxinas en ingredientes y piensos para ganado lechero a nivel mundial.....	29
Cuadro 5. Evidencia de la contaminación de micotoxinas en ingredientes y piensos para ganado lechero a nivel nacional.....	35
Cuadro 6. Evidencia de la contaminación de micotoxinas en ingredientes y piensos para ganado lechero en el estado de Aguascalientes.	38
Cuadro 7. Clasificación taxonómica de las principales especies micotoxigénicas del género <i>Aspergillus</i>	39
Cuadro 8. Clasificación taxonómica de las principales especies micotoxigénicas del género <i>Fusarium</i>	39
Cuadro 9. Clasificación taxonómica de la principal especie micotoxigénica del género <i>Penicillium</i>	40
Cuadro 10. Condiciones de crecimiento de las principales especies de hongos micotoxigénicas.....	46
Cuadro 11. Condiciones óptimas de producción de micotoxinas de los géneros micotoxigénicos de mayor importancia agropecuaria	47
Cuadro 12. Efectos fisiológicos y productivos de las micotoxinas en las vacas lecheras.	74
Cuadro 13. Límites de micotoxinas en piensos para ganado lechero	76
Cuadro 14. Datos promedio por estación del año de temperatura y precipitación en las UPL del estudio.....	86
Cuadro 15. Cuantificación de AF ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en muestras de RTM recolectadas en las estaciones del año	87
Cuadro 16. Concentración de AF ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en muestras de RTM en relación con la temperatura media mensual.....	88

Cuadro 17. Asociación de la inclusión de los tipos de ingrediente con la concentración de AF en la RTM. 88

Cuadro 18. Asociación de la inclusión de diferentes ingredientes con la concentración de AF en la RTM. 89

Cuadro 19. Asociación de la marca de concentrado y/o núcleo proteínico con la concentración de AF en la RTM. 89

Cuadro 20. Asociación de la empresa proveedora de semilla de maíz con la concentración de AF en la RTM. 90

Cuadro 21. Cuantificación de AFM₁ (ng kg⁻¹) en muestras de leche cruda recolectadas en las estaciones del año. 91

Cuadro 22. Asociación de la concentración de AFM₁ (ng kg⁻¹) en muestras de leche cruda con la variación de la precipitación mensual. 91

Cuadro 23. Asociación de la concentración de AFM₁ (ng kg⁻¹) en muestras de leche cruda con la variación de amplitud térmica mensual. 92

Cuadro 24. Asociación de la inclusión de los tipos de ingrediente en la RTM con la concentración de AFM₁ en leche cruda. 92

Cuadro 25. Concentración de AFM₁ (ng kg⁻¹) en muestras de leche cruda de acuerdo con la marca de concentrado y/o núcleo proteínico consumido por las vacas lecheras. 93

Cuadro 26. Asociación de la empresa proveedora de semilla de maíz con que se elabora el ensilado con la concentración de AFM₁ en la leche cruda. 94

Cuadro 27. Proporción de aislados compatibles con la morfología *Aspergillus flavus* de acuerdo con su capacidad aflatoxigénica y producción de AF (µg/kg) cuantificada mediante prueba de ELISA. 98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales países productores de leche en 2019. Elaboración propia a partir de (SIAP, 2021b).....	23
Figura 2. Evolución histórica de la producción y demanda de leche de bovino en México. Elaboración propia a partir de CONAPO (2021); Institute of Medicine National Academies (2019); OMS/FAO (2012); SIAP (2021).....	24
Figura 3. Principales estados productores de leche (2011-2020).	25
Figura 4. Principales estados productores de leche en relación con la superficie territorial (2011-2020). Elaboración propia a partir de SIAP (2021).....	25
Figura 5. Evolución histórica (1980-2020) de la producción de leche en el estado de Aguascalientes. Elaboración propia a partir de SIAP (2021a).....	26
Figura 6. Morfología típica de conidióforo de <i>Aspergillus</i> (Pildain, 2006).....	40
Figura 7. Morfología de esporoquio y esporas <i>Fusarium</i>	41
Figura 8. Morfología típica del conidióforo de <i>Penicillium</i>	42
Figura 9. Patrones de ramificación de conidióforos <i>Penicillium</i> spp.....	42
Figura 10. Ciclo biológico de <i>Aspergillus</i> spp. Adaptado de (Akar, Avci, y Dusunceli, 2004).....	48
Figura 11. Ciclo biológico de <i>Fusarium</i> spp.....	50
Figura 12. Ciclo biológico de <i>Penicillium</i> spp. Adaptado de (Akar, Avci, y Dusunceli, 2004).....	51
Figura 13. Ruta biosintética de aflatoxinas.....	53
Figura 14. Ruta biosintética de zearalenona.....	54
Figura 15. Ruta biosintética de deoxinivalenol.....	55
Figura 16. Ruta biosintética de fumonisinas.....	56
Figura 17. Ruta biosintética de ocratoxinas.....	57
Figura 18. Rutas de entrada de los hongos a la planta de maíz (de la Torre <i>et al.</i> , 2013). A. Infección sistémica de plántulas. B. Infección a través del estigma. 3. Infección a través de heridas.	58
Figura 19. Estructura química de las aflatoxinas (Pildain, 2006).....	59
Figura 20. Estructura química de zearalenona (Marin <i>et al.</i> , 2010).....	59
Figura 21. Estructura química de las fumonisinas.....	60
Figura 22. Estructura química de las ocratoxinas (Domijan y Peraica, 2010).....	60

Figura 23. Estructura química del deoxinivalenol 61

Figura 24. Principales biotransformaciones y efectos celulares adversos de las micotoxinas (Tran *et al.*, 2020). CYP450: Citocromo P450; UGT: uridina 5'-difosfoglucuronosiltransferasa; GST: glutatión S-transferasa; ROS: Especies reactivas de oxígeno. 61

Figura 25. Vía metabólica de la AFB₁. (Deng *et al.*, 2018)..... 64

Figura 26. Vía metabólica de zearalenona (Rogowska *et al.*, 2019) 65

Figura 27. Vía metabólica de la fumonisina B1 (Dellaflora *et al.*, 2018; Harrer *et al.*, 2013). 66

Figura 28. Vía metabólica del deoxinivalenol (Q.-H. Wu *et al.*, 2014) 67

Figura 29. Vía metabólica de Ocratoxina (Kőszegi y Poór, 2016)..... 69

Figura 30. Temperatura promedio por año (NOOA, 2021)..... 78

Figura 31. Localización UPL de estudio 81

Figura 32. Climograma estatal (mayo 2021-abril 2022) 85

Figura 33. Géneros de colonias fúngicas identificadas por sus características morfológicas obtenidas de muestras de RTM..... 95

Figura 34. 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)..... 96

Figura 35. Cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC/g de muestra) compatibles con morfología *Aspergillus flavus* de acuerdo con su capacidad aflatoxigénica. 96

Figura 36. Viraje de color del reverso de cepas de *A. flavus* en agar-coco al contacto con vapores de hidróxido de amonio..... 97

Figura 37. Curva de estándar para aflatoxinas totales cuantificadas con ELISA 146

Figura 38. Curva de estándar para AFM₁ cuantificadas con ELISA..... 148

Figura 39. Diagrama de Gant con la programación de actividades del proyecto 152

ACRÓNIMOS

Abs	Absorbancia	L	Litro
AFB₂	Aflatoxina B ₂	mg	Miligramo
AFB_{2α}	Derivatizada de AFB ₁	min	Minuto
AFBO	8,9-epóxido-AFB ₁	mL	Mililitro
AFG₁	Aflatoxina G ₁	mm	Milímetro
AFM₁	Aflatoxina M ₁	mV	Milivolt
AFM₂	Aflatoxina M ₂	n	Número de observaciones
AFP₁	Aflatoxina P ₁	N	Solución Normal
ALT	Alanina aminotransferasa	Nd	Dato no disponible
ANDEVA	Análisis de varianza	ng	Nanogramo
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analistas	nm	Nanómetro
ARN	Ácido ribonucleico	NOM	Norma Oficial Mexicana
AST	Aspartato aminotransferasa	°C	Grados Celsius
CCl₄	Tetracloruro de carbono	P	Probabilidad de "F" en ANDEVA
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno	p/v	Peso sobre volumen
cm	Centímetro	PAS	Ácido peryódico de Schiff
CYP₄₅₀	Citocromo P ₄₅₀	pc	Peso corporal
d	Días	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
dL	Decilitro	pH	Potencial de Hidrógeno
E.E.	Error estándar	psig	Libras por pulgada cuadrada
EDTA	Etilendiamino tetra acetato	rpm	Revoluciones por minuto
EFSA	European Food Safety Authority	s	Segundo
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas	SAS	Statistical Analysis System
et al.,	Y colaboradores	sem	Semana
FA	Fosfatasa alcalina	SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
FAO	Food and Agriculture Organization	SPE	Extracción en fase sólida
g	Gramos	SSA	Secretaría de Salud
g	Gravedades	t^{1/2}	Tiempo de vida media

GLM	Modelo linear general	TLC	Cromatografía en capa fina
GSH	Glutación reducido	TRIS	Tris(hidroximetil) aminometano
h	Hora	U/L	Unidades por litro
H/E	Hematoxilina y eosina	µg	Microgramo
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión	µL	Microlitro
HSCAS	Aluminosilicato hidratado de calcio sódico	µmol	Micromol
kg	Kilogramo		



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. El crecimiento de los hongos y la producción de micotoxinas en está determinado por condiciones ambientales como temperatura y humedad, así como por características de manejo, transporte y almacenamiento de los productos agrícolas. Existe información sobre la contaminación por aflatoxinas en la cadena de producción de leche de bovinos del estado, pero se desconoce la influencia de factores que tiene relación con ella. Por lo que el objetivo del estudio fue evaluar la influencia de factores climáticos, agronómicos y zootécnicos con la contaminación por hongos toxigénicos y micotoxinas de raciones para vacas lecheras en unidades de producción lechera (UPL) del estado de Aguascalientes. Se realizaron muestreos mensuales durante un año en 10 UPL para recolectar muestras de ración total mezclada (RTM) y leche cruda; se aplicó un instrumento de recolección de datos a los encargados para obtener información zootécnica y agronómica de las UPL. Se monitorearon las condiciones meteorológicas. Se aislaron, identificaron y cuantificaron colonias aflatoxigénicas presentes en las muestras de RTM, se caracterizó la capacidad toxigénica de los aislados; mediante técnica de ELISA. Se cuantificó la concentración de AF en las muestras de RTM y AFM₁ en leche cruda mediante técnica de ELISA. Los resultados de las variables cuantitativas se analizaron mediante análisis de varianza (ANDEVA) y pruebas de Tukey; las variables categóricas mediante modelos mixtos lineales generalizados y pruebas de chi cuadrada; se consideró un nivel de probabilidad $P < 0.05$. El análisis de los datos proporcionó información sobre la dinámica de la contaminación de aflatoxinas a lo largo del año y se identificaron las épocas con mayor problemática de contaminación para cada tipo de muestra. Se encontraron cepas aflatoxigénicas de *Aspergillus flavus*. Los resultados generados marcarán la pauta para el diseño futuro de estrategias que permitirán reducir el riesgo de exposición a las aflatoxinas por parte del ganado lechero y la población humana de la región y de esta manera, evitar los problemas de salud relacionados a la ingesta de dichos contaminantes.

Palabras clave: Producción lechera, hongos micotoxigénicos, micotoxinas, ración total mezclada, cambio climático.

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. The growth of fungi and the production of mycotoxins is determined by environmental conditions such as temperature and humidity, as well as the handling, transportation and storage characteristics of agricultural products. There is information on aflatoxin contamination in the state's bovine milk production chain, but the influence of factors related to it is unknown. Therefore, the objective of the study was to evaluate the influence of climatic, agronomic and zootechnical factors on contamination by toxigenic fungi and mycotoxins of rations for dairy cows in dairy production units (UPL) in the state of Aguascalientes. Monthly sampling was carried out for one year in 10 UPL to collect samples of total mixed ration (TMR) and raw milk; A data collection instrument was applied to those responsible for the units to obtain zootechnical and agronomic information. Their meteorological conditions were monitored. Aflatoxigenic colonies present in the RTM samples were isolated, identified and quantified, the toxigenic capacity of the isolates was characterized by ELISA technique. The concentration of FA in the RTM and AFM₁ samples in raw milk was quantified using the ELISA technique. The results of the quantitative variables were analyzed using analysis of variance (ANDEVA) and Tukey tests; categorical variables using generalized linear mixed models and chi-square tests; A probability level $P < 0.05$ was used. The analysis of the data provided information on the dynamics of aflatoxin contamination throughout the year and the times with the greatest contamination problems were identified for each type of sample. Aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* were found. The results generated will set the tone for the future design of strategies that reduce the risk of exposure to aflatoxins of dairy cattle and the human population of the region and, in this way, avoid health problems related to the ingestion of these contaminants.

Keywords: Dairy production, mycotoxigenic fungi, mycotoxins, total mixed ration, climate change.

INTRODUCCIÓN

La contaminación de piensos por hongos toxigénicos y micotoxinas representa una amenaza para la salud pública. Las micotoxinas son metabolitos secundarios sintetizados por más de un centenar de hongos y producen efectos tóxicos o patologías tanto en seres humanos como en animales (Kebede *et al.*, 2020). La mayoría de los productos agrícolas destinados a la alimentación de las vacas lecheras son susceptibles a la contaminación por hongos y micotoxinas durante las distintas fases de su cultivo, secado, almacenamiento y/o transporte (Magnoli *et al.*, 2019). (Greco *et al.*, 2014). En la actualidad han sido identificadas cerca de 400 micotoxinas, sin embargo, las catalogadas como de mayor preocupación debido a su impacto son las aflatoxinas, (Chi y Broomhead, 2009; Fink-Gremmels, 2008). 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). Las aflatoxinas son sintetizadas principalmente por *Aspergillus flavus*, que 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) Cuando las aflatoxinas se integran a la cadena alimentaria, afectan el propósito de la industria agropecuaria que es obtener productos finalizados de buena calidad nutricional e inocuos para el consumidor.

A nivel mundial, se estima que el 25% de la producción agrícola y cerca del 40% de los cereales, presentan contaminación por micotoxinas (FAO, 2003; Pittet, 1998). En estudios de diversos países se ha encontrado evidencia de contaminación por hongos toxigénicos y micotoxinas en raciones para vacas lecheras. En México, la incidencia natural de micotoxinas en alimentos de uso pecuario se estimó en 57%. La contaminación de AF en maíz se ha estimado en 90% (Flores-Ortiz *et al.*, 2006). En investigaciones realizadas en el país se ha encontrado presencia de micotoxinas y hongos toxigénicos en alimentos destinados a la alimentación animal. En Aguascalientes, existentes algunos estudios sobre la investigación de las aflatoxinas; por ellos se sabe que es común la presencia de cepas toxigénicas de *Aspergillus* y aflatoxinas en las dietas de vacas lecheras (Valdivia *et al.*, 2015). Los hongos toxigénicos como *Aspergillus flavus* responden especialmente a las condiciones de actividad de agua y de temperatura ambiental (0.96-0.98 aw, 28-30°C) para desarrollar las rutas de biosíntesis de aflatoxinas; estas condiciones se cumplen

especialmente en las temporadas de lluvia del estado (Assunção *et al.*, 2018). El estudio de la influencia ambiental en la contaminación por hongos *Aspergillus* y aflatoxinas resulta de especial importancia ante un escenario global de cambio climático, se prevé un cambio en el patrón de aparición de los hongos y micotoxinas debido a la variabilidad climática y los fenómenos meteorológicos extremos (OMS, 2019).

A pesar de que el tema se ha estudiado ampliamente a nivel mundial y en menor medida en nuestro país, en Aguascalientes las investigaciones concernientes a la contaminación por aflatoxinas y al análisis de factores climáticos, agronómicos y zootécnicos que influyen en ella son escasas. Por ello se recolectarán muestras mensuales de ración total mezclada (RTM) en diez unidades de producción lechera del estado de Aguascalientes. También se hará un monitoreo de las condiciones meteorológicas a lo largo de un año cuya información se obtendrá de la red de estaciones agroclimáticas del INIFAP y se aplicarán instrumentos de recolección de datos para obtener información zootécnica y agronómica. Se espera encontrar influencia de los factores mencionados en la contaminación por hongos *Aspergillus* toxigénicos y aflatoxinas en las raciones destinadas a la alimentación animal. La información que se genere permitirá conocer la influencia en el fenómeno de contaminación, así como el panorama de contaminación por hongos *Aspergillus* y aflatoxinas lo que marcará la pauta para el diseño de estrategias y medidas que permitan prevenir o reducir la exposición dietaria por parte del ganado lechero y la población humana de la región a fin de evitar los problemas de salud que se relacionan a la ingesta de dichos contaminantes.

1. ESTRUCTURA DE LA TESIS

La estructura de esta tesis se organiza de acuerdo con los lineamientos y procedimientos institucionales vigentes¹ establecidos para la elaboración de 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 las hipótesis, las preguntas de investigación 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 y discusión, se presenta una caracterización de los resultados obtenidos y la contrastación con diversas investigaciones comparables y se intenta expresar una reflexión acerca del significado potencial de los hallazgos probables de este estudio.

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

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 serán aplicadas para la obtención de la información.

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.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La contaminación por micotoxinas es un tema que se remonta a la antigüedad. Existen registros de micotoxicosis desde la Edad Media. En Europa se documentó el caso de un cuadro clínico denominado como el “fuego del infierno” o “fuego de San Antonio”, en el que se presentaban alucinaciones, psicosis, delirios, convulsiones, sensación de quemazón y necrosis distal. El ergotismo era causado por la ingesta de productos elaborados con centeno contaminado con alcaloides producidos por *Claviceps purpurea* (Ramos-Girona *et al.*, 2020).

En la década de 1960, se registró en Reino Unido la muerte de más de 100,000 ejemplares de pavos por una enfermedad de origen desconocido, que se nombró “la enfermedad X de los pavos. Luego de realizar investigaciones, se llegó a la conclusión de que la muerte de las aves fue causada por la intoxicación con metabolitos secundarios sintetizados por *Aspergillus flavus*, que se denominaron aflatoxinas. La fuente de contaminación fue cacahuete procedente de Brasil que se utilizó para la preparación de los piensos de los pavos (Toso *et al.*, 2018). Dicho acontecimiento, dio paso al nacimiento de la toxicología moderna, desde entonces, la contaminación por hongos toxigénicos y micotoxinas ha sido un tema estudiado ampliamente. Para 1980, existían cerca de 7,000 estudios relacionados a la investigación de micotoxinas y para el año 2000 existían 34,000 estudios. En la actualidad, se ha estimado la existencia de 252,000 estudios científicos acerca del tema, de los cuales cerca de 20,000 se relacionan con la producción lechera (Google Academic, 2021). En México los estudios sobre micotoxinas son alrededor de 2,000 y los relacionados con la producción agropecuaria no sobrepasan 50 (Microsoft Academic, 2021).

Por otra parte, la colonización de los piensos por hongos toxigénicos y la subsecuente producción de micotoxinas, está determinada por condiciones ambientales, principalmente de temperatura, humedad y acidez, lo que supone un riesgo ante los escenarios globales fluctuantes provocados por el cambio climático (Medina *et al.*, 2017). Se pronóstica un cambio en los patrones de aparición de micotoxinas, las zonas sujetas a contaminación cambiarán y regiones que en la actualidad presentan baja incidencia serán propensas a la aparición de hongos y producción de micotoxinas (Assunção *et al.*, 2018).

Conocer y comprender el fenómeno de contaminación es indispensable ante los escenarios catastróficos que se vislumbran como consecuencia del cambio climático (OMS, 2019). El estudio del impacto del cambio climático y la influencia ambiental en el fenómeno de contaminación por hongos toxigénicos y micotoxinas en los productos agropecuarios, ha tomado auge por todo el mundo. En la actualidad existen 8,000 estudios relacionados a dicha temática a nivel mundial. Sin embargo, a nivel nacional los estudios sobre la influencia ambiental son escasos, son menos de 15 estudios los que consideran factores ambientales. En el estado sólo 3 estudios consideran algún tipo de variable climatológica.

En Aguascalientes y en el Altiplano Central Mexicano la producción lechera es una de las actividades económicas más importantes para la población (Romo-Bacco *et al.*, 2015). En la región, la mayoría de las empresas lecheras basan su funcionamiento en la alimentación con ensilaje de maíz, el cual es especialmente susceptible a la contaminación por micotoxinas (Magnoli *et al.*, 2019). También existe un flujo importante de ingredientes para la formulación de las raciones entre los estados que conforman el Altiplano Central Mexicano. Por estudios previos se conoce que en el estado y en la región del ACM es frecuente la presencia de cepas toxigénicas de *Aspergillus*, así como la contaminación de aflatoxinas y zearalenona en las raciones de vacas.

En síntesis, cada uno de los estudios señalados en el marco teórico de este protocolo, aporta elementos para la realización del estudio en el contexto del Sistema Agroalimentario Mexicano y Estatal.

2.1. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Existe influencia de factores climáticos, agronómicos y zootécnicos en la contaminación por hongos toxigénicos y aflatoxinas de las raciones destinadas a la alimentación de vacas lecheras y de leche cruda en el estado de Aguascalientes.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo general

Evaluar la influencia climática, agronómica y zootécnica en la contaminación fúngica y por aflatoxinas en las raciones destinadas a la alimentación de vacas lecheras y en leche cruda en unidades de producción lechera del estado de Aguascalientes.

2.2.2. Objetivos específicos

2.2.2.1. Objetivo 1. Recolectar muestras mensuales de ración total mezclada, leche cruda e información agronómica y zootécnica en unidades de producción lechera del estado de Aguascalientes.

2.2.2.2. Objetivo 2. Recolectar y analizar datos meteorológicos (temperatura, humedad relativa, precipitación, etc.) de la red de estaciones agrometeorológicas del INIFAP/CONAGUA durante la fase de recolección de muestras de alimento y leche cruda.

2.2.2.3. Objetivo 3. Cuantificar la concentración de aflatoxinas en las muestras de ración total mezclada (AF) y leche cruda (AFM₁)

2.2.2.4. Objetivo 4. Aislar e identificar morfológica y toxicológicamente las colonias toxigénicas de hongos *Aspergillus flavus* presentes en RTM

2.2.2.5. Objetivo 5. Cuantificar y analizar mediante pruebas estadísticas, descriptivas e inferenciales, la asociación de factores climáticos, agronómicos y zootécnicos con la contaminación de la dieta y la leche cruda por aflatoxinas.

2.3. JUSTIFICACIÓN

La leche de vaca es un alimento de la canasta básica debido a su alto aporte de nutrientes de calidad y su bajo costo. Su consumo se recomienda especialmente en infantes y adultos mayores (Fernández *et al.*, 2015). Sin embargo, históricamente, en México no se ha producido el volumen necesario de leche para satisfacer la demanda de la población. El consumo per cápita en 2020 fue de 300 mL, por debajo del recomendado por la FAO, que es de 500 mL al día (OMS/FAO, 2012). La demanda estimada de leche para el año 2020 fue de alrededor de 30.2 millones de toneladas, de las cuales sólo se produjo el 41.6.% (SIAP, 2021). En el periodo de 2009 a 2018, México fue el primer importador de leche descremada en polvo del mundo y el tercero en importaciones de leche en polvo, con un promedio anual de 239 y 251 miles de toneladas, respectivamente (SIAP, 2018).

En las últimas décadas, el sector agropecuario, en su conjunto, ha servido más como soporte para la industria láctea que para la satisfacción de la demanda de leche de la población, debido a una política comercial orientada a la importación de productos lácteos debido a su bajo costo como materia prima (Cesín-Vargas *et al.*, 2014). De igual forma, en

México los apoyos gubernamentales brindados a los productores no han sido suficientes para alcanzar la productividad técnica esperada de los hatos (Hernández *et al.* 2021).

Por otra parte, en el país, son escasos y dispersos los estudios sobre la contaminación por hongos *Aspergillus* toxigénicos y aflatoxinas en las raciones destinadas a la alimentación de las vacas lecheras, así como de la contaminación por aflatoxinas de la leche misma, a pesar de que existen evidencias de que el consumo crónico de aflatoxinas afecta la salud animal y humana. La ingesta aguda o crónica de dichos contaminantes, puede causar carcinogénesis, teratogénesis, inmunosupresión, cuadros clínicos de neurotoxicidad, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, mielotoxicidad, toxicidad pulmonar y endocrina, lo que lo convierte en un problema de salud pública (Hope, 2013; Iqbal *et al.*, 2015). Las aflatoxinas disminuyen la productividad de las vacas lecheras incluso en pequeñas concentraciones, afectando la rentabilidad económica de las unidades de producción.

Por otro lado, el cambio climático también representa un riesgo para la inocuidad de los alimentos y la salud pública (Assunção *et al.*, 2018). La colonización de hongos toxigénicos y la producción subsecuente de micotoxinas, está determinada por condiciones ambientales, principalmente de temperatura y humedad, lo que supone un riesgo ante los escenarios globales fluctuantes provocados por el cambio climático (Medina *et al.*, 2017). En México a partir de la década de 1960, se han registrado cambios climáticos, como el aumento de en la temperatura promedio disminución de los días frescos y aumento de las noches cálidas. Se pronostica que la temperatura seguirá en aumento en los años futuros. también se estima que las precipitaciones disminuirán en la mayoría del territorio nacional, la mayor parte del país se volverá más seca y las sequías serán más frecuentes (Cavazos *et al.*, 2013; INECC, 2013). Con el calentamiento global se espera un cambio en los patrones de aparición de los hongos y sus metabolitos, por lo que las zonas sujetas a contaminación incrementarán y las regiones que en la actualidad presentan baja incidencia serán propensas a mayor contaminación debido a las condiciones meteorológicas extremas (OMS, 2019).

En cuanto a la actividad agrícola, se espera que el cultivo de maíz disminuya su producción en las próximas décadas y que la situación se agrave para finales del siglo (INECC, 2013). Se estima, que por cada grado que aumente la temperatura media mundial el rendimiento agrícola se reducirá un 6%. Esta disminución de la disponibilidad de alimentos puede dar lugar a la cosecha prematura de los cultivos con un nivel de humedad

superior al recomendado (12%-14%) para evitar la contaminación por hongos y metabolitos durante el transporte y almacenamiento. De igual forma, favorecerá la venta y consumo de cosechas contaminadas por micotoxinas, lo que representa un mayor riesgo para la salud pública, particularmente en países de bajos ingresos (OMS, 2019)

Actualmente, los escasos estudios sobre micotoxinas en el país se enfocan principalmente en la investigación de las aflatoxinas, debido a que son consideradas como más peligrosas por el IARC (2002) debido a su potencial carcinogénico, no son las únicas micotoxinas de importancia para salud animal y humana (Fink-Gremmels, 2008). De igual forma, la información en México sobre las condiciones ambientales, agronómicas y zootécnicas que influyen en la contaminación, es escasa.

Este estudio, permitirá identificar los factores agronómicos, zootécnicos y climáticos que se asocian con la contaminación por hongos *Aspergillus* aflatoxigénicos y aflatoxinas en las raciones destinadas a la alimentación de vacas lecheras y en leche cruda, en el estado de Aguascalientes. Los resultados que se obtengan marcarán la pauta para diseñar estrategias y tomar las medidas preventivas necesarias en el sistema de producción lechero estatal y regional para reducir la exposición dietaria de micotoxinas tanto del ganado lechero, como de la población humana a fin de evitar problemas de salud.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. GANADERÍA LECHERA

3.1.1. Importancia económica y social de la leche

La leche es uno de los productos más importantes y de mayor producción a nivel mundial, representa una fuente de ingresos para 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 de la leche. La leche de vaca forma parte de la alimentación básica de los seres humanos en todas las etapas de la vida, especialmente, en infantes y adultos mayores. De acuerdo con la NOM-243-SSA1-2010, se denomina leche a la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas o de cualquier otra especie animal, excluido el calostro (DOF, 2010). La leche de vaca es un producto completo y equilibrado, proporciona un alto contenido de nutrientes en relación con su contenido calórico. Contiene una gran cantidad de macronutrientes de gran biodisponibilidad, accesibles y a bajo costo: aporta proteínas de alto valor biológico y es una buena fuente de calcio, fósforo, magnesio, zinc y selenio, así como de vitaminas liposolubles A, D y E vitamina C y vitaminas del complejo B (tiamina y riboflavina). Ayuda a prevenir ciertos padecimientos, como: enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial y patologías óseas y dentales (Fernández *et al.*, 2015; Uscanga-Domínguez *et al.*, 2019).

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, Brasil, Alemania y China. México ocupó en el año 2019 el decimoséptimo lugar en producción lechera (Figura 1).

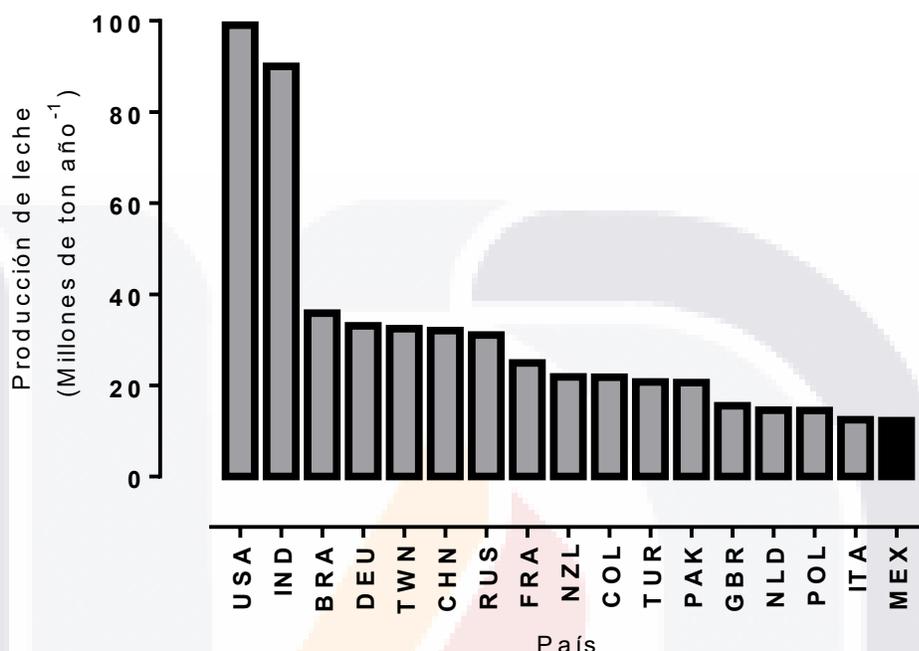


Figura 1. Principales países productores de leche en 2019. Elaboración propia a partir de (SIAP, 2021b)

3.1.2.2. Producción y demanda nacionales de leche. En el año 2020 el país registro una producción de 12.6 millones de toneladas de leche (SIAP, 2021b), sin embargo, dicha producción representa sólo el 41.6.% de la demanda estimada de leche para el año 2020 que fue de alrededor de 30.2 millones de toneladas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Demanda estimada de leche de acuerdo con el consumo recomendado para cada segmento de edad y la población de México en 2020

Edad (años)	Recomendación (mL día ⁻¹) ¹	Población (N° de habitantes) ²	Demanda (10 ⁹ L año ⁻¹)
1 a 3	400	6,059,483	0.88
4 a 8	600	10,829,944	2.37
9 a 18	800	21,853,229	6.38
19 a 50	600	59,173,715	12.96
> 51	800	26,011,290	7.60

ne	500	273,386	0.05
TOTAL		124,201,047	30.24

ne: edad no especificada

Fuente: Elaboración propia a partir de (INEGI, 2020; Institute of Medicine National Academies, 2019; OMS y FAO, 2012)

La producción nacional de leche de bovino ha presentado una tendencia creciente en los últimos 60 años (Figura 2), sin embargo, la tasa de crecimiento de esta ha sido menor a la de la demanda de leche de la población. Históricamente, en México, no se ha producido el volumen necesario de leche para satisfacer la demanda nacional, lo que ha provocado que la población ingiera menor cantidad de leche de la recomendada (500 mL/día⁻¹; OMS/FAO, 2012). En 2020, el consumo per cápita fue de solo 300 mL de leche al día. Ante el déficit histórico de producción de leche los gobiernos anteriores optaron por la importación de productos lácteos, especialmente leche en polvo. En el periodo de 2009 a 2018, México fue el primer importador de leche descremada en polvo del mundo y el tercero en importaciones de leche en polvo, con un promedio anual de 239 y 251 miles de toneladas, respectivamente (SIAP, 2018).

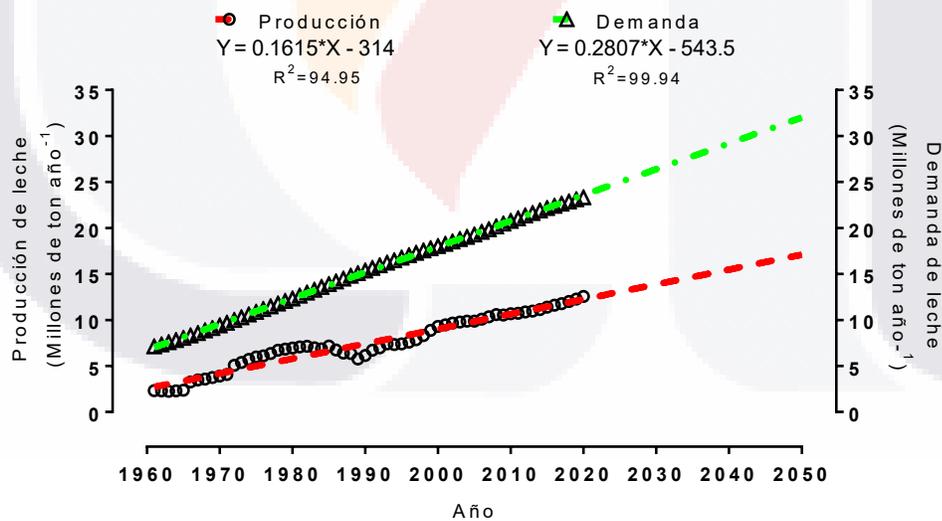


Figura 2. Evolución histórica de la producción y demanda de leche de bovino en México. Elaboración propia a partir de CONAPO (2021); Institute of Medicine National Academies (2019); OMS/FAO (2012); SIAP (2021)

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

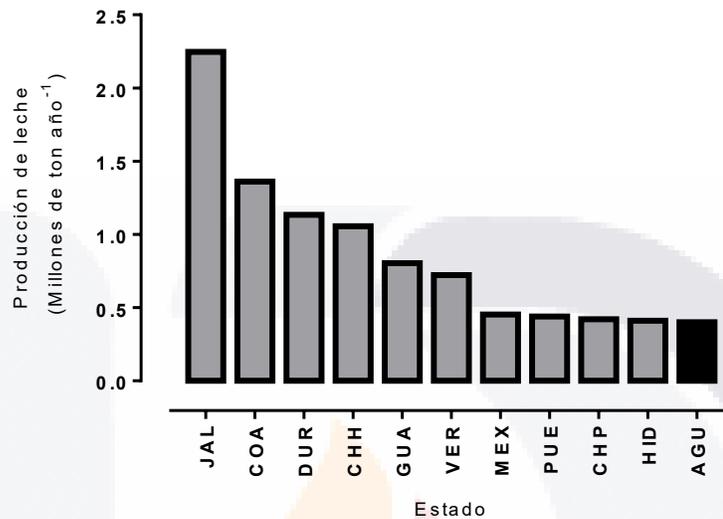


Figura 3. Principales estados productores de leche (2011-2020).
Elaboración propia a partir de (SIAP, 2021b)

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).

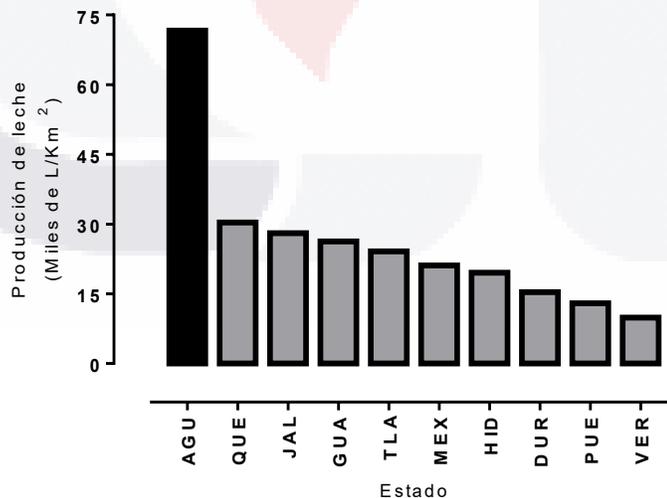


Figura 4. Principales estados productores de leche en relación con la superficie territorial (2011-2020). Elaboración propia a partir de SIAP (2021)

3.1.2.3. Producción estatal. El estado de Aguascalientes presenta una tendencia creciente de producción lechera en las últimas décadas (Figura 5). En el año 2020 se produjeron cerca de 425 miles de toneladas, volumen que representó el 3.4% de la producción nacional de leche (SIAP, 2021b). En el estado se consume el 30% de la producción, el resto es procesada o comercializada fuera de la entidad (Lozano-Santillán e Islas-Ojeda, 2009).

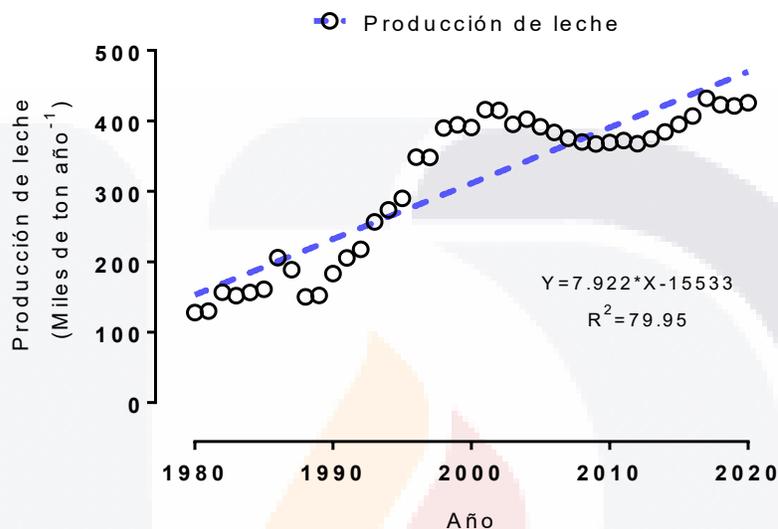


Figura 5. Evolución histórica (1980-2020) de la producción de leche en el estado de Aguascalientes. Elaboración propia a partir de SIAP (2021a)

3.2. SISTEMA DE PRODUCCIÓN LECHERO EN AGUASCALIENTES

En el 2010, SAGARPA, tenía registro de la existencia de 3155 unidades de producción lechera en el estado de Aguascalientes. En el año 2016, había un inventario en el estado de casi 100,000 vacas para producción de leche y de cerca de 25,000 vacas para doble propósito. La producción de leche de bovino es una de las actividades económicas de mayor importancia en el estado, representa cerca del 0.4.% del PIB estatal (Romo-Bacco *et al.*, 2015). 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).

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 *et al.*, 2007; Lozano-Santillán y Islas-Ojeda, 2009; Mariscal-Aguayo *et al.*, 2017; Romo-Bacco *et al.*, 2015)

El 70% de la producción estatal de forrajes es destinada para la alimentación del ganado bovino lechero (Lozano-Santillán e Islas-Ojeda, 2009). La alimentación de las vacas lecheras en los sistemas estabulados del Altiplano Central Mexicano, incluido Aguascalientes, se basa en el uso de ensilado de maíz, forrajes de corte y altas inclusiones de granos y alimentos concentrados (Camacho Vera *et al.*, 2017).

3.3. CONTAMINACIÓN DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS

El crecimiento de hongos es una de las causas más comunes de deterioro de los productos agrícolas, especialmente de los cereales; la infección por hongos no sólo reduce el valor nutritivo, sino que en determinadas condiciones ambientales se producen metabolitos secundarios que tienen efectos tóxicos en la salud animal y humana (H. K. Abbas *et al.*, 2017). Los hongos filamentosos pueden contaminar a los productos agrícolas en cualquier etapa del proceso, desde el cultivo en campo hasta el almacenamiento o transporte de las cosechas (Martínez Padrón *et al.*, 2013).

3.3.1. Géneros fúngicos y micotoxinas de mayor importancia en la producción agropecuaria

Las micotoxinas de mayor interés tanto en la producción agropecuaria como en la producción lechera son las aflatoxinas, zearalenona, deoxinivalenol, fumonisinas y ocratoxinas. Son producidas principalmente por hongos de los géneros fúngicos *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Chiotta *et al.*, 2020).

Las aflatoxinas, metabolitos secundarios de alta actividad biológica, son producidos por hongos filamentosos específicos de la sección Flavi, principalmente, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (García y Heredia, 2006). La zearalenona, micotoxina estrogénica

derivada de policétidos, es producida por algunas especies de *Fusarium*, especialmente *Fusarium graminearum* y *F. culmorum* (Marin *et al.*, 2013). De igual forma, *Fusarium graminearum* y *F. culmorum* son las principales especies asociadas a la producción de Deoxinivalenol (Martinez *et al.*, 2014). Las fumonisinas de la serie B, fumonisinas B₁, B₂, B₃ y B₄, son generalmente las fumonisinas más abundantes en granos de maíz contaminados naturalmente y en cultivos puros de *F. proliferatum* y *F. verticillioides* (Kamle *et al.*, 2019). Las principales especies fúngicas asociadas a la producción de ocratoxina son *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium verrucosum*. Las especies micotoxigénicas pueden contaminar varios sustratos, especialmente los cereales (Cuadro 3). La contaminación de los productos agropecuarios provoca efectos nocivos para la salud animal y humana, además de pérdidas económicas millonarias a los países productores y exportadores de alimentos (FAO, 2013).

Cuadro 3. Principales especies productoras de micotoxinas en la producción agropecuaria y principales cultivos que contaminan.

Micotoxina	Especie productora	Principales cultivos hospederos	Distribución geográfica
Aflatoxina	<i>Aspergillus flavus</i>	Cereales (Maíz, sorgo, trigo, centeno, cebada)	Mundial
	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Cereales (Maíz, sorgo, trigo, centeno, cebada)	Mundial
Zearalenona, Deoxinivalenol	<i>Fusarium graminearum</i>	Cebada, Maíz, Trigo	Mundial
	<i>Fusarium culmorum</i>	Cereales	Regiones templadas
Fumonisina	<i>Fusarium verticillioides</i>	Maíz	Mundial
	<i>Fusarium proliferatum</i>	Maíz. Espárragos, mango, sorgo	Mundial
Ocratoxina	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Trigo, maíz, cebada, centeno, semillas de algodón	Regiones tropicales, subtropicales
	<i>Penicillium verrucosum</i>	Trigo, maíz, cebada, centeno, avena, arroz	Regiones templadas

Fuente: elaboración propia a partir de Pittet (1998) y Tran *et al.* (2020)

3.3.2. Situación Actual de la contaminación de productos agrícolas

3.3.2.1. Mundial. La contaminación por micotoxinas en los alimentos es una preocupación a nivel mundial. La FAO (2003) estima que un cuarto de la producción agrícola mundial está contaminado por alguna o varias micotoxinas. La mayoría de los hongos toxigénicos crecen en cereales, se estima que del 25 al 40% están contaminados por micotoxinas (Pittet, 1998).

Existen evidencias de la contaminación por micotoxinas en las raciones para ganado en todo el mundo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Evidencia de la contaminación de micotoxinas en ingredientes y piensos para ganado lechero a nivel mundial

País	N	Tipo de alimento	Técnica	Media (µg/kg)	Muestras positivas (%)
Aflatoxinas (AF)					
España (Rodríguez-Blanco <i>et al.</i> , 2021)	44	Ensilado maíz	UHPLC-FLD	AFB ₁ (0.31), AFG ₁ (0.34), AFG ₂ (0.18)	AFB ₁ (6.82), AFG ₁ (4.55), AFG ₂ (11.41)
España (Rodríguez-Blanco <i>et al.</i> , 2021)	7	Ensilado alfalfa	UHPLC-FLD	AFG ₁ (2.21), AFG ₂ (0.91)	AFG ₁ (14.29), AFG ₂ (14.29)
España (Rodríguez-Blanco <i>et al.</i> , 2021)	10	Ensilado maíz inmaduro	UHPLC-FLD	AFG ₂ (0.12)	AFG ₂ (10)
Brasil (Franco <i>et al.</i> , 2019)	15	Piensos a base de maíz	UPLC-MS/MS	AFB ₁ (100), AFB ₂ (4.8), AFG ₁ (7.1)	AFB ₁ (13), AFB ₂ (4), AFG ₁ (4)
Egipto (Abdallah <i>et al.</i> , 2019)	61	Maíz	HPLC-FLD	AFB ₁ (8.7), AFB ₂ (2.2)	AFB ₁ (25), AFB ₂ (10)
Egipto (Abdallah <i>et al.</i> , 2019)	17	Alimento comercial	HPLC-FLD	AFB ₁ (1.5), AFB ₂ (0.5)	AFB ₁ (47), AFB ₂ (6)
Sudáfrica (Changwa <i>et al.</i> , 2021)	77	Piensos para ganado lechero	UHPLC-MS/MS	AFB ₁ (26.1), AFB ₂ (4.4), AFG ₁ (20.2) AFG ₂ (11.1)	AFB ₁ (3.9), AFB ₂ (3.9), AFG ₁ (2.6) AFG ₂ (1.3)
Kenia (Kemboi <i>et al.</i> , 2020)	16	Piensos para ganado lechero	LC-MS/MS	AFB ₁ (31.2), AFB ₂ (5.1), AFG ₁ (21.7) AFG ₂ (8.8) AF (61.5)	AFB ₁ (93), AFB ₂ (48), AFG ₁ (70) AFG ₂ (33) AF (93)
China central (Xiong <i>et al.</i> , 2018)	174	Piensos para ganado lechero	HPLC	AFB ₁ (24.4)	AFB ₁ (35.1)

Túnez (Abbes <i>et al.</i> , 2012)	58	Piensos para ganado lechero	ELISA	AFB ₁ (18.7)	AFB ₁ (84.4)
Uruguay (Capelli <i>et al.</i> , 2019)	15	Concentr ados	ELISA	AF (3.9)	AF (80)
Uruguay (Capelli <i>et al.</i> , 2019)	22	Ensilados	ELISA	AF (9.5)	AF (100)
Sudáfrica (Changwa <i>et al.</i> , 2018)	40	Piensos para ganado lechero	UHPLC- QTOF-MS / MS	AFB ₁ (0.74), AFB ₂ (3.06), AFG ₁ (2.55) AFG ₂ (41.27)	AFB ₁ (47.5), AFB ₂ (92.5), AFG ₁ (55) AFG ₂ (100)
Zearalenona (ZEA)					
España (Rodríguez- Blanco <i>et al.</i> , 2021)	44	Ensilado de maíz	HPLC- MS/MS	ZEA (69.79)	ZEA (15.91)
España (Rodríguez- Blanco <i>et al.</i> , 2021)	10	Ensilado de maíz inmaduro	HPLC- MS/MS	ZEA (93.66)	ZEA (40)
España (Rodríguez- Blanco <i>et al.</i> , 2021)	5	Ensilado de pulpa de remolach a azucarera	HPLC- MS/MS	ZEA (50.51)	ZEA (20)
Brasil (Franco <i>et al.</i> , 2019)	15	Piensos a base de maíz	UPLC- MS/MS	ZEA (160)	ZEA (29)
España (Rodríguez- Blanco <i>et al.</i> , 2020)	193	Ración total mezclada	HPLC- MS/MS	ZEA (90)	ZEA (16)
Egipto (Abdallah <i>et al.</i> , 2019)	17	Alimento comercial	HPLC-FLD	ZEA (8.1)	ZEA (24)

Bélgica (Vandicke <i>et al.</i> , 2021)	133	Ensilado de maíz	LC-MS/MS	ZEA (199)	ZEA (36.8)
Sudáfrica (Changwa <i>et al.</i> , 2021)	77	Piensos para ganado lechero	UHPLC- MS/MS	ZEA (666)	ZEA (9.1)
Kenia (Kemboi <i>et al.</i> , 2020)	16	Piensos para ganado lechero	LC-MS/MS	ZEA (35.2)	ZEA (100)
España (Facorro <i>et al.</i> , 2020)	97	Ración total mezclada	HPLC	ZEA (10.8)	ZEA (91.8)
Croacia (Pleadin <i>et al.</i> , 2017)	21	Ensilado de maíz	ELISA	ZEA (2084)	ZEA (74)
Croacia (Pleadin <i>et al.</i> , 2017)	50	Piensos para ganado lechero	ELISA	ZEA (526)	ZEA (58)
Sudáfrica (Changwa <i>et al.</i> , 2018)	40	Piensos para ganado lechero	UHPLC- QTOF-MS / MS	α -ZEL (4.84) β - ZEL (2.40) ZEA (2.84)	α -ZEL (100) β -ZEL (100) ZEA (60)
Republica Checa (Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)	19	Piensos para ganado lechero	U-HPLC- QtrapMS/MS	ZEA (9)	nd
Costa Rica (Molina <i>et al.</i> , 2019)	141	Piensos para ganado lechero	HPLC	ZEA (215)	ZEA (44)
Israel (Shimshoni <i>et al.</i> , 2013)	15	Ensilado de maíz	LC-MS / MS	ZEA (4)	ZEA (100)
Israel (Shimshoni <i>et al.</i> , 2013)	15	Ensilado de trigo	LC-MS / MS	ZEA (4)	ZEA (100)

Deoxinivalenol (DON)

España (Rodríguez-Blanco <i>et al.</i> , 2021)	44	Ensilado de maíz	HPLC-MS/MS	DON (337.72) 15-ADON (3.90)	DON (13.64) 15-ADON (22.73)
España (Rodríguez-Blanco <i>et al.</i> , 2021)	26	Ensilado de pasto	HPLC-MS/MS	15-ADON (8.16)	15-ADON (7.69)
España (Rodríguez-Blanco <i>et al.</i> , 2021)	10	Ensilaje de maíz inmaduro	HPLC-MS/MS	DON (170.08) 15-ADON (2.72)	DON (40) 15-ADON (30)
Brasil (Franco <i>et al.</i> , 2019)	15	Piensos a base de maíz	UPLC-MS/MS	DON (200)	DON (44)
España (Rodríguez-Blanco <i>et al.</i> , 2020)	193	Ración total mezclada	HPLC-MS/MS	DON (260), 15-ADON (28), DON-3-Glc (46)	DON (16.6), 15-ADON (9.3), DON-3-Glc (1.6)
España (Dagnac <i>et al.</i> , 2016)	64	Ensilado de maíz (año 1)	LC-MS/MS	DON (1316.4)	DON (12.5)
España (Dagnac <i>et al.</i> , 2016)	84	Ensilado de maíz (año 2)	LC-MS/MS	DON (2054.4)	DON (9.5)
Bélgica (Vandicke <i>et al.</i> , 2021)	133	Ensilado de maíz	LC-MS/MS	NVI ^c (nd) DON (670) 3-ADON (16) 15-ADON (64) DON + ^d (750)	NVI ^c (97.7) DON (97.7) 3-ADON (11.3) 15-ADON (36.1) DON + ^d (98.5)
Sudáfrica (Changwa <i>et al.</i> , 2021)	77	Piensos para ganado lechero	UHPLC-MS / MS	NIV (36.9) DON (477.7) 3-ADON (55.5) 15-ADON (169.6)	NIV (5.2) DON (63.6) 3-ADON (16.9) 15-ADON (20.8)
Kenia (Kemboi <i>et al.</i> , 2020)	16	Piensos para ganado lechero	LC-MS/MS	DON (359.4) DON-3-gluc (22.1) NIV (51.1)	DON (94) DON-3-gluc (88) NIV (94)
España (Facorro <i>et al.</i> , 2020)	97	Ración total mezclada	HPLC	DON (52.8) 3+15-ADON (426.9)	DON (16.3) 3+15-ADON (33.7)

Croacia (Pleadin <i>et al.</i> , 2017)	21	Ensilado de maíz	ELISA	DON (3879)	DON (81)
Croacia (Pleadin <i>et al.</i> , 2017)	50	Piensos para ganado lechero	ELISA	DON (2147)	DON (72)
Sudáfrica (Changwa <i>et al.</i> , 2018)	40	Piensos para ganado lechero	UHPLC- QTOF-MS / MS	ADONES (2.20) DON (20.40)	ADONES (30) DON (60)
Republica Checa (Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)	19	Piensos para ganado lechero	U-HPLC- QtrapMS/MS	DON (524) DON- 3-Glc (25) ADONS (4)	nd
Costa Rica (Molina <i>et al.</i> , 2019)	141	Piensos para ganado lechero	HPLC	DON (1578) 3- ADON (1843)	DON (55.1) 3- ADON (19)
Fumonisin (FB)					
España (Rodríguez- Blanco <i>et al.</i> , 2021)	44	Ensilado de maíz	HPLC- MS/MS	FB1 + FB2 (761.24)	FB1 + FB2 (40.91)
	26	Ensilado de pasto	HPLC- MS/MS	FB1 + FB2 (603.61)	FB1 + FB2 (11.54)
Brasil (Franco <i>et al.</i> , 2019)	15	Piensos a base de maíz	UPLC- MS/MS	FB1 (350) FB2 (360)	FB1 (93) FB2 (87)
España (Rodríguez- Blanco <i>et al.</i> , 2020)	193	Ración total mezclada	HPLC- MS/MS	FB1 + FB2 (600)	FB1 + FB2 (34.2)
España (Dagnac <i>et al.</i> , 2016)	64	Ensilado de maíz (año 1)	LC-MS/MS	FB1 (489) FB2 (76.1)	FB1 (4.7) FB2 (14.1)
	84	Ensilado de maíz (año 2)	LC-MS/MS	FB1 (136.9) FB2 (41.5)	FB1 (13.1) FB2 (28.6)
Bélgica (Vandicke <i>et al.</i> , 2021)	133	Ensilado de maíz	LC-MS/MS	FB1 (68) FB2 (12) FB3 (2.7) FUM ^d (82)	FB1 (26.3) FB2 (9.0) FB3 (3.8) FUM ^d (26.3)

Sudáfrica (Changwa <i>et al.</i> , 2021)	77	Piensos para ganado lechero	UHPLC- MS/MS	FB1 (189.8) FB2 (132.4) FB3 (nd)	FB1 (26.4) FB2 (19.5) FB3 (1.3)
Kenia (Kemboi <i>et al.</i> , 2020)	16	Piensos para ganado lechero	LC-MS/MS	FB1 (487.9) FB2 (175.5) FB3 (79.8) FB4 (54.2) FUM (652.4)	FB1 (100) FB2 (94) FB3 (63) FB4 (75) FUM (100)
España (Facorro <i>et al.</i> , 2020)	97	Ración total mezclada	HPLC	FB1 (578.8) FB2 (160.6)	FB1 (96.9) FB2 (65.3)
Croacia (Pleadin <i>et al.</i> , 2017)	21	Ensilado de maíz	ELISA	FUM (849)	FUM (88)
Croacia (Pleadin <i>et al.</i> , 2017)	50	Piensos para ganado lechero	ELISA	FUM (855)	FUM (71)
Republica Checa (Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)	19	Piensos para ganado lechero	U-HPLC- QtrapMS/MS	FB1 (13) FB2 (3)	nd
Costa Rica (Molina <i>et al.</i> , 2019)	141	Piensos para ganado lechero	HPLC	FB1 (6171) FB2 (3838)	FB1 (44.4) FB2 (43.2)
Ocratoxina (OTA) Brasil (Franco <i>et al.</i> , 2019)	15	Piensos a base de maíz	UPLC- MS/MS	11	2
Sudáfrica (Changwa <i>et al.</i> , 2021)	77	Piensos para ganado lechero	UHPLC- MS/MS	85.6	3.9
Kenia (Kemboi <i>et al.</i> , 2020)	16	Piensos para ganado lechero	LC-MS/MS	5.6	56
España (Facorro <i>et al.</i> , 2020)	97	Ración total mezclada	HPLC	5.1	1

Costa Rica (Molina <i>et al.</i> , 2019)	141	Piensos para ganado lechero	HPLC	55	35
--	-----	--------------------------------------	------	----	----

3.3.2.2. Nacional. En el país son escasos y dispersos los estudios recientes sobre contaminación de las raciones para ganado lechero por micotoxinas (Cuadro 5), sin embargo, las pocas investigaciones existentes, sugieren que es común la contaminación por hongos micotoxigénicos y micotoxinas en los ingredientes de uso pecuarias. Es necesario seguir investigando sobre dicho tema para tener más certeza sobre el escenario de contaminación en nuestro país.

Cuadro 5. Evidencia de la contaminación de micotoxinas en ingredientes y piensos para ganado lechero a nivel nacional

Estado/Región	N	Tipo de alimento	Técnica	Media (µg/kg)	Muestras positivas (%)
Aflatoxinas					
Nuevo León (Huerta-Treviño <i>et al.</i> , 2016)	40	Alfalfa	ELISA	2.77	72
Nuevo León (Huerta-Treviño <i>et al.</i> , 2016)	40	Sorgo	ELISA	0.36	40
Nuevo León (Huerta-Treviño <i>et al.</i> , 2016)	40	Zacate	ELISA	0.5	45.0
Jalisco (Reyes Velázquez <i>et al.</i> , 2009)	40	Ración total mezclada	ELISA	10.84	92.5
México (país) (Flores-Ortiz <i>et al.</i> , 2006)	21	Alimento concentrado	ELISA, HPLC	AFB ₁ (15.32)	AFB ₁ (76.2)
México (país) (Flores-Ortiz <i>et al.</i> , 2006)	6	Gluten	ELISA, HPLC	AFB ₁ (31.42)	AFB ₁ (83.3)
México (país) (Flores-Ortiz <i>et al.</i> , 2006)	9	Maíz	ELISA, HPLC	AFB ₁ (5.78)	AFB ₁ (77.8)

México (país) (Flores-Ortiz <i>et al.</i> , 2006)	56	Sorgo	ELISA, HPLC	AFB ₁ (9.55)	AFB ₁ (57.1)
Zearalenona					
Nuevo León (Huerta-Treviño <i>et al.</i> , 2016)	40	Alfalfa	ELISA	199.56	100
Nuevo León (Huerta-Treviño <i>et al.</i> , 2016)	40	Sorgo	ELISA	171.68	100
Nuevo León (Huerta-Treviño <i>et al.</i> , 2016)	40	Zacate	ELISA	49.14	100
México (país) (Flores-Ortiz <i>et al.</i> , 2006)	5	Alimento concentra do	ELISA, HPLC	54.04	80.0
México (país) (Flores-Ortiz <i>et al.</i> , 2006)	1	Ensilado	ELISA, HPLC	95.52	100
México (país) (Flores-Ortiz <i>et al.</i> , 2006)	7	Maíz	ELISA, HPLC	88.81	85.7
México (país) (Flores-Ortiz <i>et al.</i> , 2006)	37	Sorgo	ELISA, HPLC	3.43	59.5
Fumonisin					
Nuevo León (Huerta-Treviño <i>et al.</i> , 2016)	40	Alfalfa	ELISA	91	55.0
Nuevo León (Huerta-Treviño <i>et al.</i> , 2016)	40	Sorgo	ELISA	168.71	62.5
Nuevo León (Huerta-Treviño <i>et al.</i> , 2016)	40	Zacate	ELISA	290.5	42.5
Deoxinivalenol					

Nuevo León (Huerta-Treviño <i>et al.</i> , 2016)	40	Alfalfa	ELISA	470	92.5
Nuevo León (Huerta-Treviño <i>et al.</i> , 2016)	40	Sorgo	ELISA	35	25.0
Nuevo León (Huerta-Treviño <i>et al.</i> , 2016)	40	Zacate	ELISA	112.82	67.5
Ocratoxina					
Nuevo León (Huerta-Treviño <i>et al.</i> , 2016)	40	Alfalfa	ELISA	32.74	97.5
Nuevo León (Huerta-Treviño <i>et al.</i> , 2016)	40	Sorgo	ELISA	5.09	92.5
Nuevo León (Huerta-Treviño <i>et al.</i> , 2016)	40	Zacate	ELISA	0.92	52.5
México (país) (Flores-Ortiz <i>et al.</i> , 2006)	6	Alimento concentra do	ELISA, HPLC	9.0	16.7
México (país) (Flores-Ortiz <i>et al.</i> , 2006)	35	Sorgo	ELISA, HPLC	56.45	40.0

3.3.2.3. Estatal. En el estado de Aguascalientes se han realizado algunos estudios sobre contaminación del ganado lechero (Cuadro 6). Por dichas investigaciones se sabe que es frecuente la presencia de cepas toxigénicas de *Aspergillus flavus* y aflatoxinas en las raciones para ganado lechero y en leche cruda. También se ha encontrado presencia de zearalenona en las raciones. En los cultivos de las raciones en medios de cultivo, se han encontrado especies de géneros fúngicos micotoxigénicos, lo que sugiere que puede existir contaminación de otras micotoxinas de interés pecuario como son el deoxinivalenol, las fumonisinas y la ocratoxina. Es necesario, seguir investigando, para conocer el panorama de contaminación estatal por hongos micotoxigénicos y micotoxinas.

Cuadro 6. Evidencia de la contaminación de micotoxinas en ingredientes y piensos para ganado lechero en el estado de Aguascalientes.

Municipio/Región	N	Tipo de alimento	Técnica	Media (µg/kg)	Muestras positivas (%)
Aflatoxinas					
Aguascalientes (estado) (Rangel-Muñoz <i>et al.</i> , 2020)	288	Piensos para ganado lecheras	HPLC	AF (18.5)	AF (99.3)
Aguascalientes (estado) (Hernandez-Valdivia <i>et al.</i> , 2020)	208	Ración total mezclada	HPLC	AF (8.1)	AF (99)
Aguascalientes (estado) (Álvarez-Días <i>et al.</i> , 2021)	nd	Ración total mezclada	ELISA	ZEN (426)	nd
Zearalenona					
El Llano (Cruz-Vázquez <i>et al.</i> , 2017)	99	Ración total mezclada	ELISA	AF ()	AF (100)

3.4. HONGOS TOXIGÉNICOS DE INTERÉS PECUARIO

3.4.1. Clasificación taxonómica

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). *Aspergillus* es un género estudiado desde hace siglos debido a sus propiedades industriales, de deterioro y efectos en la salud. Su identificación a nivel de género es relativamente sencilla, pero a nivel de especies se complica debido a las similitudes existentes entre las mismas. Debido a esto, actualmente, los taxónomos recomiendan un enfoque polifásico que comprende no sólo características morfológicas, sino también bioquímicas y moleculares (Arrúa-Alvarenga *et al.*, 2012). En la clasificación taxonómica de Klich (2002), *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* están agrupados en la sección Flavi y *Aspergillus ochraceus* a la sección Circundati (Cuadro 7).

Cuadro 7. Clasificación taxonómica de las principales especies micotoxigénicas del género *Aspergillus*

Especie	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. ochraceus</i>
Reino	Fungi	Fungi	Fungi
Filo	Ascomycota	Ascomycota	Ascomycota
Clase	Eurotiomycetes	Eurotiomycetes	Eurotiomycetes
Orden	Eurotiales	Eurotiales	Eurotiales
Familia	Trichocomaceae	Trichocomaceae	Trichocomaceae
Género	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
Subgénero	<i>Circumdati</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Circumdati</i>
Sección	Flavi	Flavi	<i>Circundati</i>

Fuente: Klich (2002)

El género *Fusarium* fue descrito por primera vez en 1809 por Link, desde entonces la taxonomía de *Fusarium* ha sufrido una serie de cambios, especialmente, en los últimos 100 años y en consecuencia, el concepto de especie dentro del género ha variado mucho. Por lo que se han realizado estudios filogenéticos para agrupar acertadamente las especies de *Fusarium* (Watanabe *et al.*, 2011). Las principales especies de *Fusarium* de interés agropecuario se encuentran clasificadas en las secciones Liseola y Discolor (Cuadro 8).

Cuadro 8. Clasificación taxonómica de las principales especies micotoxigénicas del género *Fusarium*

Especie	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. culmorum</i>
Reino	Fungi	Fungi	Fungi	Fungi
Filo	Ascomycota	Ascomycota	Ascomycota	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes	Sordariomycetes	Sordariomycetes	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales	Hypocreales	Hypocreales	Hypocreales
Familia	Nectriaceae	Nectriaceae	Nectriaceae	Nectriaceae
Género	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i>
Sección	Liseola	Liseola	Discolor	Discolor

El término *Penicillium* fue descrito por primera vez por Link en 1809, desde entonces la clasificación taxonómica ha estado sujeta a constantes cambios, al igual que ocurre con muchos otros géneros de hongos. Actualmente se encuentran ubicados en la familia Trichocomaceae y se conocen más 350 especies descritas y aceptadas. La especie *Penicillium verrucosum* (Cuadro 9) es el hongo de su género, mayormente, asociado a la producción de ocratoxinas.

Cuadro 9. Clasificación taxonómica de la principal especie micotoxigénica del género *Penicillium*

Especie	<i>Penicillium verrucosum</i>
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Eurotiomycetes
Orden	Eurotiales
Familia	Trichocomaceae
Género	<i>Penicillium</i>

3.4.2. 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 6). 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).

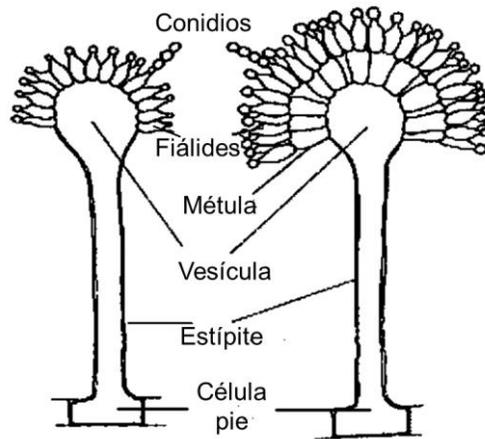


Figura 6. Morfología típica de conidióforo de *Aspergillus* (Pildain, 2006)

En los hongos del género *Fusarium*, los cuerpos fructíferos se llaman esporodocios, son masas de conidióforos colocados firmemente juntos (Figura 7). Las especies de *Fusarium* suelen producir tanto macroconidios como microconidios. Los macroconidios son hialinos, de dos a varias células, de fusiformes a falciformes, en su mayoría con una célula apical alargada y una célula basal pedicelada. Los microconidios son de 1 a 2 células, hialinas,

piriformes, fusiformes a ovoides, rectas o curvas. En los cultivos se mantienen juntos en una bola o cabeza falsa. Los macroconidios son esporas largas, en forma de hoz o de medialuna. Son septados (con 3-4 septos) y tienen extremos puntiagudos ahusados. El micelio es ramificado, septado, hialino o coloreado. Las hifas son inter o intracelulares y uninucleadas a multinucleadas (Schroers *et al.*, 2009).

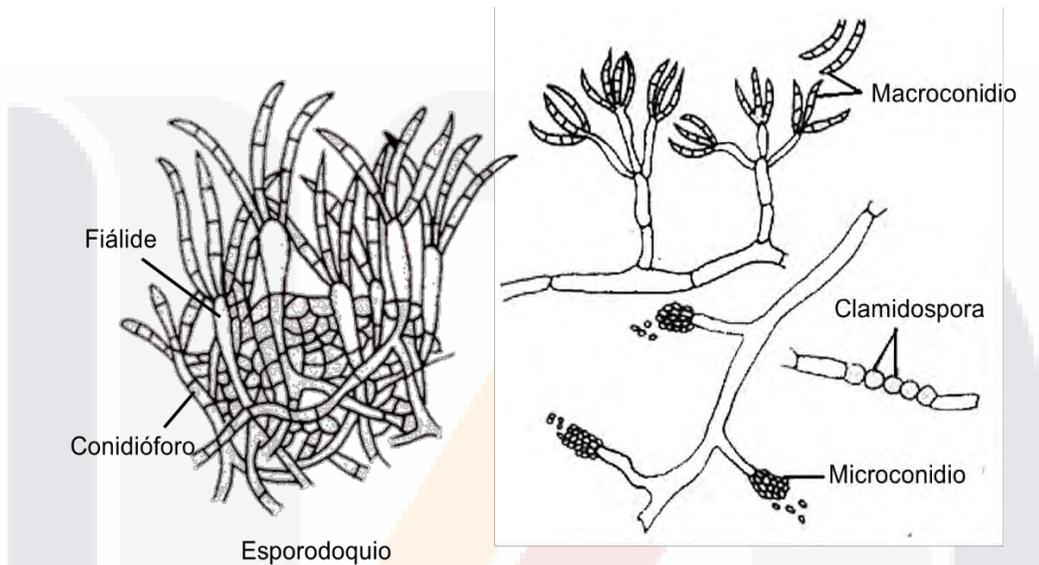


Figura 7. Morfología de esporodocio y esporas *Fusarium*

El género *Penicillium*, presenta conidióforos en forma de “cepillo” o “pincel”. El conidióforo está unido al micelio mediante el estípote a partir del cual pueden aparecer diferentes células denominadas ramas, que sirven como soporte para las métulas o para otras ramas (Figura 8). A partir de las métulas se originan las fialides que son células especializadas en la formación de esporas asexuales o conidios (Visagie *et al.*, 2014).

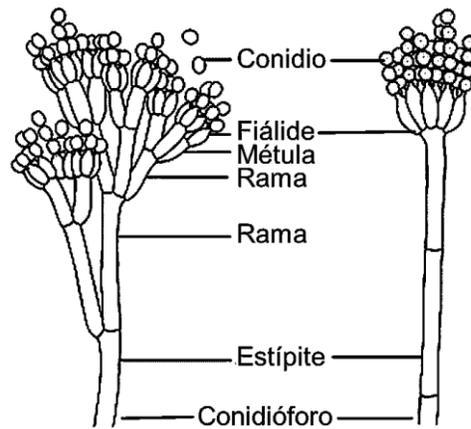


Figura 8. Morfología típica del conidióforo de *Penicillium*

Los conidióforos pueden presentar patrones simples (fiáldes solitarias) hasta muy complejos con múltiples niveles de ramificación que dan como resultado patrones generales simétricos o asimétricos. Pueden ser monoverticilados, biverticilados, terverticilados o incluso cuaterverticilados (Figura 9). Los conidióforos terverticilados y cuaterverticilados tienden a ser notoriamente asimétricos. En colonias de muchas especies, especialmente cuando los cultivos comienzan a degenerarse, puede haber más de un patrón de ramificación o formas intermedias (Visagie *et al.*, 2014).

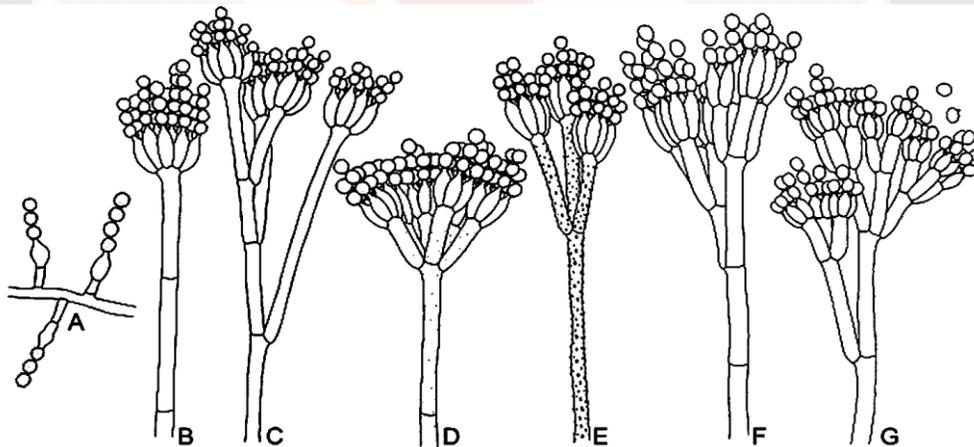


Figura 9. Patrones de ramificación de conidióforos *Penicillium* spp

A. Conidióforo fiáldes solitarias. B. Monoverticilado. C. Dividido (irregular). D, E. Biverticilado. F. Terverticilado. G. Cuaterverticilado (Visagie *et al.*, 2014)..

3.4.2.1. Características macroscópicas. El crecimiento de colonias *Aspergillus flavus* puede variar, desde un crecimiento rápido que alcanza alrededor de 60 a 70mm de diámetro

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

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, 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).

Las colonias de *Aspergillus parasiticus* presentan un diámetro desde los 45 hasta los 70 mm dependiendo del medio de cultivo. En CYA a 25°C muestran un color oliva oscuro o verde oscuro profundo. El micelio es de color blanco, usualmente discreto, ocasionalmente se forman esclerocios de color café a negro. Cuando produce exudado este es hialino. El reverso de las colonias puede observarse sin coloración o rojo rosado mate o amarillo mate, a veces marrones. Las colonias generalmente son planas y aterciopeladas, algunos aislamientos se vuelven flocosos. En MEA, las áreas conidiales son de color oliva a verde oscuro. El micelio usualmente es discreto, ocasionalmente presenta mechones de flocos. Puede formar esclerocios de color marrón a negro; El reverso de la colonia puede ser sin color o de tonos de amarillo opaco a verde opaco. Las colonias son flocosas, no densas (Klich, 2002).

Las colonias *Fusarium* spp. crecen rápidamente y producen colonias lanudas a algodonosas, planas y extendidas. el frente de la colonia puede ser blanco, crema, bronceado, salmón, canela, amarillo, rojo, violeta, rosa o morado. el reverso, puede ser incoloro, tostado, rojo, morado oscuro o marrón. *Fusarium graminearum* crece rápidamente en cualquier tipo de medio de cultivo estándar, incluidos agar extracto de levadura Czapeck (CYA), agar extracto de malta (MEA), agar papá dextrosa (PDA) y agar diclorán cloranfenicol peptona (DCPA). Las colonias en CYA y MEA son de color rosa pálido, con rojo anaranjado al reverso. En PDA las colonias son de color amarillento a marrón rojizo, a veces con una masa central de áreas de color marrón rojizo a naranja con macroconidios, el reverso de la colonia es rojo oscuro. Las colonias de *Fusarium culmorum* son similares a las de *F. graminearum*, pero de color rojo pálido a rojo pastel en CYA, MEA y PDA, el reverso en CYA y PDA es de rojo pastel a rojo intenso y en MEA de marrón a marrón rojizo.

Las colonias de *Fusarium verticillioides* crecen rápidamente a 25°C en cualquier medio de cultivo estándar, incluyendo agar extracto de levadura Czapek, agar extracto de malta y agar papa dextrosa (PDA). El hongo crece como micelio haploide y se propaga vegetativamente a través del alargamiento de hifas. Las colonias son de color blanco a salmón pálido, con células basales bajas y a menudo viscosas, casi rectas, de paredes delgadas, con células basales en forma de pie. Inicialmente, los cultivos tienen micelios blancos, pero pueden desarrollar pigmentos violetas con la edad. La pigmentación en el agar varía, desde la ausencia de pigmentación o el naranja grisáceo hasta el gris violeta, violeta oscuro o magenta oscuro (casi negro) en otros. Las colonias de *Fusarium proliferatum* son muy similares a las de *F. verticillioides*, pero las colonias en PDA carecen de colores púrpuras en el reverso (Leslie *et al.*, 2008).

Las colonias de *Aspergillus ochraceus* crecen rápidamente (de 45 a 55 mm en 7 días) a 25°C. En el medio de cultivo, el micelio vegetativo está mayormente sumergido en el agar, mientras que las cabezas de los conidios suelen estar dispuestas en zonas. El color característico de la colonia es el amarillo. Algunas colonias de *Aspergillus ochraceus* forman esclerocios irregulares con forma de guijarros de color rosado a púrpura de hasta 1 mm de diámetro. El color del reverso de la colonia es de pálido a marrón. Los conidióforos, macroscópicamente, aparecen como una masa pulverulenta (Klich, 2002).

Penicillium verrucosum es de crecimiento lento, alcanza entre 15 mm y 25 mm de diámetro de crecimiento tanto en el agar de levadura Czapek (CYA) como en el agar extracto de malta (MEA) después de siete días. Presenta micelio blanco en la periferia y el de color verde grisáceo a verde opaco en los medios antes mencionados. Otras cepas de *P. verrucosum* pueden presentar colores, verde oscuro y azul verdoso. El reverso es de color marrón amarillento a marrón oscuro en CYA y de marrón mate a oliva en MEA (Demjanová *et al.*, 2021).

3.4.2.2. Características microscópicas. En *Aspergillus flavus* el color conidial es amarillo verdoso, las cabezuelas conidiales son de radiadas a columnares, los conidióforos pueden ser uni y biseriados. En la mayoría de los aislamientos en Czapeck y Agar a 25°C de incubación (CYA25) al menos 20% de conidióforos son biseriados, algunos casi completamente uniseriados en MEA. Las Estípites miden de 400-800 x 8-17 μm de largo, con paredes generalmente ásperas, ocasionalmente finamente rugosas, generalmente incoloras, a veces muy pálidas. Las vesículas son largas, de globosas a subglobosas de

20-45 μm de diámetro. Las métulas cubren tres cuartos o la totalidad de la superficie de la vesícula; las fiálides miden 7-12 x 3-4 μm . Los conidios son de globosos a elipsoidales de 3-6 μm , con paredes lisas a finamente rugosas. Puede haber esclerocios en ocasiones (Klich, 2002).

Las cabezas de los conidióforos de *Aspergillus parasiticus* usualmente son radiadas. Los estípites del conidióforo pueden medir desde 100 hasta 1100 μm , sus paredes son finamente rugosas a muy rugosas, e incoloras. Las vesículas miden de 25-35 μm de ancho, suelen ser esféricas o ligeramente alargadas y predominantemente uniseriadas o hasta un 20% de biseriadas en algunos aislados. Las métulas, si están presentes, miden de 7-10 x 3-7 μm . Las fialides miden de 8-11 x 3-5 μm . Las métulas o fialides cubren al menos la mitad de la vesícula. Los conidios son globosos, de 3-5 μm de diámetro, de paredes claramente rugosas (Klich, 2002).

Los conidios característicos *Fusarium graminearum* (macroconidios) se producen en DCPA u otro medio especializado, generalmente con 4-5 septos, paredes gruesas, rectas a moderadamente curvadas, con la célula basal claramente en forma de pie; no se producen microconidios. En *Fusarium culmorum* los macroconidios son relativamente cortos, anchos y ligeramente curvados, con 4-5 tabiques, de 30-45 μm de largo, con células basales con una muesca de leve a definida. No se producen microconidios (Leslie *et al.*, 2008).

Fusarium verticillioides produce dos tipos de esporas asexuales, macroconidios y microconidios. Los macroconidios emergen de los macroconidióforos, que son monofiálides ramificadas y no ramificadas. De manera similar, los microconidios unicelulares y uninucleados también surgen de monofiálides ramificados y no ramificados, que con frecuencia forman largas cadenas de conidios y falsas cabezas. Los microconidios son puntiagudos en ambos extremos o en forma de maza, de 7 a 10 μm de largo, y se producen en cadenas a partir de fialides largos y únicos (células fructíferas). En *Fusarium proliferatum* los microconidios se producen a partir de fiálides con más de un cuello fértil (Leslie *et al.*, 2008).

En *Aspergillus ochraceus*, las fialides son lisas o finamente rugosas, están dispuestas de forma biseriada. Las métulas crece en todo el perímetro de la vesícula en una orientación radial. Las cabezas de los conidios al principio parecen globosas, pero con la edad, las cadenas de conidios se adhieren y se desarrollan en dos o tres columnas divergentes. Puede haber esclerocios viináceos a violáceos. El color característico de los conidióforos es de un amarillo calcáreo a un amarillo pardo pálido. Las alturas de los conidióforos son

de hasta 1500 µm de altura. La apariencia de estos conidióforos es granular con paredes de color marrón amarillento pálido que se adhieren abruptamente a una vesícula de globosa a subglobosa. Las vesículas, globosas de paredes delgadas y un diámetro de 35 x 50 µm, producen esterigmas en toda la superficie en cultivo. Los esterigmas primarios miden 15-25 × 5-6 µm, mientras que los secundarios son 7-11 × 2-3,3 µm. Los conidios están dispuestos en cadenas verticales y secos, a menudo forman dos o más columnas cortas por cabeza, en montajes microscópicos húmedos hialinos. El diámetro de los conidios ronda los 2,5-3,5 µm (Klich, 2002).

Penicillium verrucosum presenta conidióforos que generalmente son ramificados en dos etapas (a veces ramificados en tres etapas), lo que le da una apariencia similar a un cepillo. Los conidióforos son de paredes ásperas con ramas y métulas muy juntas. Las fiálides del conidióforo son cortos y en forma de matraz con cuellos distintos. Las fialides del conidióforo son cortas y en forma de matraz con distintos cuellos. Produce una mayor cantidad de conidios en CYA que en MEA. Los conidios son de paredes lisas y de aproximadamente 2,5 µm a 3,0 µm de diámetro. Su forma es elipsoidal cuando son jóvenes y luego cambian a una forma globosa o subglobosa (Demjanová *et al.*, 2021).

3.4.3. Condiciones óptimas de crecimiento de los principales hongos toxigénicos

Los principales factores que influyen en el crecimiento de los hongos y la producción de metabolitos secundarios son: actividad de agua, pH y temperatura. La actividad de agua (aw) hace referencia a la porción de agua disponible en el sustrato que puede ser aprovechada por el hongo. Las especies micotoxigénicas requieren de diferentes condiciones de crecimiento (Cuadro 10).

Cuadro 10. Condiciones de crecimiento de las principales especies de hongos micotoxigénicas

Género	Temperatura (°C)		pH		Actividad de Agua	
	Rango	Óptimo	Rango	Óptimo	Rango	Óptimo
<i>Aspergillus flavus</i>	12-48	28-37	2.5-7.5	3.5-5.5	0.78-0.99	0.90-0.99
<i>Aspergillus parasiticus</i>	12-42	32	2.4-10.5	3.5-6.5	0.80-0.99	0.81-0.85
<i>Fusarium graminearum</i>	-5-35	25	4-9	5.5-6.5	0.90-0.98	0.88
<i>Fusarium culmorum</i>	0-33	30	4-9	5.5-6.5	0.87-0.98	0.88
<i>Fusarium verticillioides</i>	3-37	25	4-9	5.5-6.5	0.87-0.97	0.92
<i>Fusarium proliferatum</i>	3-37	25	4-9	5.5-6.5	0.87-0.97	0.92
<i>Aspergillus ochraceus</i>	10-45	30-40	3-10	5.5-.5	0.77-0.98	0.79-0.81
<i>Penicillium verrucosum</i>	0-31	21-23	2.5-7.5	3.0-4.5	0.78-0.88	0.83

Elaboración propia a partir de Demjanová *et al.* (2021), Pitt y Hocking (2009) y Ramirez *et al.* (2006)

3.4.4. Condiciones óptimas de producción de micotoxinas

La formación de micotoxinas algunas veces ocurre a condiciones ambientales y químicas diferentes a la de crecimiento de las colonias. Los géneros micotoxigénicos presentan requerimientos de actividad de agua, temperatura y pH específicas para la producción de metabolitos secundarios (Cuadro 11).

Cuadro 11. Condiciones óptimas de producción de micotoxinas de los géneros micotoxigénicos de mayor importancia agropecuaria

Género	Temperatura (°C)		pH		Actividad de Agua	
	Rango	Óptimo	Rango	Óptimo	Rango	Óptimo
<i>Aspergillus spp</i>	12-40	27-33	2.2-8.0	5-6	0.77-0.99	0.82-0.99
<i>Fusarium spp</i>	0-31	22-28	2.0-6.0	3-4	0.85-0.97	0.85-0.87
<i>Penicillium spp</i>	-3, 40	15-30	2.1-10.0	5-7	0.80-0.95	0.80-0.86

Elaboración propia a partir de Demjanová *et al.* (2021), Pitt y Hocking (2009) y Ramirez *et al.* (2006)

3.4.5. Características biológicas

3.4.5.1. Ciclo biológico de los hongos. En el género *Aspergillus* 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). 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 brotan de la vesícula, y cada métula forma varias 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 10), 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).

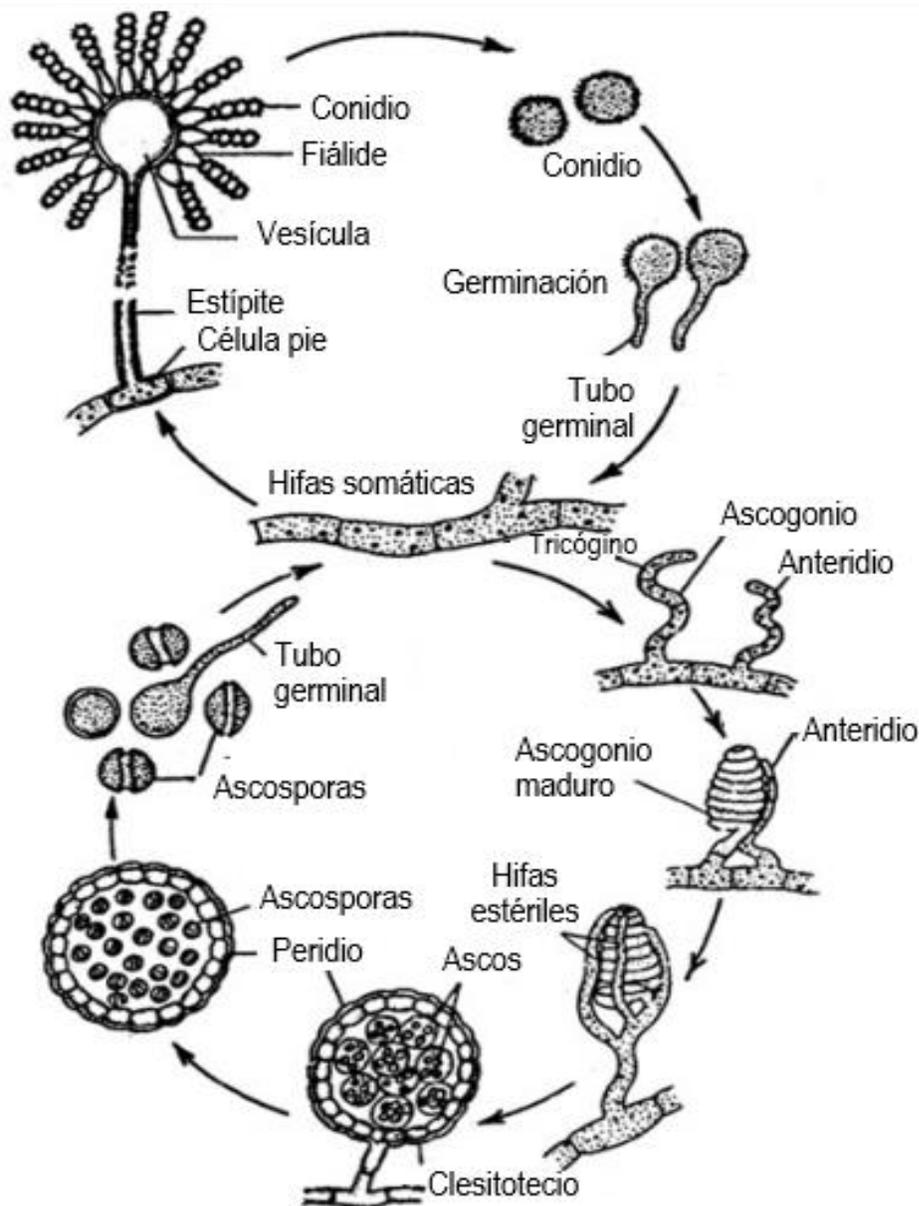


Figura 10. Ciclo biológico de *Aspergillus* spp. Adaptado de (Akar, Avci, y Dusunceli, 2004)

Fusarium inverna en el suelo o en restos de plantas en forma de esporas asexuales de pared gruesa denominadas clamidosporas, o bien en forma de micelio o esporas en los restos vegetales. La reproducción asexual de *Fusarium* tiene lugar por tres tipos de esporas microconidios, macroconidios y clamidosporas. Los microconidios y macroconidios son producidos por los esporodocios (Ohara *et al.*, 2004). Los microconidios son generalmente estructuras diminutas producidas en grandes cantidades a partir de las puntas de los conidióforos que son indistinguibles de las hifas vegetativas (Figura 11). Los macroconidios se producen en las puntas de conidióforos cortos que surgen de la superficie superior de la masa estromática de hifas en forma de cojín. Los macroconidios se desprenden tan pronto como alcanzan la madurez. Las clamidosporas son células de paredes gruesas, redondeadas u ovaladas que se forman en las hifas. Ocurren solas o en cadenas y pueden ser terminales o intercalares (Leslie *et al.*, 2008). Las clamidosporas se separan de la hifa principal después de la maduración. Funcionan como esporas en reposo, son resistentes al secado y a las condiciones adversas, permiten que el hongo sobreviva periodos prolongados en el suelo.

Algunas especies de *Fusarium* presentan en su ciclo una fase sexual o forma perfecta, es decir, se aparean de manera homotálica o heterotálica seguido de una meiosis posterior y la producción de ascosporas. La forma teleomórfica de *F. verticillioides* recibe el nombre *Gibberella moniliformis*, es heterotálica, ya que el apareamiento ocurre entre colonias de distintos grupos. *Gibberella zeae* (teleomorfo de *Fusarium graminearum*), es una especie homotálica. El desarrollo de la fase sexual comienza con la formación de hifas con células binucleadas, como resultado, los dos núcleos de las células binucleadas son genéticamente idénticos. Estas desarrollan pequeñas células enrolladas, que son las que inician la formación de los cuerpos fructíferos. Las ascas son sacos tubulares que contienen a las ascosporas, que son producto de la meiosis (Trail, 2009).

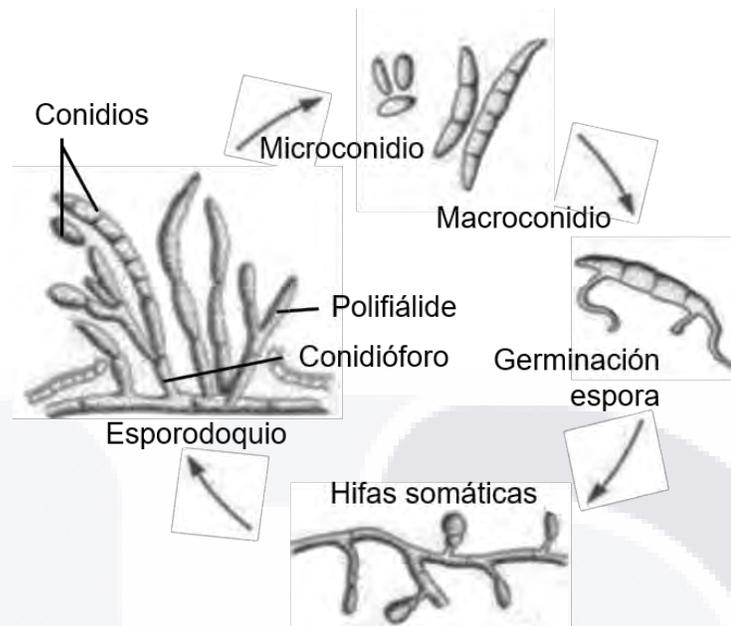


Figura 11. Ciclo biológico de *Fusarium* spp.

Penicillium se reproduce tanto asexualmente como sexualmente (Figura 12). Sin embargo, la etapa asexual es dominante y constituye el modo habitual de reproducción. La etapa sexual es rara. Los conidióforos surgen como una excrecencia hifal tubular erecta de cualquier célula del micelio y no de una célula especializada (célula del pie) como en *Aspergillus*. Después de algún período de crecimiento vegetativo, surgen hifas verticales de las porciones más antiguas del micelio. Alcanzando cierta altura, los conidióforos septados se ramifican una o dos o más veces. Los conidios se forman dentro de las puntas estrechas de los fialides en forma de matraz. Los conidios de la cadena están dispuestos de forma basícola. El conidio más joven se encuentra junto a la punta del esterigma y el más viejo lejos de él (Gil-Serna *et al.*, 2014).

La disposición basígena de los conidios tiene dos propósitos útiles. Permite la rápida dispersión de conidios maduros desde las puntas. En segundo lugar, ayuda a la nutrición adecuada de los conidios más jóvenes que están más cerca de las puntas de los esterigmas. A medida que la cadena de conidios aumenta en longitud, los conectores entre los conidios más viejos se rompen y resultan en la separación de los conidios maduros. Por tanto, los conidios se desprenden continuamente. Al ser pequeños, ligeros y secos son dispersados por las corrientes de aire. Al caer sobre un sustrato adecuado y en condiciones adecuadas (humedad, temperatura adecuada y alimento), el conidio absorbe la humedad y

se hincha. El conidio hinchado germina sacando un tubo germinativo (Abdelghany y El-Sheikh, 2018).

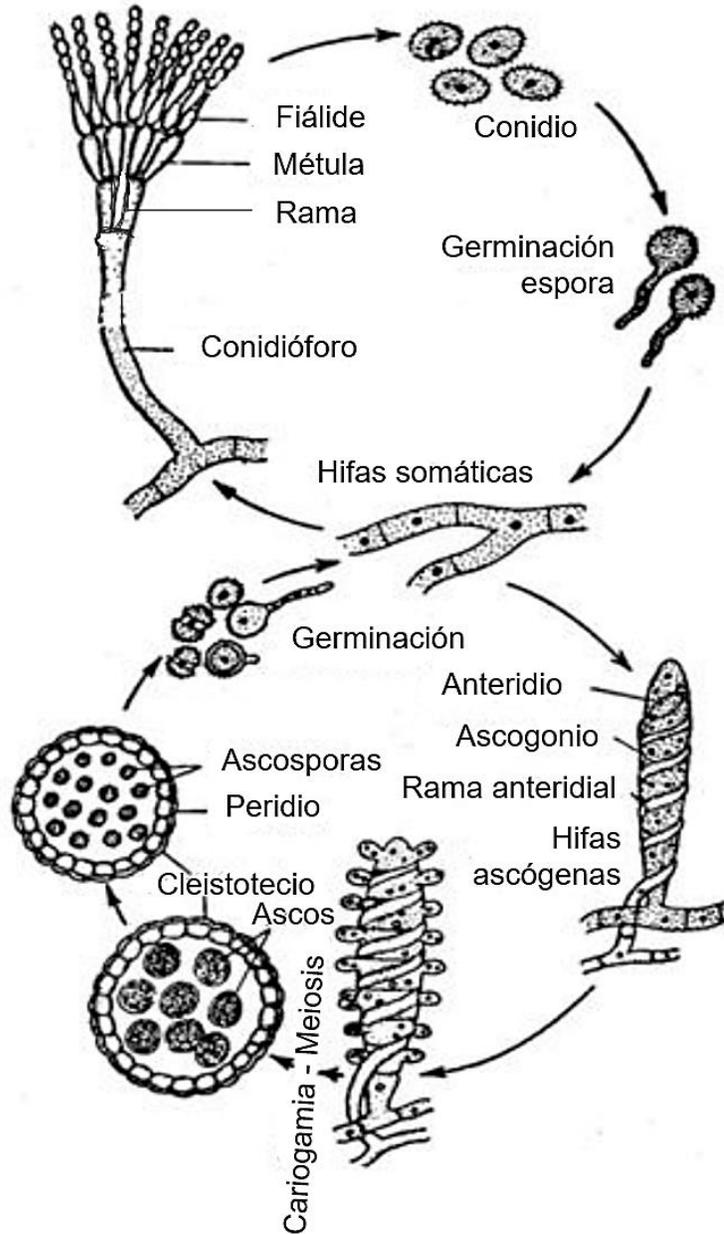
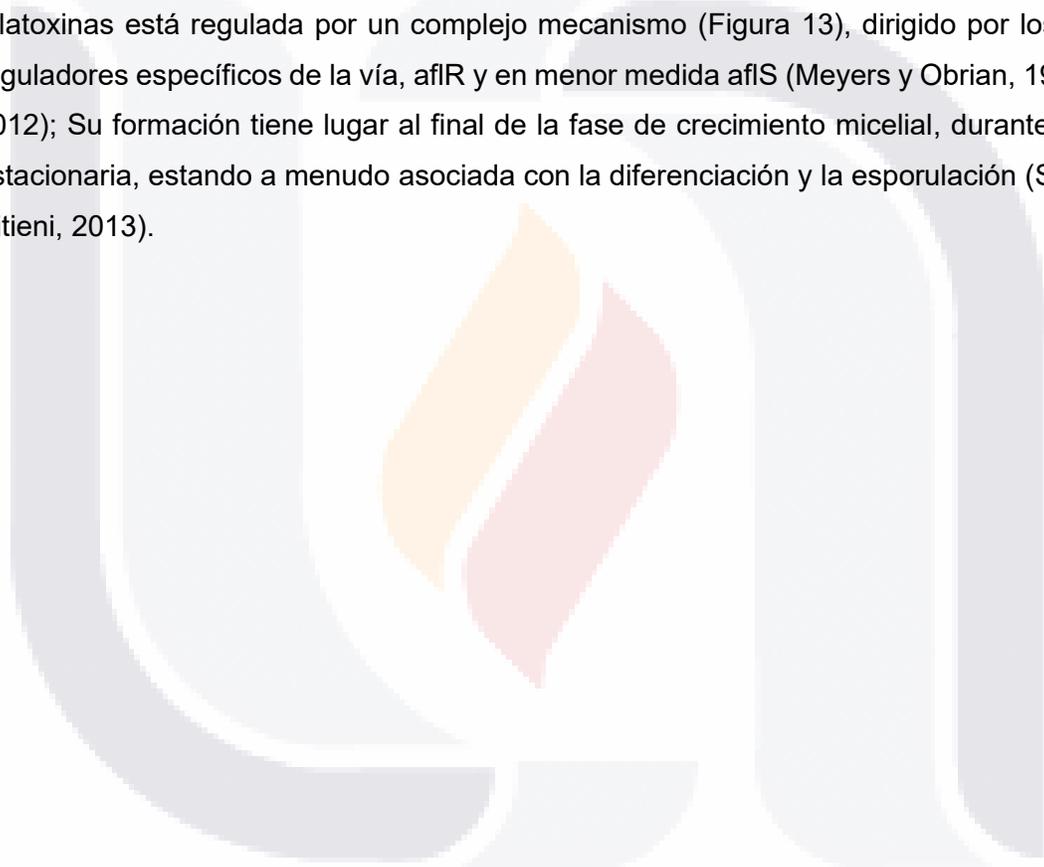


Figura 12. Ciclo biológico de *Penicillium* spp. Adaptado de (Akar, Avci, y Dusunceli, 2004)

3.4.5.2. Biosíntesis de micotoxinas. La percepción del medio ambiente y la disponibilidad de nutrientes resultan en la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de micotoxinas.

La biosíntesis de las aflatoxinas es afectada por factores genéticos y ambientales (Davari *et al.*, 2015). 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 (Figura 13), 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).



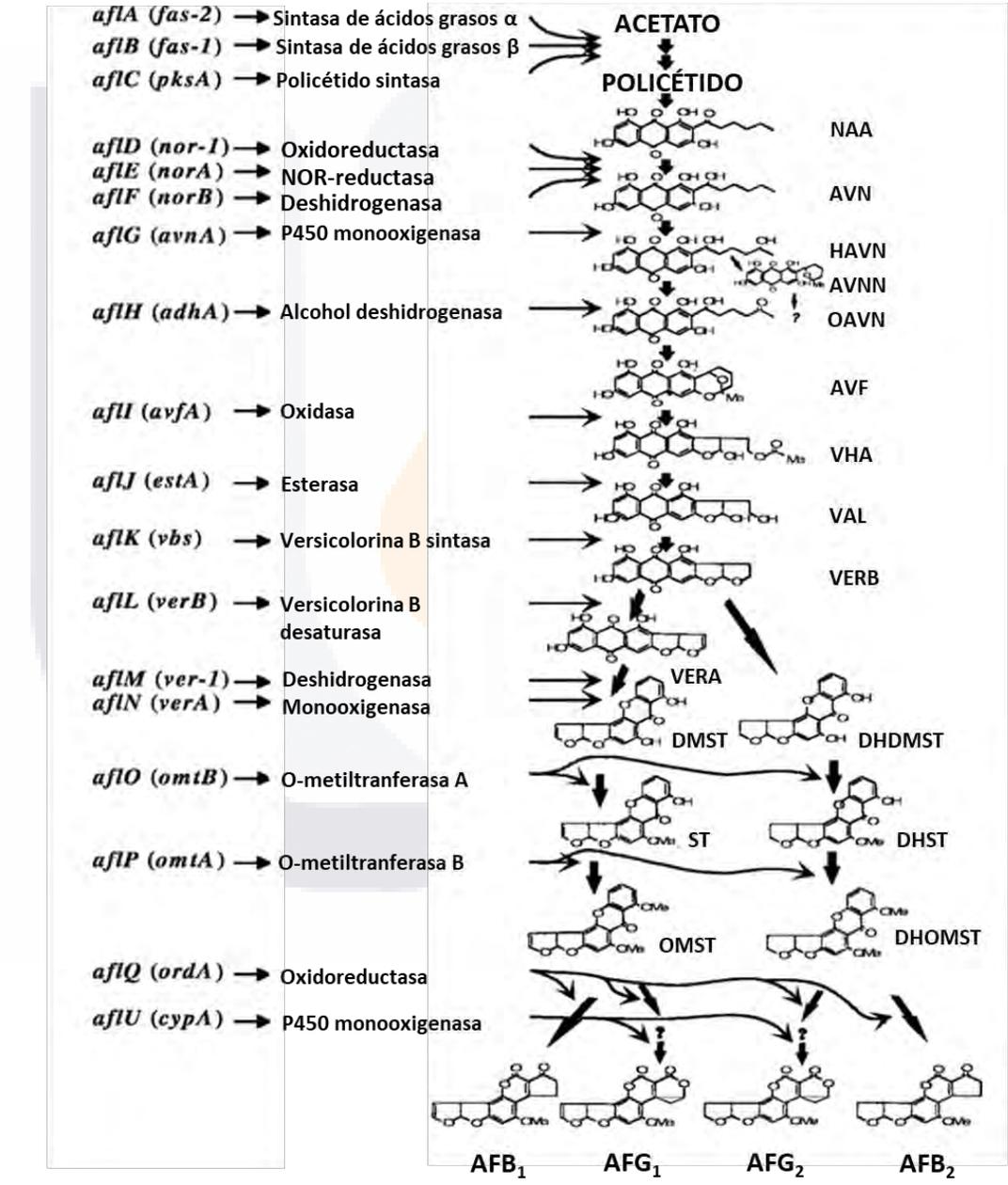
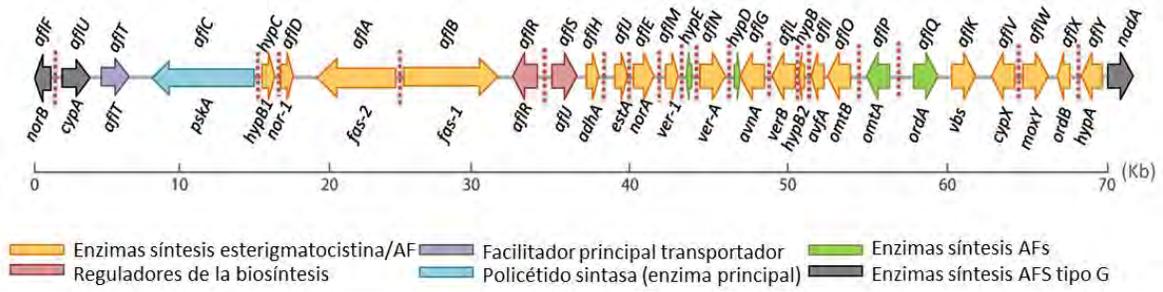


Figura 13. Ruta biosintética de aflatoxinas

La biosíntesis de ZEA se ha estudiado principalmente en *Fusarium graminearum*, dicha ruta está regulada principalmente por cuatro genes entre ellos dos genes de la policétido sintasa (PKS) y por ZEB1 y ZEB2 (Figura 14). La biosíntesis es iniciada por PKS4, este cataliza un acetil-CoA y cinco malonil-CoA. Posteriormente, PKS13 funciona como una unidad extensora que completa la cadena principal del policétido y es responsable de la ciclización y aromatización. Finalmente, el β -zearalenol es convertido en zearalenona por ZEB1, que es una isoamil alcohol oxidasa. (Kim et al., 2018).

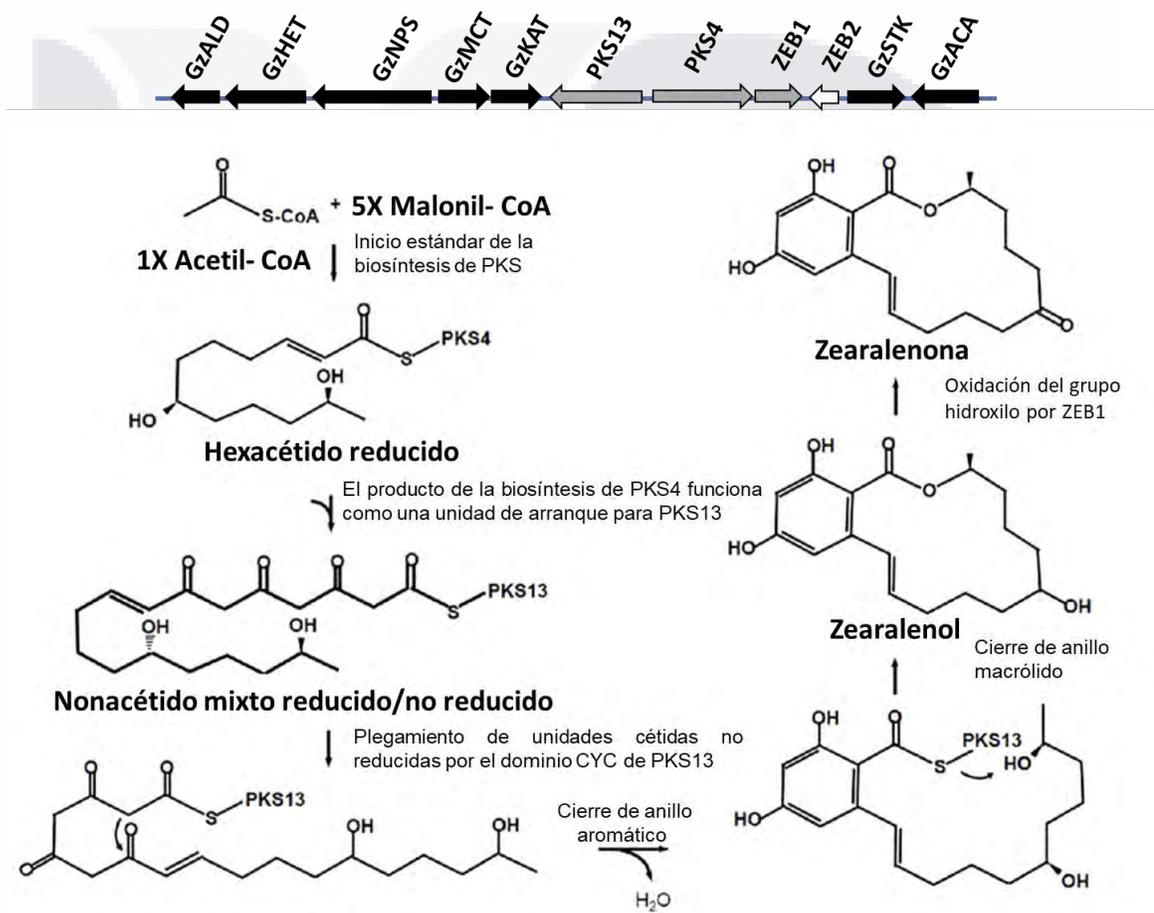


Figura 14. Ruta biosintética de zearalenona

La biosíntesis de DON comienza con la ciclización del pirofosfato de farnesilo mediada por las tricodieno sintasas codificadas por TRI5 (Figura 15). Luego, varios pasos son seguidos por al menos seis enzimas adicionales codificadas por TRI4 , TRI101 , TRI11 , TRI3 , TRI1 y TRI8 . Además, dos factores de transcripción, TRI6 y TRI10 ; un transportador transmembrana, TRI12; y genes con funciones desconocidas, TRI9 y TRI14 , también

pueden estar involucrados en la biosíntesis de DON y la virulencia de *Fusarium* (Li et al., 2022).

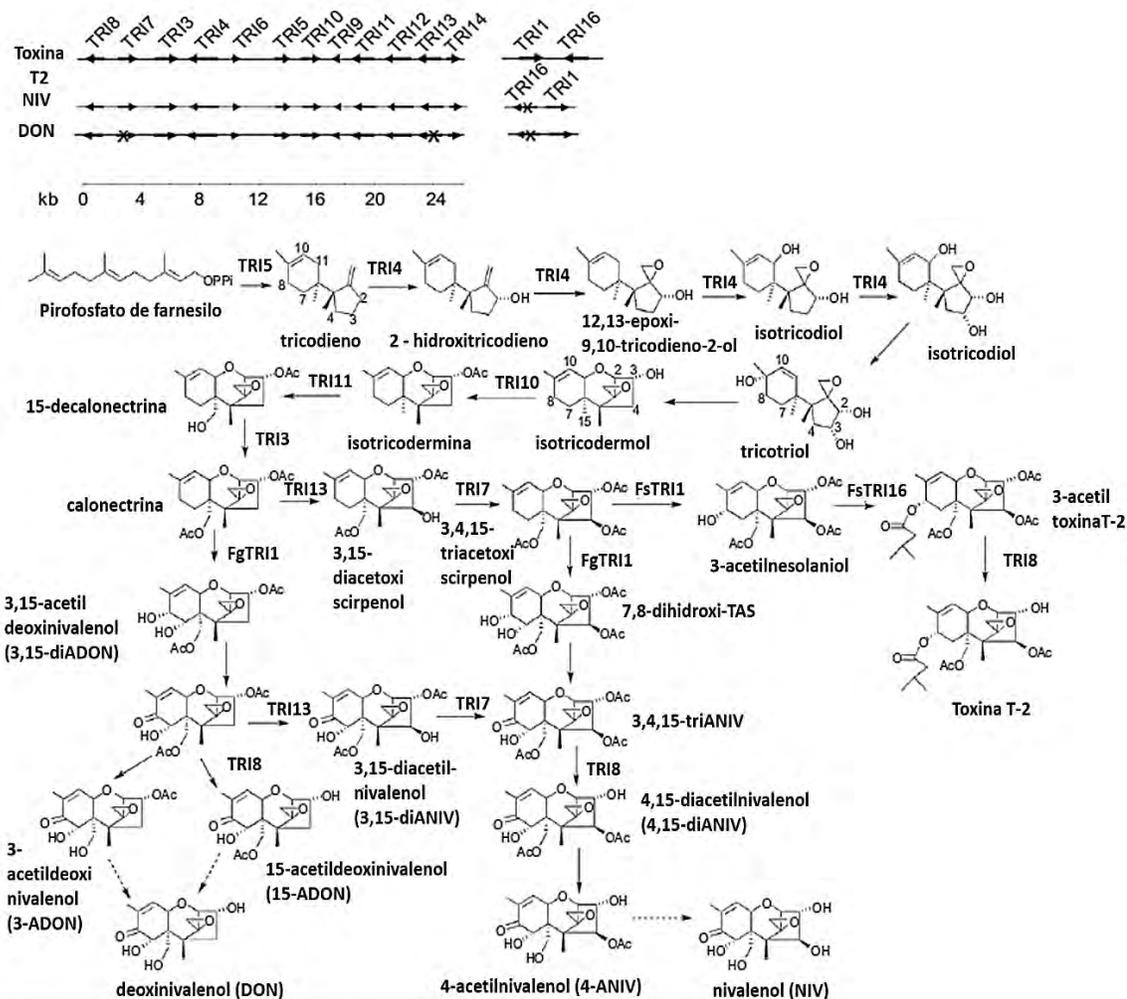


Figura 15. Ruta biosintética de deoxinivalenol

La biosíntesis de las fumonisinas es regulada por un grupo de 17 genes de la región de 46 kpb en el cromosoma 1 de *F. verticillioides*, que conforman el locus FUM (Figura 16). Los genes codifican las enzimas involucradas en la biosíntesis de las micotoxinas y proteínas que regulan la secreción y la resistencia de las fumonisinas. Las fumonisinas se sintetizan a partir de unidades de acetato (Chen et al., 2020).

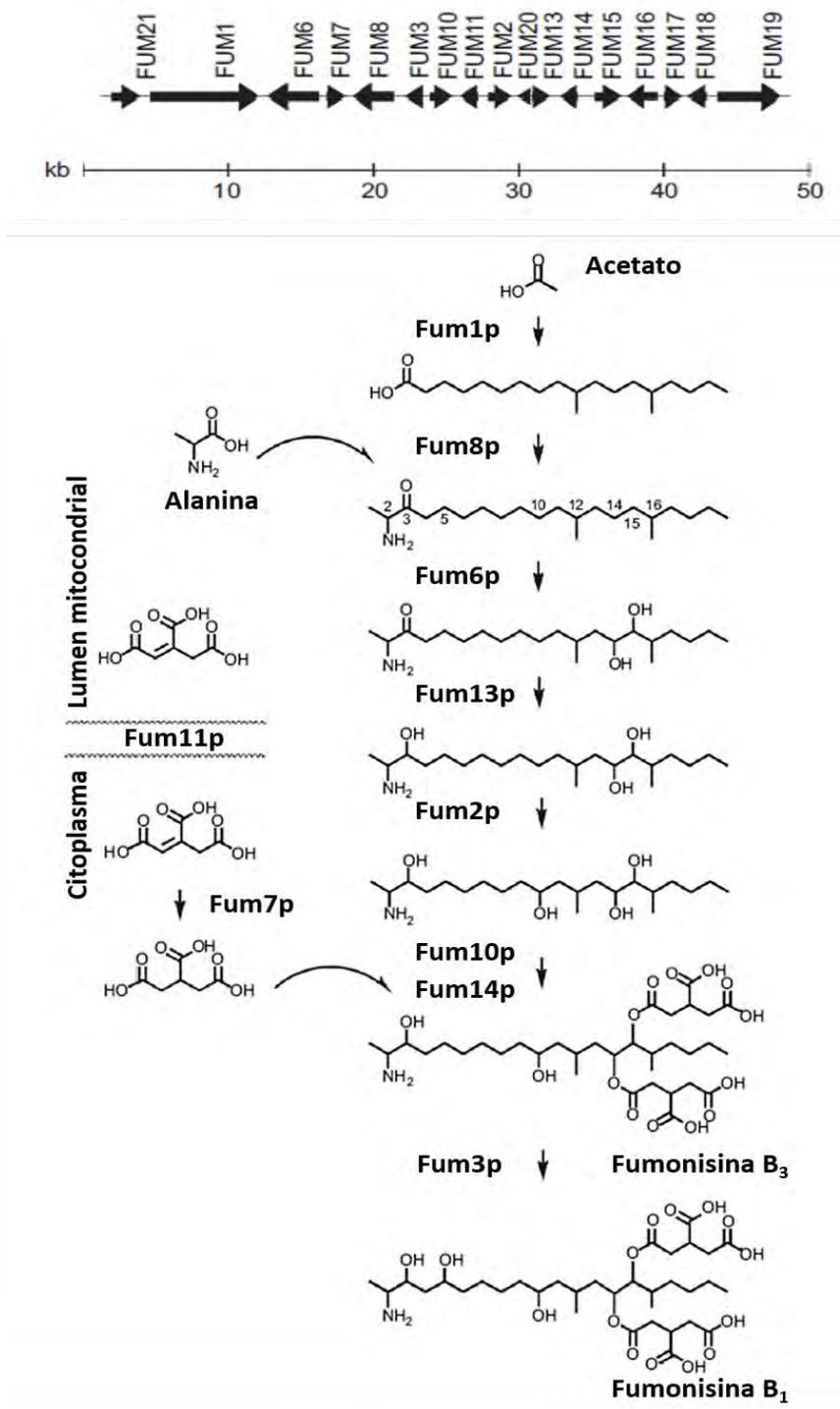


Figura 16. Ruta biosintética de fumonisinas

La ruta de biosíntesis de ocratoxina comienza con la PKS OtaA que combina acetil coenzima A (acetil-CoA) y malonil-CoA para sintetizar 7-metilmeleína (Figura 17). Luego, la

7-metilmeleína se oxida a OTβ por OtaC. OTβ y l-β-fenilalanina se combinan por el NRPS (OtaB) para formar un enlace amida y OTB. OTB es clorado por la halogenasa OtaD para producir el producto final, OTA (Yan Wang et al., 2018).

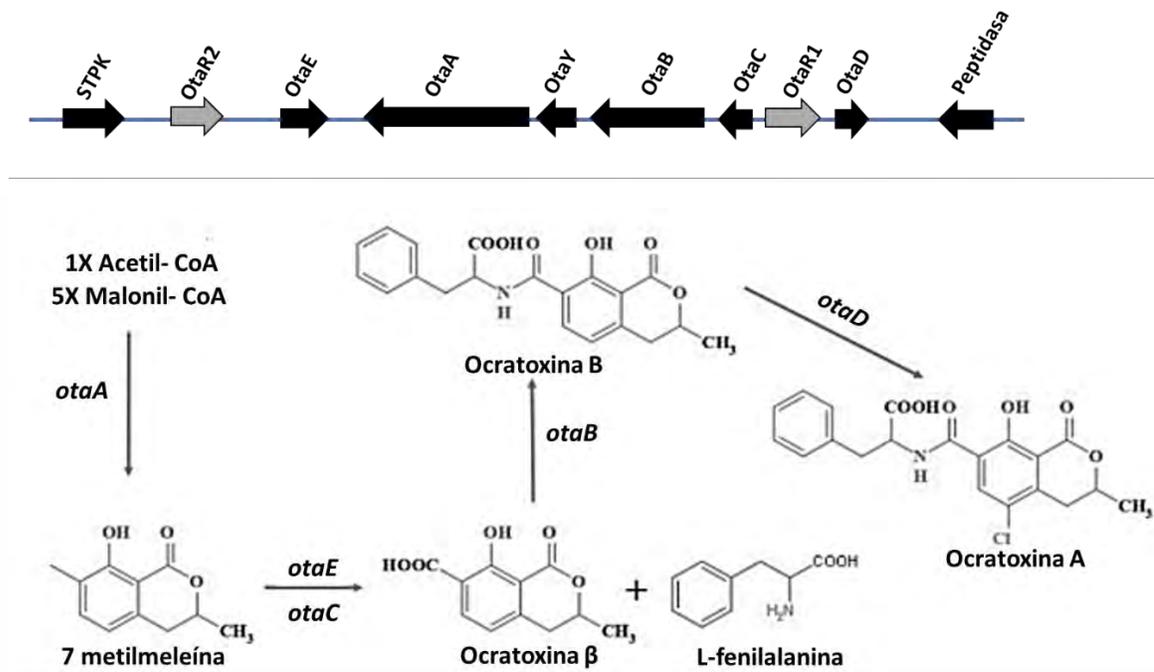


Figura 17. Ruta biosintética de ocratoxinas

3.4.6. Mecanismos de contaminación

Los hongos utilizan múltiples rutas de entrada a la planta (Figura 18), con la finalidad de colonizar los tejidos, con lo cual, causan diferentes enfermedades durante su desarrollo. La primera ruta de entrada es la infección sistémica de las plantas. El hongo puede sobrevivir en las semillas o en los residuos vegetales del suelo (Agrios, 2004; Murillo *et al.*, 1999).

Las esporas, hifas o estructuras de resistencia pueden colonizar la semilla o las raíces después de su germinación. Las hifas ingresan al pericarpio de los granos o a las células de la epidermis de la raíz. Colonizan las células del parénquima del escutelo y llegan hasta el córtex. El hongo es capaz de trasladarse por el tallo hasta la mazorca, sin embargo, el tejido de transición entre la corona de la plántula y el tallo limita su paso (Agrios, 2004; Wicklow, 1983). Otra ruta de entrada es la infección de la mazorca por medio del estigma, el inoculo y conidios transportados por el agua o el viento se depositan en el estigma e ingresan al pericarpio, la hifa del hongo crece en la superficie de la cutícula y se introduce al grano a través del canal estilar, aun sin la presencia de lesiones mecánicas o heridas.

Infección del tallo o la mazorca por daño mecánico, las lesiones que provocan los insectos o plagas cuando se alimentan de la planta funcionan como ruta de entrada de las hifas. Los insectos también actúan como vectores del hongo al dispersar las hifas o conidios de la superficie de la planta al grano (Agrios, 2004; Diener *et al.*, 1987).

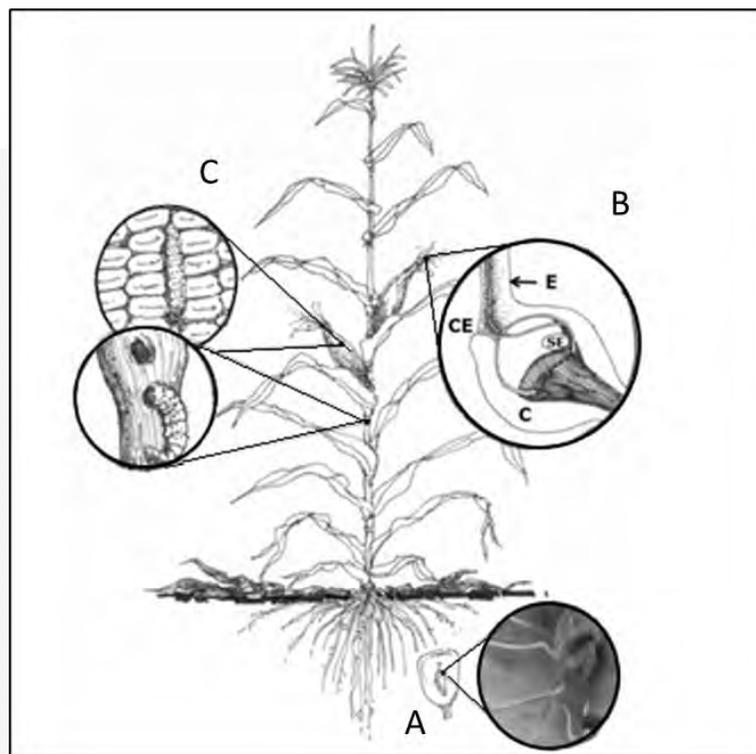


Figura 18. Rutas de entrada de los hongos a la planta de maíz (de la Torre *et al.*, 2013). A. Infección sistémica de plántulas. B. Infección a través del estigma. C. Infección a través de heridas.

3.5. PRINCIPALES MICOTOXINAS DE INTERÉS PECUARIO

Las aflatoxinas por su estructura química se clasifican como difurano-cumarinas; las cuatro AF producidas naturalmente son B₁, B₂, G₁ y G₂ (Figura 19). 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).

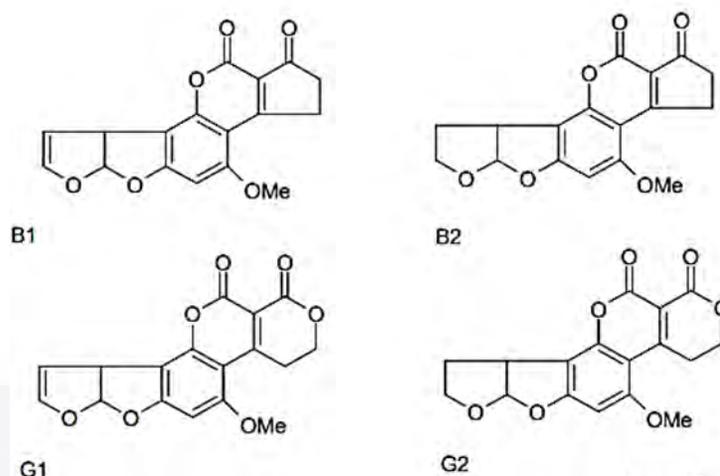


Figura 19. Estructura química de las aflatoxinas (Pildain, 2006).

La Zearalenona es una micotoxina estrogénica no esteroide, cuya estructura (Figura 20) corresponde a una lactona de ácido resorcílico fenólico (Ropejko y Twarużek, 2021).

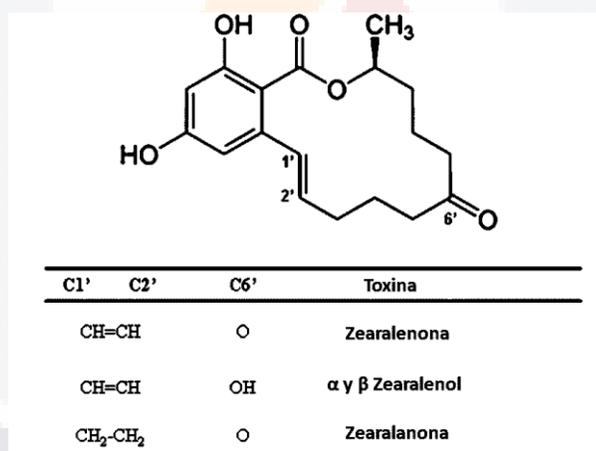


Figura 20. Estructura química de zearalenona (Marin *et al.*, 2010)

Las fumonisinas son policétidos que poseen una estructura de poliol lineal de 20 carbonos (Figura 21), con dos cadenas de ácido tricarbóxico esterificadas en C-14 y C-15 y un residuo de amina en el C-2 (Renaud *et al.*, 2021). Estos compuestos difieren por la presencia o la ausencia de un grupo hidroxilo en los C-5 y C-10. Dentro de esta familia predominan las fumonisinas B₁, B₂ y B₃, la B₁ (FB₁) conforma del 75% al 80% del total, la FB₂ del 15% al 25% y la FB₃ del 3% al 8% (Alexander *et al.*, 2009).

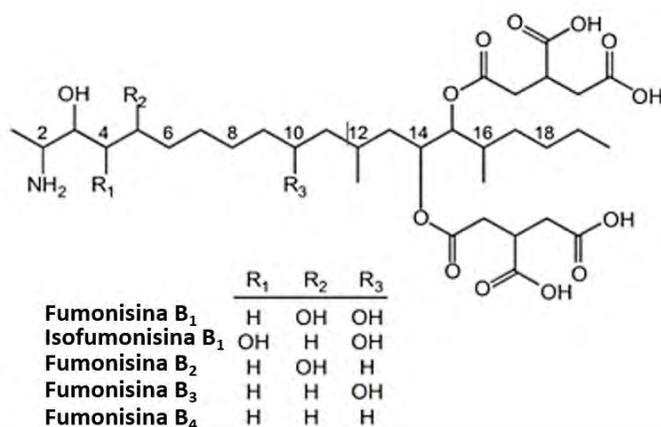


Figura 21. Estructura química de las fumonisinas

Las ocratoxinas son derivados de un resto de isocumarina unido a la fenilalanina por un enlace amida (Figura 22). Las ocratoxinas más importantes son la ocratoxina A (OTA), la ocratoxina B (OTB), la ocratoxina C (OTC) y la ocratoxina α (OT α). El que se encuentra con más frecuencia y el más tóxico es la OTA (Domijan y Peraica, 2010).

Ocratoxina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Ocratoxina A	Fenilalanina	Cl	H	H	H
Ocratoxina B	Fenilalanina	H	H	H	H
Ocratoxina C	Fenilalanina-etil-ester	Cl	H	H	H
Ocratoxina α	OH	Cl	H	H	H

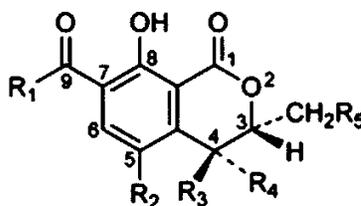


Figura 22. Estructura química de las ocratoxinas (Domijan y Peraica, 2010)

El deoxinivalenol (DON) pertenece a la familia de sustancias químicas conocidas como tricotecenos (Figura 23), compuestos sesquiterpenoides caracterizados por un anillo epoxi en la posición C-12,13 (Pitt, 2014).

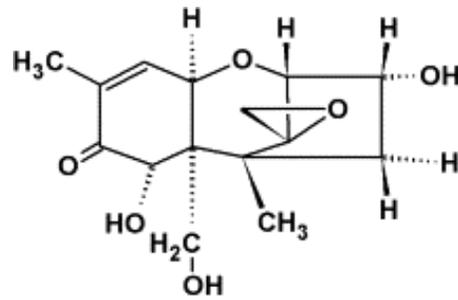


Figura 23. Estructura química del deoxinivalenol

3.5.1. Toxicocinética

La biotransformación de las micotoxinas se define como todas las modificaciones que alteran la estructura de las micotoxinas por reacciones químicas dentro del cuerpo (Loi *et al.*, 2017). La biotransformación a menudo se refiere a la desintoxicación, pero las enzimas de biotransformación también pueden convertir ciertas sustancias químicas en metabolitos altamente tóxicos en un proceso conocido como bioactivación (Beyerle *et al.*, 2015). La biotransformación de micotoxinas implica dos etapas distintas, la fase I y la fase II (Figura 24). El proceso de biotransformación permite que los metabolitos creados durante la fase I entren en procesos de conjugación (fase II), pero en algunos casos, las sustancias pueden eliminarse directamente después de la fase I (Gajecka *et al.*, 2009).

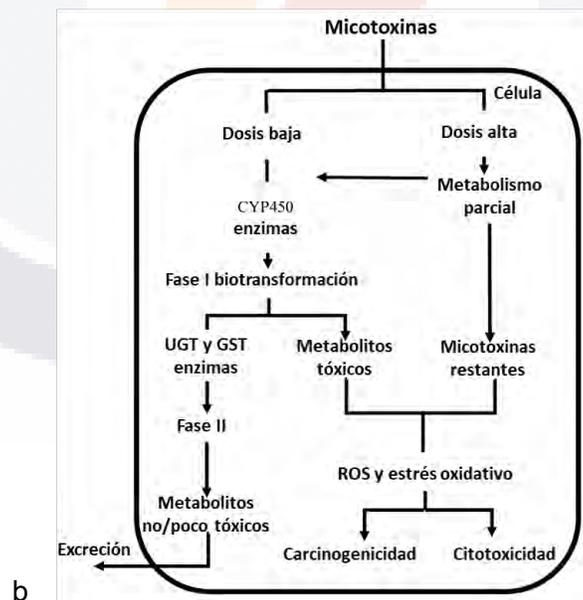


Figura 24. Principales biotransformaciones y efectos celulares adversos de las micotoxinas (Tran *et al.*, 2020). CYP450: Citocromo P450; UGT: uridina 5'-difosfoglucuronosiltransferasa; GST: glutatión S-transferasa; ROS: Especies reactivas de oxígeno.

En la fase I, la micotoxina podría oxidarse, reducirse o hidrolizarse en función de su estructura química (Gajecka *et al.*, 2009). Las enzimas implicadas en la desintoxicación pertenecen a la superfamilia del citocromo P (CYP). La superfamilia CYP contiene las enzimas implicadas en el metabolismo oxidativo, tales como monooxigenasas, prostaglandinas sintasas, aminas oxidasas y alcohol deshidrogenasas; y el metabolismo reductor gobernado principalmente por epóxido hidrolasas y aldehídos o cetonas reductasas (Galtier, 2010). Las enzimas CYP450 juegan un papel importante en el metabolismo oxidativo y reductor de muchos compuestos químicos endógenos o exógenos, incluyendo la mayoría de las micotoxinas (Wen *et al.*, 2016). En los mamíferos, los CYP están presentes en el retículo endoplásmico y las mitocondrias de la mayoría de las células (Beyerle *et al.*, 2015). Entre los CYP, el CYP3A con un contenido medio del 50 al 70% del total de los CYP entéricos es la subfamilia principal que se expresa en el intestino delgado humano (Sergent *et al.*, 2008).

Las reacciones de fase II se conocen como reacciones de conjugación, que generalmente se refieren a la unión covalente de sustancias hidrófilas endógenas como el ácido glucurónico y el sulfato. Las reacciones proporcionan compuestos más hidrófilos, que se eliminan rápidamente. En general, las reacciones de fase II disminuyen la toxicidad. Las enzimas uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferasa (UDP-glucuronosiltransferasa-UGT) y glutatión S-transferasa (GST) desempeñan un papel importante en el metabolismo de fase II (Beyerle *et al.*, 2015; Galtier, 2010).

Aunque el hígado es el principal órgano de desintoxicación, los tejidos extrahepáticos del tracto gastrointestinal (tracto GI), los riñones y la vejiga también muestran actividad metabólica. El tracto gastrointestinal es una primera barrera física para las micotoxinas, pero también influye en el proceso de biotransformación y la biodisponibilidad de las micotoxinas de otras formas. Se ha informado que los microorganismos de los intestinos exhiben la capacidad de degradar las micotoxinas (Du *et al.*, 2017; Ji *et al.*, 2016; Pierron *et al.*, 2016; Young *et al.*, 2007). Además, la glicoproteína P (P-gp) y la proteína de resistencia a múltiples fármacos (MRP), miembros de la superfamilia de proteínas transportadoras del casete de unión a ATP (ABC), son capaces de bombear micotoxinas fuera de las células intestinales, lo que limita la biodisponibilidad de los sustratos (Antonissen *et al.*, 2017; Tran *et al.*, 2020). Tanto el CYP450 como la P-gp en el intestino

juegan un papel crucial en los mecanismos de defensa contra las micotoxinas que llegan a la mucosa intestinal (Sergent *et al.*, 2008).

Las AF se absorben en el duodeno y se transportan al hígado, el órgano más expuesto a la toxicidad de las AF, debido a la primera línea de metabolismo de estas micotoxinas. Sin embargo, las FA también afectan a otros tejidos como el riñón, el páncreas o la vejiga (Benkerroum, 2020). Inicialmente la molécula de AFB₁ no es tóxica, sino hasta la bioactivación de la molécula por las enzimas del citocromo CYP450 (Figura 25) que conduce a la formación del AFB₁-8,9-epóxido (AFBO), una forma reactiva que se une al ADN y a la albúmina en el suero sanguíneo, formando aductos causando daño al ADN, por lo que se considera como sumamente tóxico, mutagénico y carcinogénico (Wen *et al.*, 2016).

La vía metabólica de la AFB₁ también puede dar lugar por cetoreducción a la formación del aflatoxicol que es moderadamente tóxico; por hidroxilación a la formación de AFM₁ que es levemente tóxica y la aflatoxina Q₁ que es relativamente no tóxica; por desmetilación a la aflatoxina P₁, considerada como no tóxica (Gross-Steinmeyer y Eaton, 2012). La desintoxicación del AFBO y de la AFM₁ se realiza mediante la conjugación con glutatión, dicha reacción es catalizada por la glutatión-S-transferasa (GST). El AFBO no conjugado se hidroliza a AFB₁-dihidrodíol, que se convierte reversiblemente en AFB₁-dialdehído. El AFB₁-dialdehído es transformado por las enzimas de la subfamilia 7 de aldoceto reductasa (AKR7) y la epóxido hidrolasa microsomial (mEH) para formar el metabolito no tóxico AFB₁-dialcohol (Deng *et al.*, 2018).

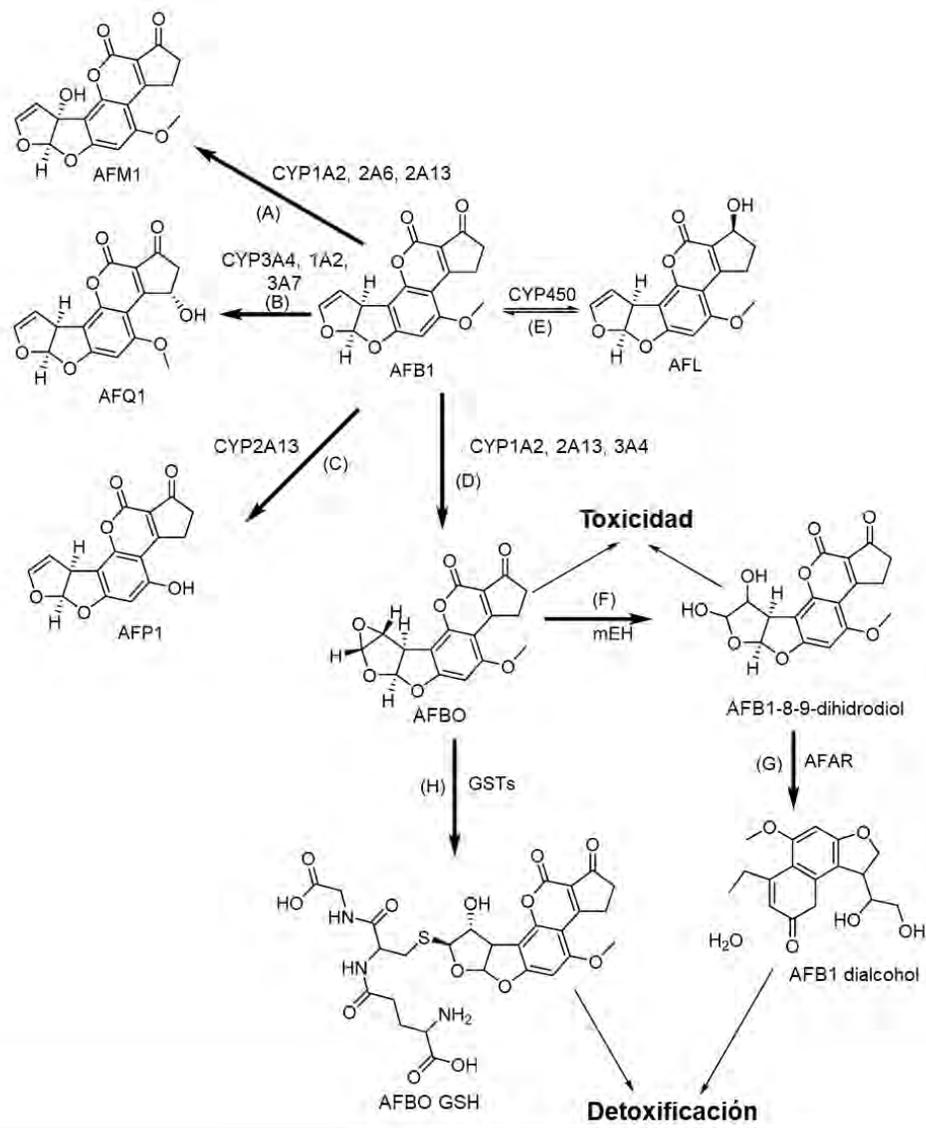


Figura 25. Vía metabólica de la AFB₁. (Deng et al., 2018)

(A) Aflatoxina M₁ (AFM₁) y (B) aflatoxina Q₁ (AFQ₁) por hidroxilación; (C) Aflatoxina P₁ (AFP₁) por desmetilación; (D) AFB₁-8,9-epóxido (AFBO) por epoxidación; (E) Aflatoxicol (AFL) por cetoreducción; (F) AFB₁-8,9-dihidrodiol por epóxido hidrolasa microsomal (mEH); (G) AFB₁-dialcohol por aflatoxina-aldehído reductasa (AFAR); y (H) AFBO-glutiatión (AFBO-GSH) por conjugación con glutatión. CYP: citocromo P; GST: glutatión S-transferasas.

La zearalenona (ZEA) se absorbe con bastante rapidez después de la exposición oral. Una vez ingerida, puede absorberse y metabolizarse mediante hidroxilación a α -zearalenol (α -ZEA) y β -zearalenol (β -ZEA) por acción de enzimas hidroxisteroide deshidrogenasas del citocromo P450 (Figura 26). El α -ZEA, es tres o cuatro veces más estrogénico, y el β -ZEA,

es menos estrogénico que la ZEA (Catteuw *et al.*, 2019). También se produce una biotransformación adicional a conjugados de glucurónido por acción de la uridina 5'-difosfoglucuronosiltransferasa (UGT) para facilitar la eliminación de estas toxinas del cuerpo. La glucuronidación eficaz de la ZEA en el intestino delgado y en el hígado reduce significativamente las cantidades de compuesto original no conjugado (es decir, receptor activo) que llega a la circulación. Sin embargo, la acción de la UGT es inhibida por una alta concentración de ZEA (Videmann *et al.*, 2008). La zearalenona experimenta una extensa circulación enterohepática y excreción biliar en la mayoría de las especies. La principal vía de excreción para la mayoría de las especies es a través de las heces. La zearalenona y los α - y β -zearalenoles se pueden transmitir a la leche de ovejas, vacas y cerdos a los que se les administran altas dosis de zearalenona (M. S. Mostrom, 2012).

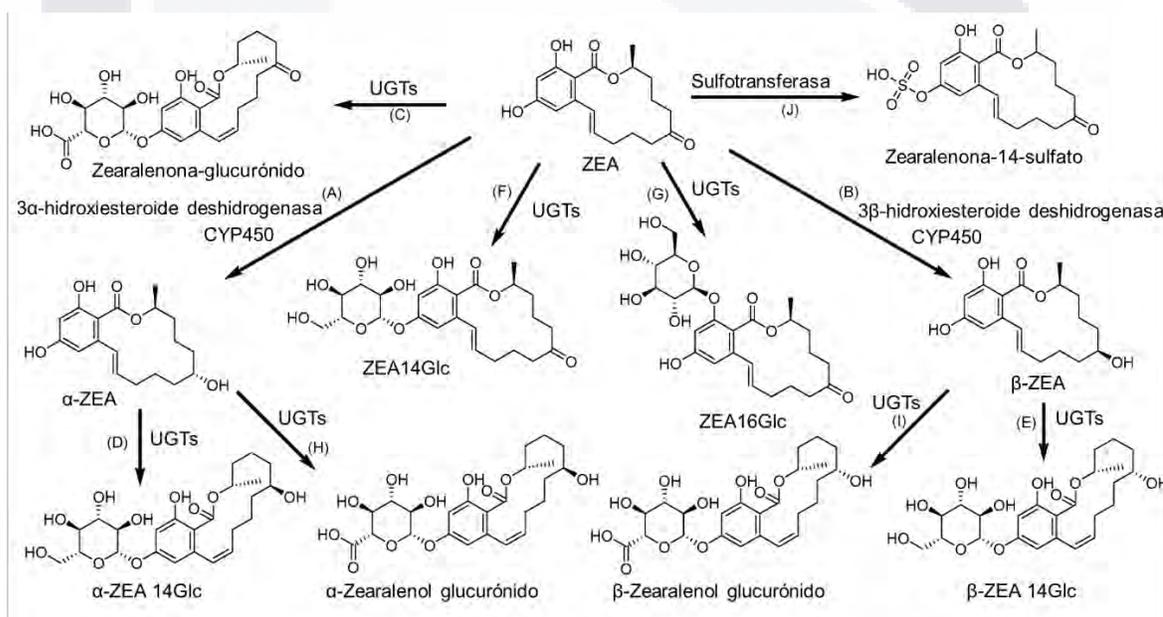


Figura 26. Vía metabólica de zearalenona (Rogowska *et al.*, 2019)

(A) α -zearalenol (α -ZEA) y (B) β -zearalenol (β -ZEA) por hidroxilación; (C) zearalenona-glucurónido, (D) α -zearalenol-glucurónido y (E) β -zearalenol-glucurónido por glucuronidación; (F) zearalenona-14-glucósido (ZEA14Glc), (G) zearalenona-16-glucósido (ZEA16Glc), (H) α -zearalenol-14-glucósido y (I) β -zearalenol-14-glucósido por glucosidación; y (J) zearalenona-14-sulfato por sulfatación. UGT: Uridina 5'-difosfoglucuronosiltransferasas

Después de la ingestión oral, la FB1 se excretan principalmente en las heces, ya sea en forma intacta o convertida en aminopentol (HFB1) o FB1 parcialmente hidrolizado (pHFB1) por acción de la microbiota intestinal (Müller *et al.*, 2012). Existen pruebas de que

la microbiota fecal humana es capaz de degradación de FB1, y los patrones de fragmentación de LC-MS/MS indicaron biotransformación microbiana a FB1 hidrolizado y parcialmente hidrolizado (Daud *et al.*, 2020). Las enzimas del complejo CYP no metabolizan la FB1. Además, la FB1, es un inhibidor selectivo de CYP2C11 y CYP1A2, mientras que las actividades de CYP2A1: 2A2, CYP2B1: 2B2, CYP3A1: 3A2 y CYP4A no se ven afectadas significativamente. La inhibición significativa de CYP2C11 podría estar relacionada con la actividad de la proteína quinasa suprimida como resultado de la inhibición de la biosíntesis de esfingolípidos causada por FB1 (Dellafiora *et al.*, 2018). La FB1, HFB1 y pHFB1 pueden acetilarse para formar fumonisinas *N*- acetiladas con ácidos grasos de diversas longitudes (Figura 27), existen evidencias de que las formas *N*- acilo son más tóxicas que la FB1 original (Harrer *et al.*, 2013).

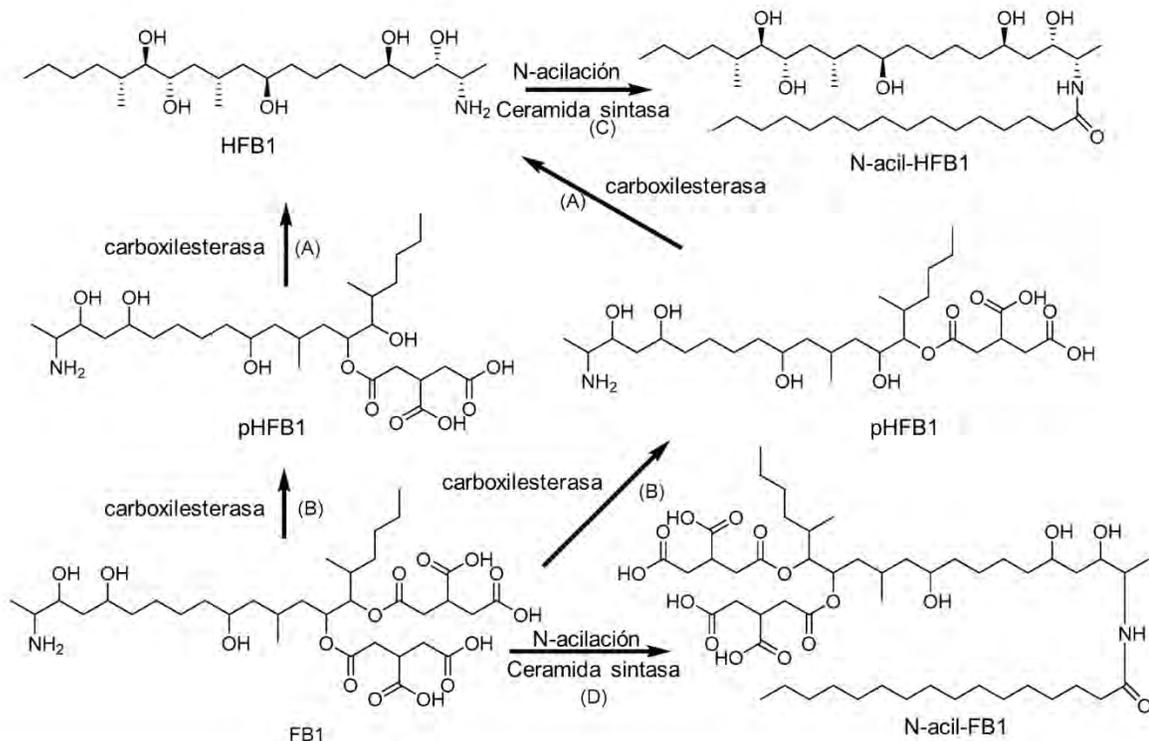


Figura 27. Vía metabólica de la fumonisina B1 (Dellafiora *et al.*, 2018; Harrer *et al.*, 2013).

Vía metabólica de la fumonisina B1 (FB1): (A) aminopentol (HFB1) y (B) FB1 parcialmente hidrolizado (pHFB1) por hidrólisis; (C) N-acil-HFB1 y (D) N-acil-FB1 mediante N-acilación.

El deoxinivalenol DON no es un sustrato del metabolismo de fase I, se biotransforma en la fase II (Schelstraete *et al.*, 2019). Los principales metabolitos (Figura 28) del DON incluyen

los conjugados DON glucurónico y sulfato y (DOM-1) el deepoxi-desoxinivalenol (Payros *et al.*, 2016). El DON se conjuga con glucósidos o sulfonatos para formar DON-3-glucósido (D3G); sulfonatos de DON, DOM y D3G; y glucurónidos DON-3-, DON-7-, DON-8- y DON-15- identificados en porcinos, ratas, pollos, bovinos y humanos (Schwartz *et al.*, 2013; Q.-H. Wu *et al.*, 2014). Se ha informado que en cereales existen otros productos de biotransformación del DON, incluidos los conjugados de DON-glutación y los productos de la degradación del glutatión, como DON-S-cisteinil-glicina y DON-S-cisteína. Gracias a la microflora intestinal, el DON podría metabolizarse en animales y seres humanos, pero no depositarse en los tejidos (Gao *et al.*, 2020).

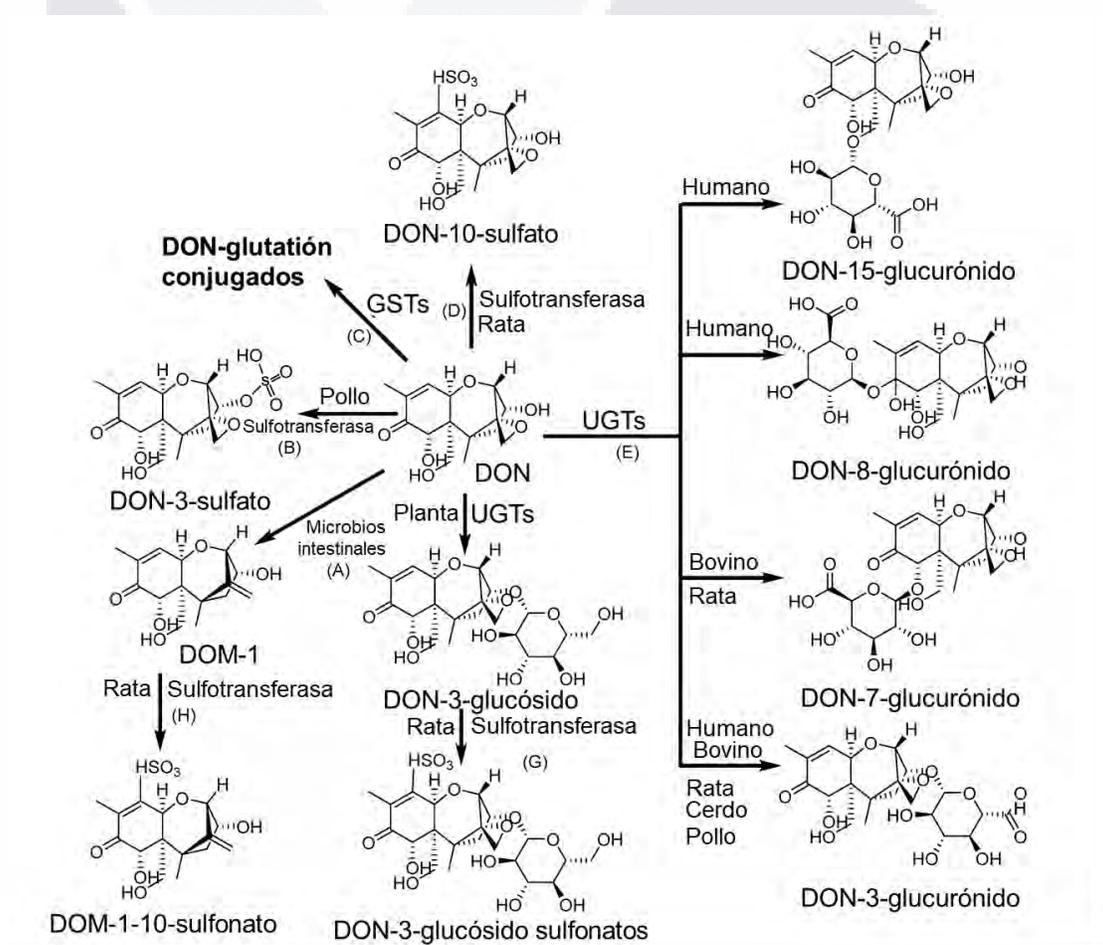


Figura 28. Vía metabólica del deoxinivalenol (Q.-H. Wu *et al.*, 2014)

(A) Deepoxi-desoxinivalenol (DOM-1) por deepoxidación; (B) DON-3-sulfato, (D) DON-10-sulfato, (G) DON-3-glucósido sulfonato y (H) DOM-1-10-sulfonato por sulfatación; (C) DON-glutaciones por conjugación con glutatión; (E) DON-3-glucurónico, DON-7-glucurónico, DON-8-glucurónico y DON-15-glucurónico mediante conjugación con ácido glucurónico; y (F) DON-3-glucósido por conjugación con glucosa. GST: glutatión S-transferasas; UGT: Uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferasas

La OTA se absorbe principalmente en el tracto gastrointestinal y se une a la albúmina sérica en la sangre. En animales y humanos, la OTA puede ser metabolizada por enzimas de fase I y fase II a muchos productos diferentes en el hígado, riñón e intestino (Figura 29). La mala biotransformación y la lenta eliminación de metabolitos contribuyen a la toxicidad, carcinogenicidad y especificidad orgánica de la OTA (Lyagin y Efremenko, 2019; J. Wu *et al.*, 2013). En el intestino, la ocratoxina α (OT α), un metabolito principal, es formado por carboxipeptidasas, que escinden el enlace peptídico en la OTA (Wen *et al.*, 2016). Otros metabolitos principales de la OTA son 4-hidroxi-ocratoxina A (4-OH-OTA) y 10-hidroxiocratoxina A (10-OH-OTA). Se han identificado en la orina de ratas y también son producidos por humanos, cerdos, microsomas de hígado de cabra, pollo, rata y conejo o células epiteliales bronquiales humanas in vitro (Ringot *et al.*, 2006; Q. Wu *et al.*, 2011). La mayoría de los metabolitos de la OTA, como OT α , OTB, 4-OH-OTA y 10-OH-OTA, son menos tóxicos que el compuesto original (J. Wu *et al.*, 2013). Sin embargo, la apertura del anillo de lactona en condiciones alcalinas (llamada OTA abierta con lactona), que se encuentra en los roedores, conduce a metabolitos más tóxicos que la propia OTA. Estas reacciones de tipo de fase I probablemente se relacionan con la acción de la familia de enzimas CYP450, incluidas CYP1A1, CYP1A2, CYP3A1, CYP3A2, CYP3A4, CYP3A5, CYP2B6 y CYP2C9 (Tao *et al.*, 2018).. La biotransformación de fase II ocurre principalmente en el hígado con la conjugación de OTA con sulfato, glucurónido, hexosa/pentosa y glutatión (Kőszegi y Poór, 2016).

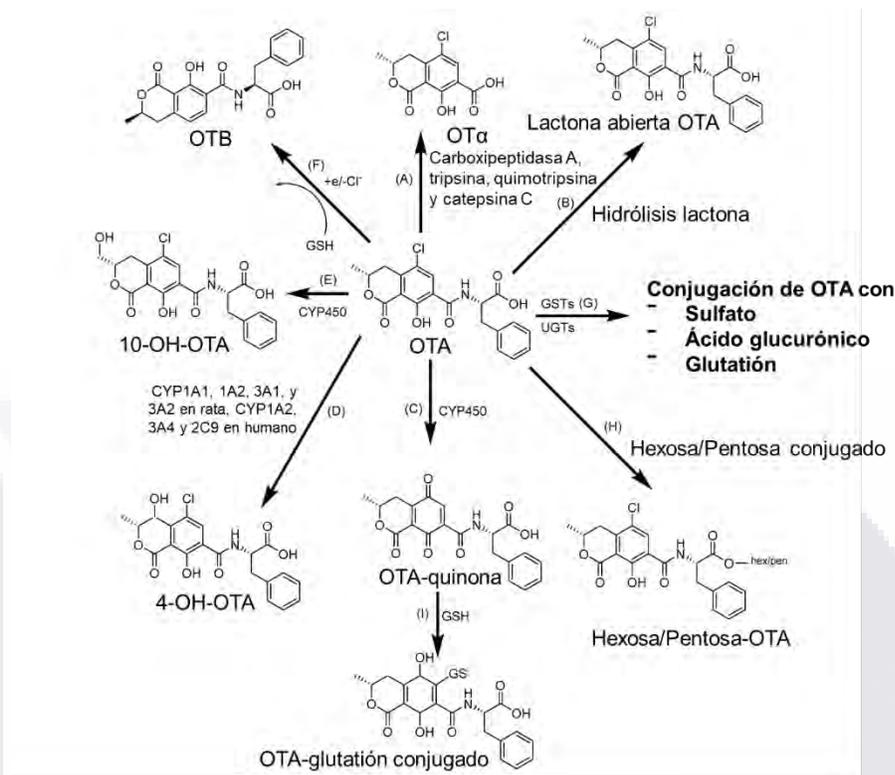


Figura 29. Vía metabólica de Ocratoxina (Kószegi y Poór, 2016)

(A) OTα por escisión del enlace peptídico de OTA; (B) OTA abierta con lactona mediante hidrólisis de lactona; (C) OTA-quinona por oxidación; (D) 4-hidroxi-ocratoxina A (4-OH-OTA) y (E) 10-hidroxiocratoxina A (10-OH-OTA) por hidroxilación; (F) OTB por decloración; (G) OTA-glutatión, OTA-glucurónido y OTA-sulfato por conjugación con glutatión (GSH), ácido glucurónico y sulfato; (H) Hexosa / pentosa-OTA por conjugación con hexosa/pentosa, (I) OTA-glutatión por conjugación con glutatión. CYP450: Citocromo P450; GST: glutatión S-transferasas; UGT: Uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferasas

3.5.2. Metabolismo de micotoxinas en el rumen

Los rumiantes tienen un microbioma diverso y complejo en el rumen donde los alimentos ingeridos se digieren y fermentan. Los rumiantes pueden desarrollar mecanismos de adaptación a través de microorganismos del rumen para neutralizar los efectos de metabolitos secundarios tóxicos. Estas toxinas no son tóxicas contra los microorganismos del rumen y algunas pueden utilizarse como fuentes de energía para que determinadas poblaciones microbianas del rumen se adapten a las toxinas (McSweeney y Mackie, 2012), y la capacidad de desintoxicación depende en gran medida de la cantidad de toxina consumida (Krause *et al.*, 2005).

Las poblaciones microbianas del rumen pueden cambiar gradualmente con una exposición prolongada y creciente a las toxinas, lo que permite una tolerancia gradual de la

toxicidad en los rumiantes. Las vías de degradación de una toxina en la mayoría de los casos involucran a un consorcio de microorganismos del rumen, ya que las enzimas involucradas pueden no estar presentes en una sola especie bacteriana del rumen (Wadhwa *et al.*, 2016). Sin embargo, el microbiota ruminal del ganado no puede desintoxicar todas las micotoxinas. Además, la desintoxicación puede verse obstaculizada por condiciones ruminales adversas, como pH ruminal bajo (Debevere *et al.*, 2020).

La zearalenona puede sufrir un metabolismo ruminal, con reducción a principalmente α -zearalenol y a una menor cantidad de β -zearalenol. El α -ZEL es un estrogénico que puede ser hasta 60 veces más potente que la ZEA (Gruber-Dorninger *et al.*, 2021). El aumento o disminución de la toxicidad de la zearalenona en el metabolismo del rumen depende de la absorción por el tracto gastrointestinal, el metabolismo hepático por la hidroxisteroide deshidrogenasa y la competencia en los sitios receptores citosólicos (Mostrom, 2011). El deoxinivalenol se degrada a DOM1 en el rumen por acción de las bacterias ruminales (Schatzmayer *et al.*, 2006).

En el caso de la ocratoxina, los microorganismos del rumen pueden hidrolizar el enlace amida para producir OTA α , que tiene una toxicidad más baja, y fenilalanina. El hecho de que los animales jóvenes con rumen desarrollado se vean afectados mucho menos por OTA que los terneros prerumiantes indica la importancia de la degradación ruminal de la OTA (Mobashar *et al.*, 2010). Sin embargo, la capacidad de desintoxicación del rumen puede ser superado en casos de intoxicación grave (Loh *et al.*, 2020).

3.6. MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICOTOXINAS

La detección de micotoxinas se basa principalmente en sus características de solubilidad en diferentes solventes y en sus propiedades fluorescentes. Las técnicas de análisis pueden ser cromatográficas o inmunoquímicas (Miklós *et al.*, 2020). Diversos organismos internacionales como la AOAC (Association of Official Analytical Chemists), CEN (Comité Europeo de Normalización) o la ISO (Organización Internacional de Normalización) elaboran y validan métodos analíticos para la detección de micotoxinas (Bessaire *et al.*, 2019).

3.6.1. Extracción de micotoxinas

Las aflatoxinas, la zearalenona y los tricotecenos son solubles en solventes polares como metanol, acetona, cloroformo y acetonitrilo. Por lo que la extracción implica el uso de

solventes orgánicos mezclados en diferentes proporciones con agua (Bertuzzi *et al.*, 2012). Para el caso de las fumonisinas, que se pueden obtener altas eficiencias de extracción para aumentando la fracción de agua y/o disminuyendo el pH de la mezcla de extracción (Paepens *et al.*, 2005)

3.6.2. Técnica de ELISA

La técnica de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) es una prueba rápida, proporciona resultados en poco tiempo. Se suelen utilizar pruebas ELISA de tipo competitivo para la detección de micotoxinas, ya que son fáciles de realizar y proporcionan una medida útil de la concentración de antígenos o anticuerpos y también son muy sensibles (Singh y Mehta, 2020). El objetivo de la técnica ELISA es la determinación cualitativa o cuantitativa de las micotoxinas que se encuentran en la muestra, a partir de la aplicación de anticuerpos que son específicos de los compuestos a analizar. El método se basa en una reacción de color ligada a enzimas. En consecuencia, la intensidad de color medida es inversamente proporcional a la concentración del compuesto medido, con base a una curva de calibración realizada a partir de la lectura de la absorbancia de estándares de aflatoxinas con concentración conocida (Yanan Wang *et al.*, 2022).

3.6.3. Técnica TLC

La cromatografía en capa fina (TLC) también conocida como cromatografía plana, es una técnica simple, económica y muy utilizada en el análisis de micotoxinas. Desde 1990 se ha considerado como un método oficial de la AOAC y el método elegido para identificar aflatoxinas a niveles tan bajos como 1 ng/g (Salisu *et al.*, 2021). Consiste en una fase estacionaria hecha de sílice, alúmina o celulosa inmovilizada en un material inerte como vidrio o plástico, llamado matriz. La fase móvil está compuesta por una mezcla de metanol:acetonitrilo:agua, que transporta la muestra a medida que se mueve a través de la fase estacionaria sólida. La distribución de micotoxinas entre las fases móvil y estacionaria se basa en las diferencias de solubilidad de los analitos en las dos fases. La cuantificación se logra por comparación visual bajo la luz ultravioleta, empleando estándares de referencia con concentración conocida del metabolito de interés (M. Abbas, 2021).

3.6.4. Técnica HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica cromatográfica más popular para la separación y determinación de compuestos orgánicos, utiliza una fase estacionaria confinada a una columna y una fase móvil que comprende disolventes acuosos/orgánicos, que fluyen a través del adsorbente sólido con ayuda de una presión

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

muy elevada para forzar el paso del solvente por la columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución (Rusli *et al.*, 2022). Esto se logra porque los componentes de las muestras tienen diferentes afinidades por las dos fases y, por lo tanto, se mueven a través de la columna a diferentes velocidades. La fase móvil que emerge de la columna produce fracciones separadas que contienen componentes individuales en la muestra. En la práctica, la técnica de HPLC emplea una fase estacionaria como la columna de cromatografía C-18, una bomba que mueve la fase móvil a través de la columna y un detector que muestra los tiempos de retención de cada molécula (Reuhs, 2017).

3.7. EFECTOS SANITARIOS Y PRODUCTIVOS DE LAS MICOTOXINAS

La intoxicación provocada por la ingesta de alimentos contaminados con micotoxinas se denomina micotoxicosis. La intoxicación puede ser aguda o crónica y los efectos provocados por las toxinas dependen de la dosis ingerida, el tiempo de exposición y el tipo de micotoxina consumida.

3.7.1. Impacto en la salud humana

La exposición alimentaria aguda a AFB₁ se ha relacionado 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 (Steyn y Stander, 1999). Las formas crónicas de aflatoxicosis incluyen: efectos teratogénicos asociados con malformaciones congénitas; efectos mutagénicos donde las aflatoxinas causan cambios (mutaciones) en el código genético, alterando el ADN y estos cambios pueden ser roturas cromosómicas, reordenamiento de fragmentos de cromosomas, ganancia o pérdida de cromosomas completos, o cambios dentro de un gen; el efecto carcinogénico en el que se han identificado los mecanismos carcinogénicos, como el efecto genotóxico donde los carcinógenos electrofílicos alteran los genes a través de la interacción con el ADN y, por lo tanto, se convierten en un potencial daño al ADN y los carcinógenos genotóxicos que en ocasiones son eficaces tras una única exposición, pueden actuar de forma acumulativa o actuar con otros carcinógenos genotóxicos que afectan a los mismos órganos (Wangikar *et al.*, 2005). Se estima que más de 5 mil millones de personas en los países en desarrollo en todo el mundo corren el riesgo de exposición

crónica a aflatoxinas debido al consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas y de estos más de 4 mil millones de personas desarrollan cáncer de hígado relacionado con aflatoxinas, especialmente el carcinoma hepatocelular (Williams *et al.*, 2004).

La zearalenona es una micotoxina con actividad xenoestrogénica, puede ocupar y estimular los receptores estrogénicos y la respuesta inducida es indistinguible de la provocada por el 17 β -estradiol (Tangni y Pussemier, 2007). Se considera un disruptor endocrino ya que afecta la síntesis normal de hormonas esteroides (estradiol, progesterona y testosterona), está ganando atención debido a que existen evidencias de que altera el crecimiento-maduración en los seres humanos y puede contribuir a un aumento de la incidencia de cáncer de mama (Belhassen *et al.*, 2015).

Las fumonisinas fueron clasificadas por el IARC (2002) como posibles carcinogénicos humanos. En humanos la intoxicación por FB₁ se ha asociado a cáncer esofágico y defectos en el cierre del tubo neural (Moreno *et al.*, 2009). El mecanismo de toxicidad de la FB₁ consiste en bloquear la síntesis de esfingolípidos, como consecuencia de la inhibición de la enzima ceramida sintasa, lo que genera la acumulación de compuestos como son esfingonina y esfingosina en las células hepáticas y renales, lo que provoca efectos metabólicos como apoptosis mitocondrial, alteración de los esfingolípidos implicados en la síntesis y transporte, degeneración de tejidos ricos en esfingolípidos y aumento del estrés oxidativo y la peroxidación lipídica (Ahangarkani *et al.*, 2014).

La exposición aguda al deoxinivalenol o sus derivados, se ha relacionado con la aleukia tóxica alimentaria (ATA), que es una intoxicación caracterizada por vómito, inflamación de la piel y daño a los tejidos hematopoyéticos, se acompaña de necrosis en la cavidad oral, sangrado de la nariz, de la boca y la vagina, además de trastornos del sistema nervioso central y digestivo comprometiendo la integridad del epitelio y de las células inmunes a nivel intestinal, generando así altas tasas de mortalidad dada su predisposición a infecciones oportunistas (Pinton y Oswald, 2014).

En mujeres embarazadas, la exposición prolongada a la ingesta de ZEA puede provocar una disminución de la supervivencia del embrión y una reducción del peso del feto, así como una disminución de la producción de leche. En las mujeres, la ZEA provoca una alteración en la morfología de los tejidos del útero y una reducción de LH y progesterona. En los hombres, también se reducen la testosterona, el peso de los testículos y la espermatogénesis. Otras propiedades tóxicas asociadas con ZEA incluyen hepatotoxicidad e inmunotoxicidad. La ZEA, también es hematotóxica y produce disfunción

en la coagulación y modificación de los parámetros sanguíneos. Varios autores han señalado que ZEA también es genotóxica, ya que puede formar aductos de ADN (Gil-Serna *et al.*, 2014).

El principal efecto de la Ocratoxina es la nefrotoxicidad, sin embargo, también produce daños en el hígado (hepatotoxicidad) que conllevan a la acumulación de glucógeno en los tejidos hepáticos y musculares. Existen evidencias también de su efecto teratogénico e inmunotóxico. Además, tiene sinergismo contra otras micotoxinas nefrotóxicas como la citrinina (Ostry *et al.*, 2013). El metabolismo toxicológico de la OTA esta mediado por la inhibición del factor nuclear eritroide (Nrf2) y la transcripción del gen (Nrf2), lo que genera estrés oxidativo, producción de especies reactivas de oxígeno que inducen a la inhibición de la síntesis proteínica, interferencia en los sistemas metabólicos, la peroxidación de lípidos de la membrana, perturbación de la homeostasis del calcio, inhibición de la respiración mitocondrial y daño del DNA (Limonciel y Jennings, 2014).

3.7.2. Impacto en la salud animal y producción

En el ganado lechero, las intoxicaciones por micotoxinas ya sean agudas o crónicas producen múltiples efectos biológicos y fisiológicos, que afectan no solo la salud de los animales, sino también su productividad (Cuadro 12).

Cuadro 12. Efectos fisiológicos y productivos de las micotoxinas en las vacas lecheras

Micotoxina	Efectos fisiológicos y/o biológico	Efectos productivos
Aflatoxina	Necrosis hepática, nefritis, congestión pulmonar, daño celular, hepatotoxicidad, carcinogenicidad, teratogenicidad, mutagenicidad, Inhibición de síntesis de proteínas, estrogenicidad, inmunotoxicidad, nefrotoxicidad y neurotoxicidad	Inmunosupresión, contaminación de leche por residuos, disminución de producción de leche, gastroenteritis, hemorragias intestinales, deterioro de la función de rumen, diarrea y cetosis
Zearalenona	Estrogenicidad, inmunotoxicidad, hiperestrogenicidad	Inmunosupresión, celos irregulares, bajas tasa de concepción, quistes ováricos, pérdidas embrionarias, abortos, vulvovaginitis, cambios puberales precoces, preñez ficticia,
Deoxivalenol	Factor emético y de rechazo del alimento, efecto hemolítico en eritrocitos, inhibición de síntesis de ADN, ARN y proteínas a nivel ribosomal	Menor consumo de alimento, menor eficiencia alimenticia, contaminación de leche por residuos, menor producción de leche

Fumonisina	Inhibición de la síntesis de esfingolípidos, neurotoxicidad (leucoencefalomelacia), hepatotoxicidad, potencial carcinogénico, inmunotoxicidad nefrototoxicidad, lesiones cardíacas, cáncer esofágico	Menor consumo de alimento, menor eficiencia alimenticia, blastogénesis de linfocitos
Ocratoxina	Nefrototoxicidad, posible carcinogenicidad, teratogenicidad e inmunotoxicidad, inhibición de síntesis de proteínas	Inmunosupresión, residuos de la micotoxina en leche, disminución de consumo de piensos, aumento de consumo de agua

Elaboración propia a partir de (del Palacio *et al.*, 2016; Espíndola, 2006; Pitt y Hocking, 2009; Pittet, 1998; Ramos Girona *et al.*, 2020)

3.7.3. Impacto económico

El impacto económico de las micotoxinas es enorme, estimándose que casi el 25% de las cosechas a escala mundial es afectado anualmente por hongos toxigénicos, que generan problemas al reducir la capacidad nutritiva del cereal en los alimentos, aumentan los costes de producción y la mortalidad e incrementan la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas (FAO, 2003).

Se ha estimado que a nivel mundial las micotoxinas, especialmente las aflatoxinas, provocan pérdidas anuales millonarias en los diferentes ámbitos: producción agrícola, producción pecuaria, salud animal y humana; en Estados Unidos de Norteamérica, se estima que, las pérdidas por cereales contaminados ascienden a 900 millones de dólares al año (Martínez Padrón *et al.*, 2013). Las pérdidas económicas atribuidas a las micotoxinas son muy cuantiosas, ya que, a las generadas en el ámbito agrícola por contaminación de cosechas, se suman las derivadas de su efecto inmunotóxico sobre la salud humana.

3.8. REGULACIÓN LEGISLATIVA DE MICOTOXINAS

La exposición a las aflatoxinas es principalmente un problema en los países pobres y en desarrollo debido a la escasez de regulaciones legislativas, supervisión deficiente en el procesamiento y almacenamiento de alimentos, así como a altos niveles de desnutrición. La ausencia regulaciones está relacionada principalmente con datos insuficientes sobre la presencia de micotoxinas. La exposición a las micotoxinas debe mantenerse lo más baja posible para proteger a las personas. Las micotoxinas no solo representan un riesgo para

la salud humana y animal, sino que también afectan la seguridad alimentaria y la nutrición al reducir el acceso de las personas a alimentos saludables.

Las reglamentaciones varían según las normativas de los países o comunidades de comercialización internacional a las que pertenecen (Unión Europea, Mercosur, etc.). No existe una legislación internacional al respecto y en algunos países ni siquiera existen normativas vigentes para su control. Al menos 99 países tienen reglamentos para las micotoxinas en los alimentos o las raciones, la población total de estos países representa el 87% de los habitantes del mundo (FAO, 2004).

En muchos países y regiones se han establecido reglamentos en piensos relacionados con las micotoxinas para proteger al consumidor de los efectos nocivos de estos compuestos (Cuadro 13).

Cuadro 13. Límites de micotoxinas en piensos para ganado lechero

Micotoxina(s)	LMP UE (µg/kg)	LMP FDA (µg/kg)	LMP (NOM) (µg/kg)	LMP (Mercosur) (µg/kg)
Aflatoxinas (tot)	---	20	100	20
Aflatoxina B ₁	5	---	---	---
Zearalenona	500	400**	---	---
Deoxinivalenol	500	500	---	---
Fumonisinás	5000 (B ₁ +B ₂)	3000*(B ₁ +B ₂ +B ₃)	---	---
Ocratoxina	250 (A)	---	---	---

LMP: Límite máximo permisible, UE: Unión Europea, NOM (Norma Oficial Mexicana)

*Granos y productos que no excedan el 50% de la dieta

** Dato no contemplado por la FDA (Propuesto por la Universidad de Missouri en Columbia y la Universidad Estatal de Dakota del Norte)

3.9. CLIMA

3.9.1. Condiciones climáticas en Aguascalientes

Aguascalientes se localiza entre los paralelos 21.61 y 22.45° de latitud norte y entre los meridianos -101.816 y -102.866° de longitud oeste. Colinda con los estados de Jalisco y Zacatecas. El clima en el estado de Aguascalientes es predominantemente semiseco en casi un 87% del territorio, frío en un 12% y templado en menos del 1%. La temperatura media anual es de 17.4°C, la temperatura mínima media es de 9.6°C y la temperatura máxima media es de 26.5°C. La holgura térmica entre las temperaturas mínimas y las máximas es muy amplia durante todos los meses del año. El régimen térmico más cálido

se registra en mayo con una temperatura media de 22°C y enero es el más frío con una temperatura media de 13°C (INEGI, 2021).

La precipitación pluvial total es de 526 mm al año. El periodo de lluvias se presenta durante el verano en los meses de junio a octubre, con bajas precipitaciones en los restantes meses del año, siendo marzo el de menor nivel, alrededor de 4mm. EL nivel de evaporación excede al de precipitaciones, por lo que la producción agrícola requiere de riego. El periodo de heladas comprende de noviembre a febrero y se presentan dentro de un rango de 20 a 40 días al año (INEGI, 2021).

3.9.2. Influencia ambiental en el crecimiento de hongos toxigénicos y producción de micotoxinas

Aspergillus es más frecuente en los trópicos, *Fusarium* abunda más en climas fríos y *Penicillium* predomina en zonas templadas. Las condiciones climáticas en regiones, principalmente tropicales o subtropicales, facilitan la contaminación de los cultivos por aflatoxinas. La infestación de plantas de cultivo con *Aspergillus* spp. y la producción de aflatoxinas en la planta en crecimiento se ve favorecida por el estrés por sequía, es decir, los períodos de alta temperatura y baja humedad. Por otro lado, la exposición a altas temperaturas y mucha humedad antes de la cosecha y durante el almacenamiento de los cultivos facilita el crecimiento de hongos y la producción de aflatoxinas.

Las lluvias y las temperaturas suaves durante los períodos de floración y maduración favorecen la infestación del trigo y el maíz con *F. graminearum* y *F. culmorum* y la subsecuente contaminación por DON. La infestación del maíz con *F. verticillioides* y la consiguiente contaminación por fumonisinas se ve facilitada por las altas temperaturas y la baja precipitación alrededor del estigrado (llenado de grano). Las precipitaciones durante el principal período estigmatizante del maíz favorecen la producción de DON y ZEN (Gruber-Dorninger *et al.*, 2019). En climas templados generalmente, *Penicillium* spp. es el género más importante en la producción de OTA y en climas tropicales, el más importante es *Aspergillus* spp. (Yan Wang *et al.*, 2016).

3.9.3. Efecto de cambio climático en el fenómeno de contaminación por micotoxinas

El cambio climático se define como el conjunto de alteraciones que se presentan en el clima a nivel global, tales como, periodos prolongados de sequía, cambios en el patrón pluvial,

lluvias torrenciales y calentamiento global. Dichos cambios son efecto de la acumulación de gases en la atmósfera, principalmente de dióxido de carbono (Useros, 2013).

El cambio climático representa un riesgo para la inocuidad de los alimentos, lo que pone en peligro la salud pública. La variabilidad climática afectará la persistencia de bacterias, virus, parásitos, algas nocivas, hongos y sus vectores. La temperatura, la humedad y la acidez son factores determinantes en el crecimiento de los hongos toxigénicos y la biosíntesis de micotoxinas (Kebede *et al.*, 2020; Magan y Medina, 2016). Se pronóstica un cambio en los patrones de aparición de micotoxinas, las zonas sujetas a contaminación cambiarán y regiones que en la actualidad presentan baja incidencia serán propensas a la aparición de hongos y producción de micotoxinas (Assunção *et al.*, 2018).

En México a partir de la década de 1960, se han registrado varios cambios, como el aumento de 0.85°C en la temperatura promedio y de 1.3°C en las temperaturas invernales, disminución de la precipitación pluvial en la región sureste, disminución de los días frescos y aumento de las noches cálidas. Para el año 2100, se pronostica un aumento de 4°C en la zona fronteriza con Estados Unidos de América y de 2.5 a 3.5°C en el resto del país (INECC, 2013). En Aguascalientes también se han registrado cambios. La temperatura media anual, de 1950 a la fecha, aumentó 0.7°C aproximadamente (Figura 30).

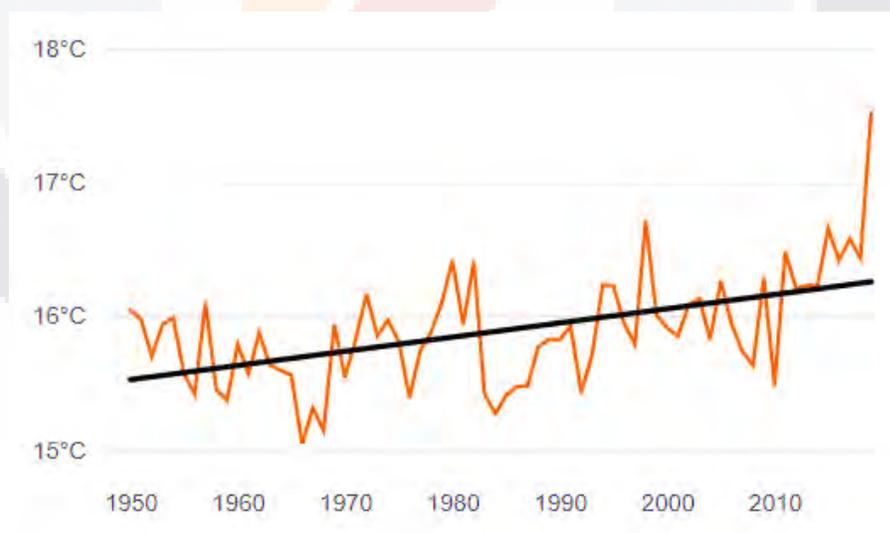


Figura 30. Temperatura promedio por año (NOOA, 2021)

Se estima que las precipitaciones disminuirán un 10% en la mayoría del territorio nacional, aunque en algunas zonas podría ser más severa la disminución. La mayor parte del país se volverá más seca y las sequías serán más frecuentes (Cavazos *et al.*, 2013). En cuanto al impacto del cambio climático en la actividad agrícola, se espera que el cultivo de maíz disminuya su producción para la década de 2050 y que la mayoría de los cultivos resulten menos adecuados para la producción en México hacia el 2030 cuya situación se agravará para finales del siglo (INECC, 2013). Se estima, que por cada grado que aumente la temperatura media mundial el rendimiento agrícola se reducirá un 6% (OMS, 2019).



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO METODOLÓGICO

El presente estudio se realizó mediante un diseño descriptivo longitudinal a fin de evaluar la contaminación de las raciones destinadas a la alimentación de vacas lecheras por las principales micotoxinas y hongos toxigénicos de interés pecuario, así como la influencia de la variación meteorológica de las distintas épocas del año en dicha contaminación. Para lo anterior, se recolectaron muestras mensuales durante 12 meses (mayo de 2021 a abril de 2022). La información meteorológica (temperatura, humedad relativa y precipitación pluvia, etc.,) se obtuvo de los datos recabados por la red de estaciones agrometeorológicas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y Comisión Nacional del Agua (CONAGUA).

4.2. POBLACIÓN BAJO ESTUDIO

4.2.1. Ubicación espacio temporal

El estudio se realizó en el estado de Aguascalientes. Las muestras de RTM se recolectaron mensualmente de mayo de 2021 a abril de 2022, en 10 unidades de producción lechera del estado (Figura 31).

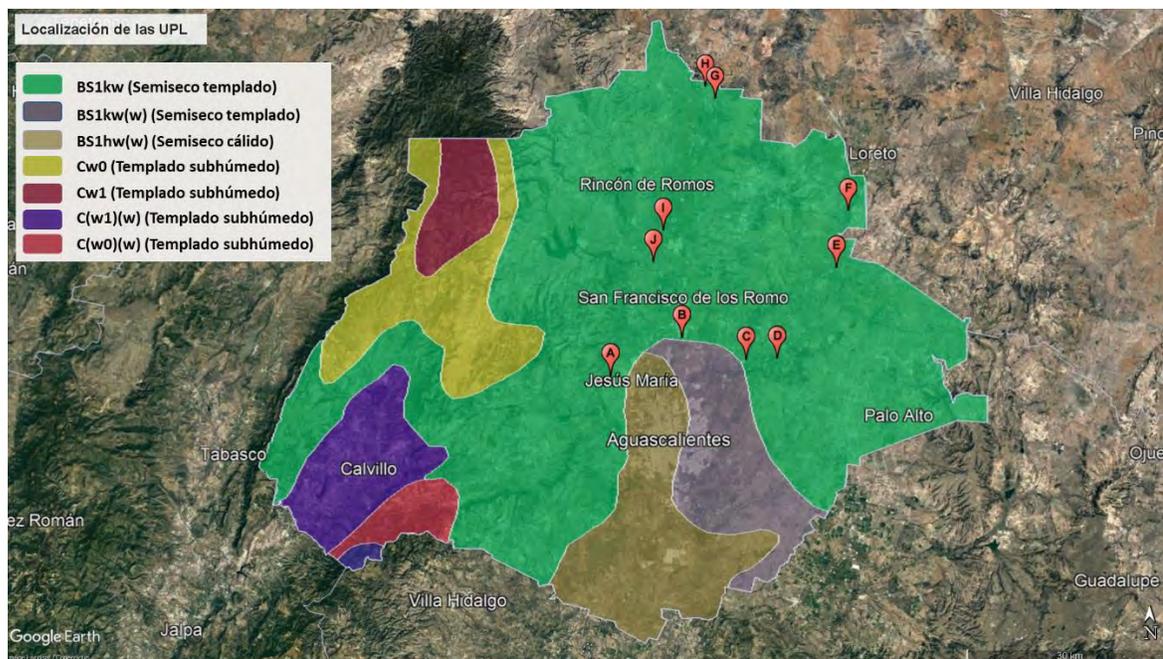


Figura 31. Localización UPL de estudio

4.2.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

Se seleccionaron 10 establos de los padrones SADER (DPAI), la AGLPLA, centros de acopio LICONSA y Grupo San Jacinto, que proporcionaron el permiso para la toma de muestra de la RTM, leche cruda 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 o unidades en las que fue imposible obtener muestras de RTM sin secuestrante de micotoxinas debido al manejo nutricional.

4.2.3. Métodos de muestreo

Se seleccionaron 10 unidades de producción lechera mediante el método no probabilístico por conveniencia. Las UPL fueron seleccionadas por el método de conveniencia, con base en la disponibilidad de los propietarios para proporcionar el acceso a las instalaciones para la toma de muestras (RTM y leche cruda) y a la información.

4.3. TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y PRUEBAS DE LABORATORIO

4.3.1. Recolección de muestras

4.3.1.1. Recolección de muestras de RTM. Se recolectaron muestras de RTM mensualmente durante un año (mayo de 2021 a abril de 2022). 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 conservó solamente un kg para la identificación y cuantificación de hongos toxigénicos y micotoxinas. Durante el muestreo, se aplicó un instrumento de recolección de datos.

4.3.1.2. 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 pulverizaron 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.

4.3.1.3. Recolección de muestras de leche. Se recolectaron 25 mL de leche cruda cada mes, durante 1 año directo del tanque de almacenamiento. Se utilizaron frascos limpios y desinfectados, los cuales se identificaron y transportaron en condiciones de refrigeración hasta el laboratorio, dónde se conservaron en congelación (-20°C) hasta su análisis.

4.3.2. Aislamiento, identificación y cuantificación de colonias fúngicas

4.3.2.1. Técnica de vaciado en placa por diluciones seriadas. Las muestras molidas de RTM (10 g) se diluyeron en peptona de caseína estéril al 0.1% (90 mL), 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 oscuridad de 27-30°C de 5 a 7 días ([Anexo D](#)).

4.3.2.2. Preparaciones con azul de algodón-lactofenol. Se realizarán preparaciones con azul de algodón-lactofenol ([Anexo E](#)); se tomó una porción de la colonia de interés y se fijó con el lactofenol sobre un portaobjetos estéril. 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 el apoyo de las descripciones especializadas de Barnett y Hunter (1998). Las colonias del género *Aspergillus* se identificaron con la ayuda de las claves taxonómicas de Klich (2002).

4.3.2.3. Cuantificación de UFC fúngicas. En una bitácora se realizará el registro del número de colonias y de los géneros fúngicos identificados en cada muestra de RTM. Se realizó la cuantificación de UFC/g de muestra de RTM con ayuda de una fórmula ([Anexo E](#)). 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).

4.3.3. Cuantificación de aflatoxinas en muestras de RTM por ELISA.

La cuantificación de la concentración de aflatoxinas en las muestras de RTM se realizó mediante kits comerciales de ELISA (R-Biopharm, Alemania). La extracción de micotoxinas se realizó con metanol al 70% siguiendo el procedimiento descrito en el protocolo del Kit. 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 se compararon con una curva de calibración para concentración de aflatoxinas ([Anexo F](#)).

4.3.4. Cuantificación de AFM₁ en muestras de leche cruda por ELISA

La determinación de la concentración de AFM₁ en leche se realizó, de igual forma, mediante el método de ELISA ([Anexo G](#)). empleando el kit comercial (Ridascreen®AflatoxinM1 r-biopharm).

4.3.5. Caracterización toxicológica de aislados micotoxigénicos

4.3.5.1. Capacidad aflatoxigénica de aislados con morfología *Aspergillus flavus* mediante 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 incubarán 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 H](#)).

4.3.5.2. Cuantificación de micotoxinas en aislados con morfología de especies micotoxigénicas. La cuantificación de aflatoxinas de los aislados *Aspergillus* obtenidos de la RTM, se realizó, con kits comerciales de ELISA (R-Biopharm, Alemania). La extracción de aflatoxinas se realizó a partir de los cultivos monospóricos de los aislados compatibles con la morfología de especies micotoxigénicas obtenidos 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 se compararon con una curva de calibración de aflatoxinas ([Anexo I](#)).

4.4. DISEÑO ESTADÍSTICO

4.4.1. Variables y escalas de medición

Se consideraron variables categóricas y cuantitativas, de carácter, zootécnico, meteorológico y toxicológico. Sus características se detallan en el [Anexo J](#).

4.4.2. Proceso de captación de la información

Los datos obtenidos en los muestreos, análisis de laboratorio, aplicación de encuestas y monitoreo de estaciones agrometeorológicas se capturaron en una hoja electrónica de Microsoft Excel® para facilitar su análisis.

4.4.3. Análisis estadístico

Los datos de todas las variables cuantitativas se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) mediante el procedimiento para modelos lineales generales (GLM) del software *Statistical Analysis System* (2004). Para identificar las diferencias significativas en las variables categóricas se realizaron modelos mixtos lineales generalizados la prueba de Chi cuadrada (χ^2). Se consideró un nivel de probabilidad $P < 0.05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS UNIDADES DE ESTUDIO

5.1.1. Caracterización climática

5.1.1.1. Estatal. A nivel estatal la mayor precipitación pluvial se presentó en los meses de julio y septiembre (176.6 y 185.5mm, respectivamente), registrándose un descenso intermedio en la precipitación en el mes de agosto (117.5mm), atribuible al efecto de la canícula. La mayor temperatura media se registró en el mes de junio (21.16°C) y la temperatura media menor en el mes de enero (13.50°C). La mayor variación entre las temperaturas máxima y mínima fue en el mes de diciembre (Figura 32).

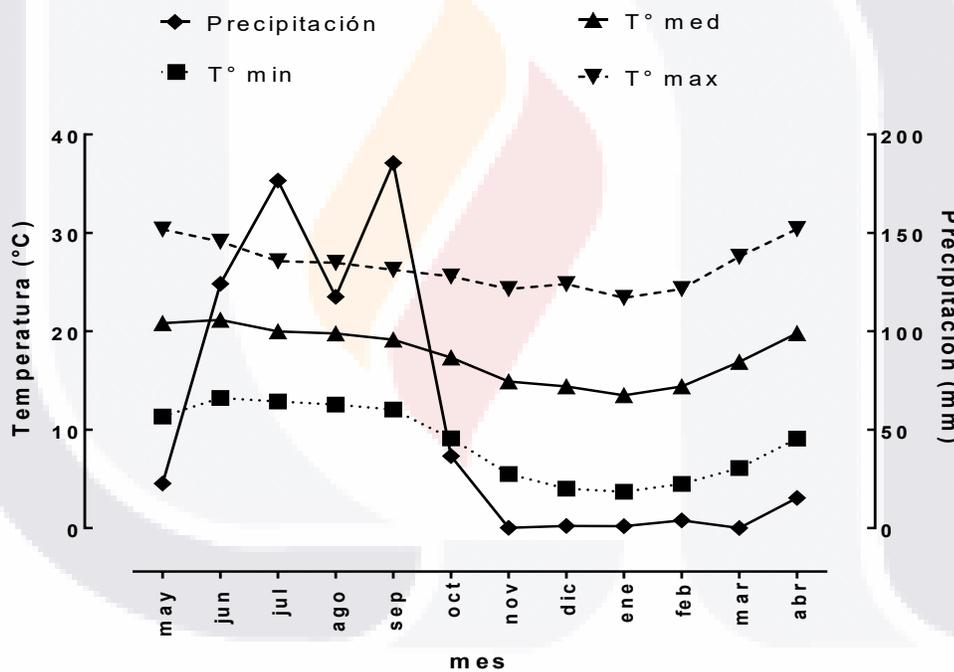


Figura 32. Climograma estatal (mayo 2021-abril 2022)

5.1.1.2. Unidades de estudio. Existieron diferencias ($P < 0.05$) entre los valores medios de temperatura y precipitación en las distintas estaciones del año. Los valores más altos de temperatura (T° min, T° med, T° max) se registraron en primavera y verano; la mayor precipitación pluvial fue en verano (Cuadro 14).

Cuadro 14. Datos promedio por estación del año de temperatura y precipitación en las UPL del estudio

Estación	Temperatura (°C)			Precipitación (mm)
	min	med	max	
Primavera	10.83 ^b ± 0.3	20.08 ^a ± 0.1	29.34 ^a ± 0.1	32.45 ^b ± 3.5
Verano	12.27 ^a ± 0.1	19.49 ^b ± 0.1	26.69 ^b ± 0.1	92.78 ^a ± 2.2
Otoño	5.56 ^c ± 0.4	14.82 ^c ± 0.2	24.10 ^c ± 0.2	17.16 ^c ± 1.4
Invierno	3.82 ^d ± 0.2	13.99 ^d ± 0.2	24.15 ^c ± 0.3	10.72 ^d ± 0.8
Total	8.12	17.10	26.07	38.28

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

5.2. CUANTIFICACIÓN DE AF EN RTM

Se determinó la concentración de AF en 240 muestras de RTM (muestras de 10 UPL de los meses mayo de 2021 a abril de 2022). La concentración media de AF fue de 19.95 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y el 46.25% de las muestras sobrepasó el límite máximo permisible (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$; FAO, 2004; Walte *et al.*, 2016) recomendado para Latinoamérica. El 100% de las muestras sobrepasó el límite de AF de la normativa de la Unión Europea (5 μg ; FAO, 2004).

5.3. CUANTIFICACIÓN DE AFM₁ EN LECHE

Se determinó la concentración de AFM₁ en muestras de leche cruda de las 10 UPL de 12 meses (mayo de 2021-abril 2022). La concentración media de AFM₁ en las muestras de leche cruda fue de 9.40 ng kg^{-1} . Ninguna de las muestras sobrepasó el límite permisible de AFM₁ establecido por la Norma Oficial Mexicana (500 ng kg^{-1} ; NOM-243-SSA-2010). El 1.67% sobrepasó el límite recomendado por la normativa europea para leche de consumo en general (50 ng kg^{-1}) y el 9.17% de las muestras de leche cruda sobrepasó el límite máximo de AFM₁ recomendado para productos lácteos de consumo infantil (25 ng kg^{-1} ; Sharaf, 2016).

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

5.4.1. Factores climáticos

5.4.1.1. Asociación de la estación del año con la concentración de AF en RTM. La concentración de AF en las muestras de RTM fue distinta (P<0.05) entre las estaciones del año. (Cuadro 15). El contenido de AF fue menor en otoño comparado con las otras

estaciones. En otoño, se registró también un menor porcentaje de muestras que sobrepasaron el LMP recomendado para raciones de ganado lechero en Latinoamérica.

Cuadro 15. Cuantificación de AF ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en muestras de RTM recolectadas en las estaciones del año

Estación	Casos	AF ($\mu\text{g/kg} \pm \text{EE}$)	Lim confianza (95%)	> LMP NOM (%)	> LMP UE (%)
Primavera	60	20.94 ^a \pm 0.52	20.23-21-15	51.43	100.0
Verano	60	20.65 ^a \pm 0.64	20.42-21-52	54.29	100.0
Otoño	60	17.45 ^b \pm 0.48	16.87-18.20	22.92	100.0
Invierno	60	20.77 ^a \pm 0.51	19.44-20.35	50.00	100.0
Total	240	19.95 \pm 0.56		46.25	100.0

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

Durante la temporada otoñal, se registraron contenidos menores de AF en la RTM que el resto del año. Esto puede deberse a que, en el Altiplano Mexicano, la mayor producción agrícola ocurre durante el ciclo primavera-verano, por lo que tanto los granos como los forrajes producidos en esa temporada se distribuyen y utilizan en la temporada otoño-invierno. Siendo en el otoño cuando circulan los forrajes de mayor calidad (Vázquez Badillo y Moreno Martínez, 2016). De igual forma, es durante el otoño cuando en la región se empiezan a descubrir los ensilados elaborados con el maíz del ciclo de cultivo primavera-verano anterior; el ensilado de maíz es un ingrediente ampliamente utilizado en las raciones para ganado lechero por su alto aporte energético. Diversos estudios reportan que el tiempo de almacenamiento de los forrajes e ingredientes con los que se elaboran los piensos, se asocia a la contaminación por AF.

5.4.1.2. Asociación de la temperatura media mensual con la concentración de AF en RTM. La contaminación de las raciones por AF fue más elevada ($P < 0.05$) cuando la temperatura media mensual fue mayor o igual a 19.3°C , presentándose dicha condición principalmente en las estaciones de primavera y verano (Cuadro 16). De igual forma la proporción de muestras de raciones que sobrepasó en límite permisible de AF aumentó conforme se incrementó la temperatura media mensual.

Cuadro 16. Concentración de AF ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en muestras de RTM en relación con la temperatura media mensual.

T° Med	Casos	AF ($\mu\text{g kg}^{-1} \pm \text{EE}$)	> LMP NOM (%)	> LMP UE (%)
11.5 - 15.2	80	18.97 ^b \pm 0.37	37.50	100.00
15.3 - 19.2	78	19.76 ^{ab} \pm 0.58	53.59	100.00
\geq 19.3	82	21.10 ^a \pm 0.48	57.32	100.00
Total	240	19.95 \pm 0.56	46.25	100.00

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

5.4.2. Factores zootécnicos

5.4.2.1. Composición de la RTM por tipo de pienso. Se encontró asociación ($P < 0.05$) de la inclusión de los ingredientes en la ración de acuerdo con su clasificación (Cuadro 17). Cuando en las raciones se incluyeron ensilados, la concentración de AF fue mayor a cuando no se incluyeron; sin embargo, las muestras en las que no se incluyeron ensilados fueron muy pocas (sólo 4).

Cuadro 17. Asociación de la inclusión de los tipos de ingrediente con la concentración de AF en la RTM.

Tipo de pienso	Casos	AF ($\mu\text{g kg}^{-1} \pm \text{EE}$)	Lim confianza (95%)	> LMP NOM (%)	> LMP UE (%)
Pajas y alimentos toscos					
Presente	216	20.10 ^a \pm 0.31	19.79-20.40	50.00	100.00
Ausente	24	18.67 ^a \pm 0.60	18.07-19.27	45.83	100.00
Forrajes frescos					
Presente	10	14.52 ^b \pm 0.88	13.64-15.40	0.42	100.00
Ausente	230	20.19 ^a \pm 0.29	19.90-20.47	45.83	100.00
Ensilados					
Presente	230	20.19 ^a \pm 0.29	19.90-20.47	45.83	100.00
Ausente	10	14.52 ^b \pm 0.88	13.64-15.40	0.42	100.00
Granos y semillas					
Presente	120	20.26 ^a \pm 0.48	19.77-20.74	46.67	100.00
Ausente	120	19.65 ^a \pm 0.30	19.35-19.95	45.83	100.00
Concentrados y núcleos proteínicos					
Presente	240	19.95 ^a \pm 0.56	19.39-20.52	46.25	100.00
Ausente	0	- - -	---	---	---
Subproductos					
Presente	120	18.93 ^b \pm 0.43	18.50-19.36	40.83	100.00
Ausente	120	20.98 ^a \pm 0.35	20.63-21.33	51.67	100.00
Total	240	19.95 \pm 0.56	19.39-20.52	46.25	100.00

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

5.4.2.2. Inclusión de ingredientes en la RTM. Se encontró asociación (P<0.05) de algunos ingredientes de uso frecuente en las raciones para ganado lechero con la concentración de AF (Cuadro 18). Cuando en la RTM se incluyó ensilado de maíz o maíz rolado, la concentración de AF fue mayor. Al contrario, cuando se incluyó desecho de destilería, semilla de algodón o melaza, la concentración de AF en la RTM fue menor.

Cuadro 18. Asociación de la inclusión de diferentes ingredientes con la concentración de AF en la RTM.

Ingrediente	Casos	AF ($\mu\text{g kg}^{-1} \pm \text{EE}$)	Lim confianza (95%)	> LMP NOM (%)	> LMP UE (%)
Ensilado de maíz					
Presente	236	20.05 ^a \pm 0.29	19.77-20.34	100.00	100.00
Ausente	4	14.18 ^b \pm 0.47	13.71-14.64	0.00	100.00
Desecho de destilería					
Presente	96	18.99 ^b \pm 0.52	18.47-19.51	33.33	100.00
Ausente	144	20.59 ^a \pm 0.31	20.28-20.91	66.67	100.00
Maíz rolado					
Presente	144	20.59 ^a \pm 0.42	20.18-21.01	67.57	100.00
Ausente	96	18.99 ^b \pm 0.32	18.67-19.32	32.43	100.00
Semilla de algodón					
Presente	26	17.98 ^b \pm 0.74	17.25-18.72	5.41	100.00
Ausente	214	20.19 ^a \pm 0.30	19.89-20.50	94.59	100.00
Melaza					
Presente	48	18.75 ^b \pm 0.38	18.36-19.13	17.12	100.00
Ausente	192	20.26 ^a \pm 0.34	19.92-20.60	82.88	100.00
Total	240	19.95 \pm 0.56	19.39-20.52	46.25	100.00

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

5.4.2.3. Marca de núcleo o concentrado proteínico incluido en la RTM. Se encontró que cuando en la ración se incluyó concentrado y/o núcleo proteínico de la marca C, el contenido de AF fue mayor (P<0.05) en comparación con las otras marcas o el núcleo elaborado por las mismas unidades de producción (Cuadro19).

Cuadro 19. Asociación de la marca de concentrado y/o núcleo proteínico con la concentración de AF en la RTM

Marca de núcleo	Casos	AF ($\mu\text{g kg}^{-1} \pm \text{EE}$)	Lim confianza (95%)	> LMP NOM (%)	> LMP UE (%)
Elaboración propia	72	18.55 ^c \pm 0.57	17.97-19.12	37.5	100.00
A	72	20.07 ^b \pm 0.45	19.62-20.52	52.78	100.00
B	24	19.22 ^{bc} \pm 0.45	18.77-19.67	50.00	100.00

C	72	21.49 ^a ± 0.55	20.95-22.04	46.67	100.00
Total	240	19.95 ± 0.56	19.39-20.52	46.25	100.00

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

5.4.3. Factores agronómicos

5.4.3.1. Empresa proveedora de semilla de maíz con el que se elabora el ensilado. Se encontró asociación (P<0.05) de la empresa de semilla de maíz con la cantidad de aflatoxinas presente en la ración (Cuadro 20). Cuando en la RTM se incluyó ensilado elaborado con maíz con semilla de origen de la empresa E, hubo mayor concentración de AF en comparación a otras empresas semilleras o al maíz criollo.

Cuadro 20. Asociación de la empresa proveedora de semilla de maíz con la concentración de AF en la RTM.

Empresa proveedora de semilla de maíz	Casos	AF (µg kg ⁻¹ ± EE)	Lim confianza (95%)	> LMP NOM (%)	> LMP UE (%)
Criollo	24	18.82 ^b ± 0.49	18.34-19.31	29.17	100.00
A	48	18.91 ^b ± 0.84	18.10-19.75	37.50	100.00
B	24	20.38 ^b ± 0.91	19.47-21.29	58.33	100.00
C	48	18.95 ^b ± 0.37	18.57-19.32	45.83	100.00
D	48	18.96 ^b ± 0.56	18.40-19.52	39.58	100.00
E	48	23.35 ^a ± 0.56	22.79-23.91	64.58	100.00
Total	240	19.95 ± 0.56	19.39-20.52	46.25	100.00

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

5.5. ASOCIACIÓN DE FACTORES CON LA CONTAMINACIÓN DE LECHE CRUDA POR AFM₁

5.5.1. Factores climáticos

5.5.1.1. Asociación de la estación del año de recolección de muestras de leche cruda con la concentración de AFM₁. La estación se relacionó significativamente (P<0.05) con la concentración de AFM₁, en verano se detectó una concentración mayor de AFM₁ en las muestras de leche cruda en comparación con las muestras recolectadas en el resto del año. (Cuadro 21). Solamente en el verano, se detectaron muestras de leche que sobrepasaron el límite permisible para AFM₁ establecido por la Unión Europea.

Cuadro 21. Cuantificación de AFM₁ (ng kg⁻¹) en muestras de leche cruda recolectadas en las estaciones del año

Estación	Casos	AFM ₁ (µg kg ⁻¹ ± EE)	Lim confianza (95%)	> LMP NOM (%)	> LMP UE (%)
Primavera	60	6.79 ^b ± 0.99	5.81-7.78	0.00	0.00
Verano	60	16.81 ^a ± 2.81	14.00-19.62	0.00	6.40
Otoño	60	7.64 ^b ± 1.10	6.53-8.74	0.00	0.00
Invierno	60	5.29 ^b ± 1.22	4.07-6.51	0.00	0.00
Total	240	9.40 ± 1.85	7.55-11.25	0.00	1.67

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

5.5.1.2. Asociación de la precipitación pluvial mensual con la concentración de AFM₁ en leche cruda. La concentración de AFM₁ en las muestras de leche cruda, fue más elevada cuando se registró una precipitación mensual mayor en las unidades de estudio (P<0.05). También, algunas muestras sobrepasaron el límite máximo permisible cuando la precipitación pluvial rebasó los 19.6 mm (Cuadro 22).

Cuadro 22. Asociación de la concentración de AFM₁ (ng kg⁻¹) en muestras de leche cruda con la variación de la precipitación mensual.

Precipitación (mm)	Casos	AFM ₁ (µg kg ⁻¹ ± EE)	Lim confianza (95%)	> LMP NOM (%)	> LMP UE (%)
2.8 - 9.4	64	5.56 ^c ± 1.14	4.42-6.69	0.00	0.00
9.5 -19.5	56	7.66 ^{bc} ± 1.17	6.49-8.82	0.00	0.00
19.6 – 68.7	58	11.39 ^{ab} ± 2.47	8.92-13.86	0.00	3.45
≥ 68.8	62	13.08 ^a ± 2.24	10.83-15.32	0.00	3.23
Total	240	9.40 ± 1.85	7.55-11.25	0.00	1.67

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

Los valores más altos de AFM₁ en leche cruda coinciden con los meses de mayor precipitación pluvial. Durante la temporada de lluvias, el ganado lechero disminuye el consumo de materia seca y la energía disponible es menor, por lo tanto, el bovino entra en un proceso de estrés metabólico que trae consigo un incremento de la secreción de cortisol e inmunosupresión, por lo que el animal es más susceptible a enfermarse. De igual forma, la alta humedad relativa en el ambiente contribuye a la proliferación de patógenos, en esta temporada se presenta mayor incidencia de mastitis y enfermedades podales. Por otra parte, Hernandez-Valdivia *et al.*, (2020) mencionan en su estudio que el consumo moderado de AF por periodos prolongados produce intoxicación crónica en bovinos, lo que provoca alteración de las funciones ruminales, hepáticas y reproductivas. En estado de

inmunosupresión existe una mayor tasa de transferencia de AF a la leche, ya que se reduce la capacidad de biotransformación hepática, la tasa de ingestión y la integridad de las membranas de las células alveolares mamarias (Fink-Gremmels, 2008).

5.5.1.3. Asociación de la amplitud térmica con la concentración de AFM₁ en leche cruda. La concentración de AFM₁ en las muestras de leche cruda fue mayor (P<0.05) cuando la amplitud térmica mensual fue menor, entre los 12.7 y 16.1°C. Fue también en dicho rango de amplitud cuando se detectaron muestras (5.0%) que sobrepasaron el límite permisible establecido por las legislaciones de la unión europea (Cuadro 23).

Cuadro 23. Asociación de la concentración de AFM₁ (ng kg⁻¹) en muestras de leche cruda con la variación de amplitud térmica mensual.

Amplitud térmica (°C)	Casos (n)	AFM ₁ (µg kg ⁻¹ ± EE)	Lim confianza (95%)	> LMP NOM (%)	> LMP UE (%)
12.7 - 16.1	80	14.20 ^c ± 2.34	11.86-16.53	0.00	5.00
16.2 – 19.5	80	8.38 ^{bc} ± 1.21	7.17-9.60	0.00	0.00
≥ 19.6	80	5.62 ^{ab} ± 0.79	4.83-6.40	0.00	0.00
Total	240	9.40 ± 1.85		0.00	1.67

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

5.5.2. Factores zootécnicos

5.5.2.1. Asociación del tipo de ingrediente presente en la RTM con la concentración de AFM₁ en leche cruda . Se encontró asociación del tipo de ingrediente incluido en la RTM con la concentración de AFM₁ en leche cruda. Cuando en la ración de las vacas se incluyeron granos y semillas hubo una mayor concentración de AFM₁ en la leche cruda comparado a cuando no se incluyeron (Cuadro 24).

Cuadro 24. Asociación de la inclusión de los tipos de ingrediente en la RTM con la concentración de AFM₁ en leche cruda.

Tipo de pienso	Casos	AFM ₁ (ng kg ⁻¹ ± EE)	Lim confianza (95%)	> LMP NOM (%)	> LMP UE (%)
Pajas y alimentos toscos					
Presente	216	9.49 ^a ± 1.02	8.46-10.52	0.00	1.85
Ausente	24	8.55 ^a ± 1.68	6.87-10.24	0.00	0.00
Forrajes frescos					
Presente	4	3.86 ^b ± 1.00	2.86-4.85	0.00	0.00
Ausente	236	9.49 ^a ± 0.96	8.54-10.45	0.00	1.69

Ensilados							
	Presente	236	9.49 ^a	± 0.96	8.54-10.45	0.00	1.69
	Ausente	4	3.86 ^b	± 1.00	2.86-4.85	0.00	0.00
Granos y semillas							
	Presente	120	13.25 ^a	± 1.71	11.54-14.96	0.00	3.33
	Ausente	120	5.55 ^a	± 0.61	4.94-6.16	0.00	0.00
Concentrados y núcleos proteínicos							
	Presente	240	9.40 ^a	± 1.85	7.55-11.25	0.00	1.67
	Ausente	0	-	-	---		---
Subproductos							
	Presente	120	8.71 ^b	± 1.29	7.42-10.00	0.00	1.67
	Ausente	120	10.09 ^a	± 1.37	8.72-11.46	0.00	1.67
	Total	240	9.40	± 1.85	7.55-11.25	0.00	1.67

5.5.2.2. Asociación de la marca de concentrado y/o núcleo proteínico con la concentración de AFM₁ en leche cruda. Se encontraron diferencias (P<0.05) de concentración de AFM₁ entre las muestras de leche cruda de acuerdo con la marca de concentrado y/o núcleo proteínico consumido por las vacas. (Cuadro 25). La concentración más alta de AFM₁ se obtuvo en la leche de vacas alimentadas con las marcas A y D, mientras que la más baja se obtuvo con la marca C. Cuando se ofreció a las vacas la marca de núcleo D, una mayor proporción de muestras de leche cruda sobrepasaron el LMP establecido por la Unión Europea.

Cuadro 25. Concentración de AFM₁ (ng kg⁻¹) en muestras de leche cruda de acuerdo con la marca de concentrado y/o núcleo proteínico consumido por las vacas lecheras.

Tipo de pienso	Casos	AFM ₁ (ng kg ⁻¹ ± EE)	Lim confianza (95%)	> LMP NOM (%)	> LMP UE (%)
Elaboración propia	72	8.02 ^b ± 1.93	6.10-9.95	0.00	2.78
A	72	7.00 ^b ± 0.95	6.05-7.96	0.00	0.00
B	24	2.76 ^b ± 0.23	2.53-2.98	0.00	0.00
C	72	15.38 ^a ± 2.12	13.27-17.50	0.00	2.78
Total	240	9.40 ± 1.85	7.55-11.25	0.00	1.67

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

5.5.3. Factores agronómicos

5.5.3.1. Empresa proveedora de semilla de maíz con el que se elabora el ensilado. Se encontró asociación de la empresa de semilla de maíz con la cantidad de aflatoxinas presente en la leche. Hubo mayor concentración de AFM₁ en leche cuando las RTM de las

vacas incluyó ensilado de maíz elaborado con maíz forrajero proveniente de semillas de la empresa E, en comparación a otras empresas semilleras o al maíz criollo (Cuadro 26).

Cuadro 26. Asociación de la empresa proveedora de semilla de maíz con que se elabora el ensilado con la concentración de AFM₁ en la leche cruda

Empresa proveedora de semilla de maíz	Casos	AFM ₁ (ng kg ⁻¹ ± EE)	Lim confianza (95%)	> LMP NOM (%)	> LMP UE (%)
Criollo	24	3.98 ^b ± 0.60	3.38-4.58	0.00	0.00
A	48	9.59 ^b ± 2.94	6.65-12.54	0.00	4.17
B	24	6.52 ^b ± 1.22	5.29-7.75	0.00	0.00
C	48	5.66 ^b ± 0.94	4.72-6.60	0.00	0.00
D	48	8.05 ^b ± 1.10	6.96-9.15	0.00	0.00
E	48	18.44 ^a ± 2.97	15.47-21.41	0.00	4.17
Total	240	9.40 ± 1.85	7.55-11.25	0.00	1.67

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

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

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

Se registró crecimiento de una o varias colonias fúngicas en el 95.0% 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 3110 colonias fúngicas, de los cuales el 30.9% correspondió a hongos compatibles con la morfología del género *Aspergillus* (Figura 33). De las 961 colonias *Aspergillus* spp. identificadas, el 10.0% correspondió a la morfología *Aspergillus flavus*. También se encontraron colonias congruentes con la morfología de otros géneros fúngicos de interés agropecuario, *Fusarium* y *Penicillium* (26.9 y 6.1 %, respectivamente) y de hongos congruentes con taxonomía *Cladosporium* y *Mucor* (21.2 y 11.2%) y de los géneros *Alternaria*, *Rhizopus*, *Geotricum*, *Epicoccum*, *Botrytis*, *Paecilomyces*, *Eurotium*, *Emericella* y *Candida*, aunque en proporciones menores.

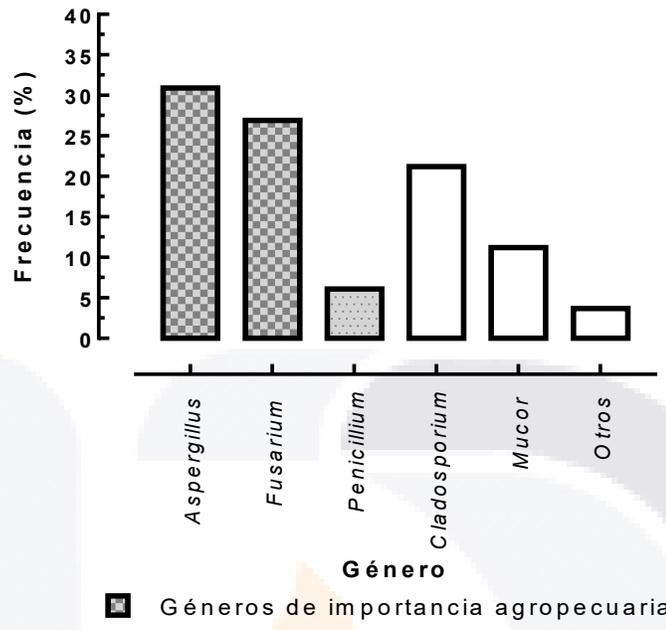


Figura 33. Géneros de colonias fúngicas identificadas por sus características morfológicas obtenidas de muestras de RTM

5.6.2. 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 5.0% de las muestras de RTM no presentó crecimiento fúngico, el 65.0% correspondió a un recuento bajo, el 21.7% a un recuento moderado y el 8.3% de las muestras a un recuento alto (Figura 34).

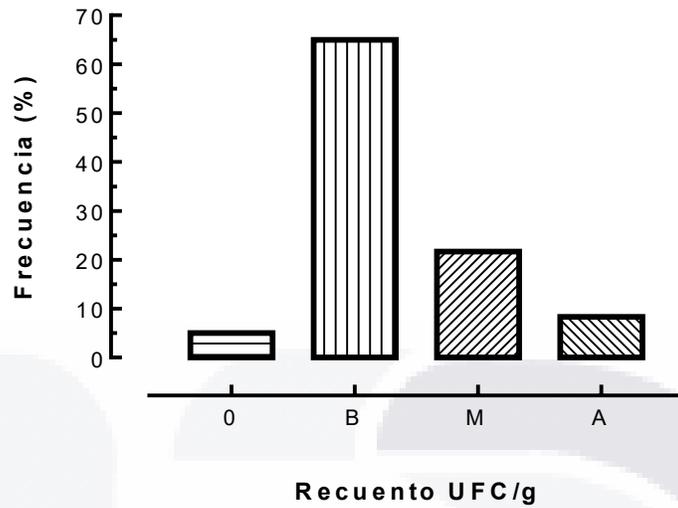


Figura 34. Recuento de unidades formadoras de colonias fúngicas totales (UFC/g de muestra) en las muestras de RTM. Sin crecimiento (0), recuento bajo (B), recuento moderado (M), recuento alto (A).

Se encontró presencia de colonias compatibles con morfología de *Aspergillus flavus* en el 10.0% de las muestras de RTM. De las colonias caracterizadas como aflatoxigénicas el 62.5% presentó un recuento bajo y el 37.5% un recuento moderado. (Figura 35).

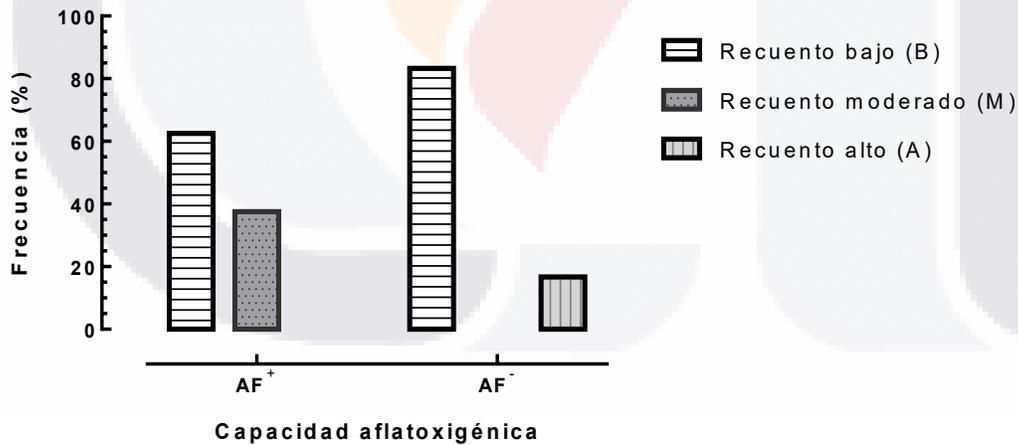


Figura 35. Cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC/g de muestra) compatibles con morfología *Aspergillus flavus* de acuerdo con su capacidad aflatoxigénica.

presencia de cepas aflatoxigénicas de *Aspergillus flavus* en los productos agrícolas como lo describen otros estudios de la región. En un estudio realizado en Sonora, encontraron presencia de cepas aflatoxigénicas tanto como en suelo como en productos agrícolas (Ortega-Beltrán et al., 2015). En un estudio realizado en Aguascalientes en piensos para ganado lechero también fueron encontradas cepas de *Aspergillus flavus* con potencial aflatoxigénico (Rangel-Muñoz et al., 2020).

5.6.4. Caracterización aflatoxigénica de aislados con morfología *Aspergillus flavus* mediante técnica de ELISA

Se cuantificó la producción de AF en los 18 aislados compatibles con morfología típica de *A. flavus* a partir de cultivos monospóricos de 7 días de incubación en oscuridad en medio de cultivo CAM. En los aislados que presentaron un viraje de color intenso en la prueba de vapores de amonio se encontró una mayor concentración de AF ($P < 0.05$) en la prueba de ELISA que en el resto de los aislados (Cuadro 27).

Cuadro 27. Proporción de aislados compatibles con la morfología *Aspergillus flavus* de acuerdo con su capacidad aflatoxigénica y producción de AF ($\mu\text{g}/\text{kg}$) cuantificada mediante prueba de ELISA

Viraje de color VHA	Aislados	(%)	AF ($\mu\text{g}/\text{kg} \pm \text{EE}$)	Límite de confianza	
				Inferior	Superior
-	6	33.3	14.5 ^b \pm 1.3	13.2	15.7
+	10	55.6	15.5 ^b \pm 1.2	14.0	16.4
++	2	11.1	2972 ^a \pm 403	2570	3375
Total	18	100	343.5 \pm 480.545	137.02	824.07

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

Los resultados confirman que en la región es frecuente la presencia de cepas aflatoxigénicas de *Aspergillus flavus* (Rangel-Muñoz et al., 2020). Sugieren también que la técnica de la reacción de vapores amoniacaes de cepas *Aspergillus flavus* puede utilizarse como una prueba diagnóstica rápida para la determinación de la capacidad aflatoxigénica de cepas sobre todo las que presentan un potencial aflatoxigénico elevado. Sin embargo, en cepas con poco potencial aflatoxigénico el viraje de color puede ser muy tenue o poco visible. Estos hallazgos coinciden con el fundamento de la técnica de vapores amoniacaes, la intensidad del viraje de color está relacionada con el contenido de pigmentos amarillos

precursores de la ruta biosintética de aflatoxinas (Fani et al., 2014). En otras investigaciones se ha reforzado la determinación de la capacidad aflatoxigénica de las cepas con técnicas más sensibles y específicas como la técnica de cromatografía de capa fina (Ortega-Beltran et al., 2015; Pildain et al., 2005).



6. CONCLUSIONES

Se encontró asociación de algunos factores climáticos, agronómicos y zootécnicos con la contaminación por aflatoxinas en muestras de ración y leche. La menor concentración de aflatoxinas en la ración total mezclada se encontró en otoño que coincide con la época reciente de cosecha de productos agrícolas en la región y por ende un menor tiempo de almacenamiento de los productos agrícolas, la concentración de aflatoxinas se incrementó durante las otras estaciones del año lo que puede estar asociado con el tiempo y condiciones de almacenaje. También se encontró asociación con la temperatura media, mensual, la inclusión de ensilados y de subproductos, así como de las empresas proveedoras de semilla de maíz con las que se elaboró el ensilado. Se encontró una mayor concentración de AFM₁ en el verano en las muestras de leche cruda. El contenido de AFM₁, en la leche cruda se asoció con la amplitud térmica, la inclusión de granos y/o semillas en las raciones, la marca de núcleo o concentrado proteínico. También se registró asociación de la precipitación pluvial con la concentración de AFM₁, los contenidos más altos coinciden con la época de lluvias, resultado que puede ser atribuible a la inmunodepresión del ganado lechero provocada por la alta humedad y la proliferación de patógenos.

Se encontraron dieciocho aislados con morfología compatible con *Aspergillus flavus* (frecuencia de 10 %) presentes en las muestras de ración, dos de los aislados mostraron un potencial elevador de producción de aflatoxinas.

Por lo que se cumplió la hipótesis planteada, existió influencia de factores climáticos, agronómicos y zootécnicos en la contaminación de aflatoxinas de las raciones destinadas a la alimentación de vacas lecheras y de leche cruda en el estado de Aguascalientes. Se confirmó también que es común la presencia de cepas aflatoxigénicas en los productos agrícolas que circulan en el estado. Estos resultados sugieren que se deben de diseñar estrategias estacionales en las unidades de producción lechera para prevenir y controlar la problemática de contaminación por aflatoxinas sobre todo en las épocas con mayor precipitación pluvial y vigilar las condiciones de almacenamiento de los productos agrícolas destinados a la alimentación del ganado lechero. Es recomendable continuar más a fondo con la investigación de los factores que mostraron mayor influencia en la problemática de contaminación.

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.

Alanina aminotransferasa (ALT). Enzima involucrada en la transferencia de aminoácidos. Se utiliza para evaluar daño hepático, principalmente.

Albúmina. Proteína que se encuentra en gran proporción en el plasma sanguíneo, siendo la principal proteína de la sangre; es sintetizada en el hígado.

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.

Aspartato aminotransferasa (AST). Enzima presente normalmente en el suero y en ciertos tejidos corporales, que actúa sobre la transferencia intermolecular de un grupo

amino desde el ácido aspártico al ácido alfaacetoglutarico, para formar ácido glutámico y ácido oxaloacético.

Atrofia. Disminución importante del tamaño de la célula y del órgano del que forma parte, debido a la pérdida de masa celular. Las células atroficas muestran una disminución de la función, pero no están muertas.

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

Bilirrubina. Pigmento amarillento que se encuentra en la bilis, un líquido producido por el hígado.

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

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

Carcinogénico. Habilidad de una sustancia para causar cáncer.

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

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

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

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

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

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

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

Distribución. Es el proceso durante el cual una sustancia química absorbida es transferida desde su sitio de absorción a otras áreas del cuerpo.

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

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

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

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

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

Fosfatasa alcalina (FA). Enzima hidrolasa responsable de catalizar la remoción de un grupo fosforil de varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides. Los tejidos con cantidades más altas de FA abarcan el hígado, las vías biliares y los huesos.

Gamma-glutamyltranspeptidasa (GGT). Enzima que cataliza la transferencia de una porción de gamma-glutamyl de glutatión a un aceptor que puede ser un aminoácido, un péptido o una molécula de agua. Juega un papel importante en el ciclo de la gamma-glutamyl, una vía para la síntesis y degradación de glutatión y desintoxicación de drogas y xenobióticos.

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.

Genotoxicidad. Capacidad para causar daño al material genético; el daño puede ser tipo mutágeno o carcinógeno.

Glutati3n reducido (GSH). Trip3ptido no prote3nico; es un antioxidante cuya funci3n es la de mantener la estabilidad de la membrana, reducir los factores de estr3s oxidativo y las especies de ox3geno reactivas que se producen a partir del proceso de peroxidaci3n de l3pidos.

Hepatot3xico. Sustancia nociva para las c3lulas del h3gado.

Hifa: Filamento septado o no de tama3o microsc3pico, que reunido con otros filamentos forma el cuerpo vegetativo de los hongos.

Hiperplasia. Incremento del n3mero de c3lulas de un 3rgano o tejido.

Hongo: Organismo eucariota que pertenece al reino fungi.

3ndice de conversi3n alimenticia. Kilos de alimento necesario para reponer un kilo en peso vivo.

Inmunosupresor: Sustancia qu3mica que produce la supresi3n del sistema inmunitario.

Intoxicaci3n. Proceso patol3gico, con signos y s3ntomas cl3nicos, causado por una sustancia de origen ex3geno o end3geno.

Isoenzimas (isoformas). Enzimas en un organismo que catalizan la misma reacci3n, pero difieren en estructura; estas diferencias pueden tener un rango de uno a varios residuos de amino3cidos.

Metabolismo: Suma de todos los procesos qu3micos y f3sicos que tienen lugar en un organismo; en sentido m3s estricto, cambios f3sicos y qu3micos que sufre una sustancia en un organismo. Incluye la incorporaci3n y distribuci3n en el organismo de los componentes qu3micos, los cambios (biotransformaciones sufridas) y la eliminaci3n de los compuestos y de sus metabolitos. T3rmino relacionado: biotransformaci3n.

Metabolito: Cualquier producto intermedio o final resultante del metabolismo. T3rmino relacionado: biotransformaci3n.

M3tula: C3lula de un conidi3foro que lleva las fi3lides.

Micotoxicosis: Trastornos en la salud de animales y personas producidos por la ingesti3n o inhalaci3n de una o varias micotoxinas.

Micotoxina: Metabolito secundario t3xico, de composici3n variada, producidos por organismos del reino fungi; suele referirse a sustancias t3xicas producidas por hongos que afectan a animales vertebrados en bajas concentraciones.

Monooxigenasas, citocromo P450: Enzimas que usan O₂ e incorporan un 3tomo de ox3geno dentro de un sustrato y reducen el otro 3tomo a agua; importante en la s3ntesis de

hormonas esteroides y tirosina, también conocido en la destoxificación de compuestos xenobióticos.

Mutagénico: Cualquier sustancia que puede inducir cambios heredables (mutaciones) en el genotipo de una célula como consecuencia de alteraciones o de pérdida de genes o de cromosomas o de parte de estos. 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.

Neurotóxico. Sustancia nociva para las células de los riñones.

Norma Oficial Mexicana (NOM): 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.

Proteína. Una macromolécula biológica compuesta de un arreglo lineal de aminoácidos unidos por uniones peptídicas; las funciones de las proteínas en los procesos biológicos incluyen catálisis, transporte y almacenaje, movimiento, soporte mecánico, protección inmune, la generación y transmisión de impulsos nerviosos y el control del crecimiento y diferenciación.

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.

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

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

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

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

Transferasas de glutatión. Familia de isoenzimas mejor conocidas por su capacidad para catalizar la conjugación de la forma reducida del glutatión a sustratos xenobióticos para el propósito de la destoxificación.

Unidad de Producción Lechera (UPL): 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., Shier, W. T., Plasencia, J., Weaver, M. A., Bellaloui, N., Kotowicz, J. K., Butler, A. M., Accinelli, C., de la Torre-Hernandez, M. E., & Zablotowicz, R. M. (2017). Mycotoxin contamination in corn smut (*Ustilago maydis*) galls in the field and in the commercial food products. *Food Control*, 71, 57–63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.006>
- Abbas, M. (2021). *Chromatographic Techniques for Estimation of Aflatoxins in Food Commodities* (L. B. Abdulra'uf (ed.); p. Ch. 10). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98508>
- Abbes, S., Salah-Abbès, J., Bouraoui, Y., Oueslati, S., & Oueslati, R. (2012). Natural occurrence of aflatoxins (B-1 and M-1) in feed, plasma and raw milk of lactating dairy cows in Beja, Tunisia, using ELISA. *Food Additives & Contaminants. Part B, Surveillance*, 5, 11–15. <https://doi.org/10.1080/19393210.2011.640756>
- Abdallah, M. F., Girgin, G., & Baydar, T. (2019). Mycotoxin Detection in Maize, Commercial Feed, and Raw Dairy Milk Samples from Assiut City, Egypt. *Veterinary Sciences*, 6(2), 57. <https://doi.org/10.3390/vetsci6020057>
- Abdelghany, T., & El-Sheikh, and. (2018). *Mycology*.
- Agrios, G. (2004). Plant pathology: Fifth edition. In *Plant Pathology: Fifth Edition* (Vol. 9780080473). <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02037-6>
- Ahangarkani, F., Rouhi, S., & Gholamour Azizi, I. (2014). A review on incidence and toxicity of fumonisins. *Toxin Reviews*, 33(3), 95–100. <https://doi.org/10.3109/15569543.2013.871563>
- Akar, T., Avci, M., & Dusunceli, F. (2004). Barley: Post-harvest Operations. In *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (pp. 1–64). <http://www.fao.org/3/a-au997e.pdf>
- Alexander, N. J., Proctor, R. H., & McCormick, S. P. (2009). Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews*, 28(2–3), 198–215. <https://doi.org/10.1080/15569540903092142>
- Álvarez-Días, M. F., Valdivia Flores, A. G., Rangel-Muñoz, E., Quezada Tristán, T., Alejos De La Fuente, J. I., & Cobos Peralta, M. A. (2021). *Factores asociados a la contaminación del alimento de vacas lecheras por *Aspergillus flavus* Link aflatoxigénico y aflatoxinas en el Altiplano Central Mexicano*. Universidad Autónoma

de Aguascalientes.

- Antonissen, G., Devreese, M., De Baere, S., Martel, A., Van Immerseel, F., & Croubels, S. (2017). Impact of Fusarium mycotoxins on hepatic and intestinal mRNA expression of cytochrome P450 enzymes and drug transporters, and on the pharmacokinetics of oral enrofloxacin in broiler chickens. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 101, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.01.006>
- Arrúa Alvarenga, A. A., Moreno Martínez, E., Quezada Viay, M. Y., Moreno Lara, J., Vázquez Badillo, M. E., & Flores Olivas, A. (2012). Aspergillus aflatoxigénicos: enfoque taxonómico actual. *Revista Mexicana de CCiencias Agrícolas*, 3(5), 1047–1052. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342012000500016&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Assunção, R., Martins, C., Viegas, S., Viegas, C., Sletting Jakobsen, L., Pires, S., & Alvim, P. (2018). Climate change and the health impact of aflatoxins exposure in Portugal – an overview. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1447691>
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. McMillan.
- Belhassen, H., Jiménez-Díaz, I., Arrebola, J. P., Ghali, R., Ghorbel, H., Olea, N., & Hedili, A. (2015). Zearalenone and its metabolites in urine and breast cancer risk: a case-control study in Tunisia. *Chemosphere*, 128, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.055>
- Benkerroum, N. (2020). Chronic and Acute Toxicities of Aflatoxins: Mechanisms of Action. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/ijerph17020423>
- Bertuzzi, T., Rastelli, S., Mulazzi, A., & Pietri, A. (2012). Evaluation and Improvement of Extraction Methods for the Analysis of Aflatoxins B 1 , B 2 , G 1 and G 2 from Naturally Contaminated Maize. *Food Analytical Methods - FOOD ANAL METH*, 5. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9274-5>
- Bessaire, T., Mujahid, C., Mottier, P., & Desmarchelier, A. (2019). Multiple Mycotoxins Determination in Food by LC-MS/MS: An International Collaborative Study. In *Toxins* (Vol. 11, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/toxins11110658>
- Beyerle, J., Frei, E., Stiborova, M., Habermann, N., & Ulrich, C. M. (2015). Biotransformation of xenobiotics in the human colon and rectum and its association with colorectal cancer.

Drug Metabolism Reviews, 47(2), 199–221.
<https://doi.org/10.3109/03602532.2014.996649>

Camacho Vera, J. H., Cervantes Escoto, F., Palacios Rangel, M. I., Cesín Vargas, A., Ocampo Ledesma, J., Camacho Vera, J. H., Cervantes Escoto, F., Palacios Rangel, M. I., Cesín Vargas, A., & 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>

Capelli, A., Suárez, G., & García y Santos, C. (2019). Aflatoxinas en alimentos y leche de vacas de 18 establecimientos comerciales de las regiones centro-sur y este de Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 55(212), 52–56.
<https://doi.org/10.29155/VET.55.212.2>

Carranza-Trinidad, R., Macedo, R., Cámara, J., Sosa, J., Meraz, A., & Valdivia, A. (2007). Competitividad en la cadena productiva de leche del estado de Aguascalientes, México. *Agrociencia*, 41(6), 701–709.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952007000600701

Catteuw, A., Broekaert, N., De Baere, S., Lauwers, M., Gasthuys, E., Huybrechts, B., Callebaut, A., Ivanova, L., Uhlig, S., De Boevre, M., De Saeger, S., Gehring, R., Devreese, M., & Croubels, S. (2019). Insights into In Vivo Absolute Oral Bioavailability, Biotransformation, and Toxicokinetics of Zearalenone, α -Zearalenol, β -Zearalenol, Zearalenone-14-glucoside, and Zearalenone-14-sulfate in Pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(12), 3448–3458. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05838>

Cavazos, T. A., Salinas, J., Martínez, B., Colorado, G., Grau, P. de, Prieto, R., Conde, C., Quintanar, A., Santana, J., Romero, R., Maya, E. M., Rosario, G. J., Ayala, R. M., Carrillo, H., Santiesteban, O., & Bravo, M. E. (2013). *Actualización de escenarios de cambio climático para México como parte de los productos de la Quinta Comunicación Nacional*.

Changwa, R., Abia, W., Msagati, T., Nyoni, H., Ndleve, K., & Njobeh, P. (2018). Multi-Mycotoxin Occurrence in Dairy Cattle Feeds from the Gauteng Province of South Africa: A Pilot Study Using UHPLC-QTOF-MS/MS. In *Toxins* (Vol. 10, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/toxins10070294>

Changwa, R., De Boevre, M., De Saeger, S., & Njobeh, P. B. (2021). Feed-Based Multi-Mycotoxin Occurrence in Smallholder Dairy Farming Systems of South Africa: The

- Case of Limpopo and Free State. In *Toxins* (Vol. 13, Issue 2).
<https://doi.org/10.3390/toxins13020166>
- Chen, J., Li, Z., Yi, C., Gao, C., Guo, L., Wang, T., & Xu, J. (2020). Sphinganine-Analog Mycotoxins (SAMs): Chemical Structures, Bioactivities, and Genetic Controls. *Journal of Fungi*, 6, 312. <https://doi.org/10.3390/jof6040312>
- Chi, F., & Broomhead, J. (2009). Micotoxinas y Aves. Una Revisión para productores de Aves. In *Amlan International* (p. 15).
- Chiotta, M. L., Fumero, M. V., Cendoya, E., Palazzini, J. M., Alaniz-Zanon, M. S., Ramirez, M. L., & Chulze, S. N. (2020). Toxigenic fungal species and natural occurrence of mycotoxins in crops harvested in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(4), 339–347. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.06.002>
- CONAPO. (2021). *Indicadores demográficos de la República Mexicana*.
http://www.conapo.gob.mx/work/models/CONAPO/Mapa_Ind_Dem18/index_2.html
- Cruz-Vázquez, C., VITAL-GUTIÉRREZ, J., Medina-Esparza, L., Mora, L., Valdivia, A. G., Quezada, T., & Orihuela, A. (2017). Neospora caninum Infection during the First Gestation of Holstein Heifers That Consume Food Contaminated Naturally with Zearalenone under Field Conditions. *Iranian Journal of Parasitology*, 12, 563–571.
- Dagnac, T., Latorre, A., Fernández Lorenzo, B., & Llompарт, M. (2016). Validation and application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for the assessment of the co-occurrence of mycotoxins in maize silages from dairy farms in NW Spain. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33(12), 1850–1863. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1243806>
- Daud, N., Currie, V., Duncan, G., Busman, M., & Gratz, S. W. (2020). Intestinal hydrolysis and microbial biotransformation of diacetoxyscirpenol- α -glucoside, HT-2- β -glucoside and N-(1-deoxy-d-fructos-1-yl) fumonisin B1 by human gut microbiota in vitro. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 71(5), 540–548. <https://doi.org/10.1080/09637486.2019.1698015>
- Davari, E., Mohsenzadeh, M., Mohammadi, G., & 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.
<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=108667732&lang=es&site=ehost-live&scope=site>

- de la Torre, M., Sánchez Rangel, D., Galeana-Sánchez, E., & Plasencia, J. (2013). Fumonisin -Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *TIP. Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 17, 77–91. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(14\)70321-3](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(14)70321-3)
- Debevere, S., Schatzmayr, D., Reisinger, N., Aleschko, M., Haesaert, G., Rychlik, M., Croubels, S., & Fievez, V. (2020). Evaluation of the Efficacy of Mycotoxin Modifiers and Mycotoxin Binders by Using an In Vitro Rumen Model as a First Screening Tool. *Toxins*, 12(6), 405. <https://doi.org/10.3390/toxins12060405>
- del Palacio, A., Bettucci, L., & 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>
- Dellaflora, L., Galaverna, G., & Dall’Asta, C. (2018). Mechanisms of Fumonisin B1 Toxicity: A Computational Perspective beyond the Ceramide Synthases Inhibition. *Chemical Research in Toxicology*, 31(11), 1203–1212. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00188>
- Demjanová, S., Jevinová, P., Pipová, M., & Regecová, I. (2021). Identification of *Penicillium verrucosum*, *Penicillium commune*, and *Penicillium crustosum* Isolated from Chicken Eggs. In *Processes* (Vol. 9, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/pr9010053>
- Deng, J., Zhao, L., Zhang, N.-Y., Karrow, N. A., Krumm, C. S., Qi, D.-S., & Sun, L.-H. (2018). Aflatoxin B₁ metabolism: Regulation by phase I and II metabolizing enzymes and chemoprotective agents. *Mutation Research*, 778, 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.10.002>
- Diener, U. L., Cole, R. J., Sanders, T., Payne, G., Lee, L. S., & 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>
- DOF. (2010). *México: NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.* <http://dof.gob.mx/normasOficiales/4156/salud2a/salud2a.htm>

- Domijan, A.-M., & Peraica, M. (2010). 14.07 - *Carcinogenic Mycotoxins** (C. A. B. T.-C. T. (Second E. McQueen (ed.); pp. 125–137). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01408-1>
- Du, K., Liu, P., Li, Y., & Ma, X. (2017). Effects of Dietary Mycotoxins on Gut Microbiome. *Protein and Peptide Letters*, 24. <https://doi.org/10.2174/0929866524666170223095207>
- Espíndola, F. S. (2006). Micotoxinas y micotoxicosis en el ganado bovino lechero. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 1(1), 89–64. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=455545053013>
- Facorro, R., Llompart, M., & Dagnac, T. (2020). Combined (d)SPE-QuEChERS Extraction of Mycotoxins in Mixed Feed Rations and Analysis by High Performance Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry. In *Toxins* (Vol. 12, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/toxins12030206>
- Fani, S. R., Moradi, M., Probst, C., Zamanizadeh, H., Mirabolfathy, M., Haidukowski, M., & Logrieco, A. (2014). A critical evaluation of cultural methods for the identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates for aflatoxin mitigation in pistachio orchards of Iran. *European Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0499-1>
- FAO. (2019). *Producción lechera*. Portal Lacteo. <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/es/>
- FAO Food and Agriculture Organization. (2003). Manual sobre la aplicacion del sistema de analisis de peligros y de puntos criticos de control. In *Estudio FAO Alimentación Nutrición* 73 (p. 136).
- FAO Food and Agriculture Organization. (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003: Summary of study. In *Food and Nutrition Paper* (Vol. 81, p. 165).
- FAO Food and Agriculture Organization. (2013). *The state of food insecurity in the world, 2013: The multiple dimensions of food security*. Food and Agricultural Organization of the united Nations.
- Fernández, E. F., Martínez, J. A., Martínez, V., Moreno, J. M., Collado, L. R., Hernández, M., & Morán, F. J. (2015). Documento de Consenso: Importancia nutricional y metabólica de la leche. *Nutricion Hospitalaria*, 31(1), 92–101. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.8253>
- Fink-Gremmels, J. (2008). Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25(2), 172–180.

<https://doi.org/10.1080/02652030701823142>

- Flores Ortiz, C. M., Hernández Portilla, L. B., & 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.
- Franco, L. T., Petta, T., Rottinghaus, G. E., Bordin, K., Gomes, G. A., & Oliveira, C. A. F. (2019). Co-occurrence of mycotoxins in maize food and maize-based feed from small-scale farms in Brazil: a pilot study. *Mycotoxin Research*, 35(1), 65–73. <https://doi.org/10.1007/s12550-018-0331-4>
- Gajecka, M., Jakimiuk, E., Zielonka, L., Obremski, K., & Gajecka, M. (2009). The biotransformation of chosen mycotoxins. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 12(2), 293–303. <http://europemc.org/abstract/MED/19645364>
- Galtier, P. (2010). Biotransformation and Fate of Mycotoxins. *Toxin Reviews*, 18. <https://doi.org/10.3109/15569549909009259>
- Gao, X., Mu, P., Zhu, X., Chen, X., Tang, S., Wu, Y., Miao, X., Wang, X., Wen, J., & Deng, Y. (2020). Dual Function of a Novel Bacterium, *Slackia* sp. D-G6: Detoxifying Deoxynivalenol and Producing the Natural Estrogen Analogue, Equol. *Toxins*, 12(2), 85. <https://doi.org/10.3390/toxins12020085>
- García, S., & 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>
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., González-Jaén, M. T., & Patiño, B. (2014). MYCOTOXINS | *Toxicology* (C. A. Batt & M. L. B. T.-E. of F. M. (Second E. Tortorello (eds.); pp. 887–892). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00234-2>
- Greco, M., Franchi, M., Golba, S., Pardo, A., & Pose, G. (2014). Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Poultry Feed for Food-Producing Animals. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 968215. <https://doi.org/10.1155/2014/968215>
- Gross-Steinmeyer, K., & Eaton, D. (2012). Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B-1. *Toxicology*, 299, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.05.016>
- Gruber-Dorninger, C., Faas, J., Doupovec, B., Aleschko, M., Stoiber, C., Höbartner-Gußl, A., Schöndorfer, K., Killinger, M., Zebeli, Q., & Schatzmayr, D. (2021). Metabolism of Zearalenone in the Rumen of Dairy Cows with and without Application of a

- Zearalenone-Degrading Enzyme. In *Toxins* (Vol. 13, Issue 2).
<https://doi.org/10.3390/toxins13020084>
- Gruber-Dorninger, C., Jenkins, T., & Schatzmayr, G. (2019). Global Mycotoxin Occurrence in Feed: A Ten-Year Survey. *Toxins*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/toxins11070375>
- Harrer, H., Lavee, E., Humpf, H.-U., & Futerman, T. (2013). Identification of N -acyl-fumonisin B1 as new cytotoxic metabolites of fumonisin mycotoxins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200465>
- Hernandez-Valdivia, E., Valdivia, A. G., Cruz-Vázquez, C., & Quezada, T. (2020). Diagnosis of Subclinical Aflatoxicosis by Biochemical Changes in Dairy Cows under Field. *Pakistan Veterinary Journal*, 41, 2074–7764. <https://doi.org/10.29261/pakvetj/2020.075>
- Huerta-Treviño, A., Dávila-aviña, J., Sanchez, E., Heredia, N., & García, S. (2016). Occurrence of mycotoxins in alfalfa (*Medicago sativa* L.), sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], and grass (*Cenchrus ciliaris* L.) retailed in the state of Nuevo León, México. *Agrociencia*, 50(7), 825–836.
- IARC International Agency for Research on Cancer. (2002). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks To Humans. In *Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans II* (Vol. 96, p. 590).
- INECC. (2013). *Climate: observations, projections and impacts. Summary factsheet Mexico*. Met Office. <http://www.metoffice.gov.uk/climatechange/policy-relevant/obs-projections-impacts>
- INEGI. (2019). “ *Estadísticas a Propósito Del ... Día Mundial De La Población (11 De Julio)* ” (Issue 337). https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2019/Poblacion2019_Nal.pdf
- INEGI. (2021). *Clima*. <http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/ags/territorio/clima.aspx?tema=me&e=01>
- Institute of Medicine National Academies. (2019). *Dietary References Intakes (DRIs) – Food and Nutrition Board*. <http://sialaleche.org/recomendaciones-de-consumo-de-porciones-de-lacteos-diarias/>
- Ishi, K., Maruyama, J., Juvvadi, P., Nakajima, H., & 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>
- Ji, C., Fan, Y., & Zhao, L. (2016). Review on biological degradation of mycotoxins. *Animal Nutrition (Zhongguo Xu Mu Shou Yi Xue Hui)*, 2(3), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.07.003>
- Kamle, M., Mahato, D. K., Devi, S., Lee, K. E., Kang, S. G., & Kumar, P. (2019). Fumonisin: Impact on Agriculture, Food, and Human Health and their Management Strategies. *Toxins*, 11(6), 328. <https://doi.org/10.3390/toxins11060328>
- Kebede, H., Liu, X., Jin, J., & Xing, F. (2020). Current status of major mycotoxins contamination in food and feed in Africa. *Food Control*, 110, 106975. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106975>
- Kemboi, D. C., Ochieng, P. E., Antonissen, G., Croubels, S., Scippo, M.-L., Okoth, S., Kangethe, E. K., Faas, J., Doupovec, B., Lindahl, J. F., & Gathumbi, J. K. (2020). Multi-Mycotoxin Occurrence in Dairy Cattle and Poultry Feeds and Feed Ingredients from Machakos Town, Kenya. In *Toxins* (Vol. 12, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/toxins12120762>
- Kim, J.-E., Son, H., & Lee, Y.-W. (2018). Biosynthetic mechanism and regulation of zearalenone in *Fusarium graminearum*. *JSM Mycotoxins*, 68, 1–6. <https://doi.org/10.2520/myco.68-1-2>
- Klich, M. A. (2002). *Identification of common Aspergillus species* (1st ed.). Centraalbureau voor Schimmelcultures. Utrecht. NETHERLANDS.
- Kőszegi, T., & Poór, M. (2016). Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. In *Toxins* (Vol. 8, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/toxins8040111>
- Krause, D. O., Smith, W. J. M., Brooker, J. D., & McSweeney, C. S. (2005). Tolerance mechanisms of streptococci to hydrolysable and condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 121(1), 59–75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.02.008>
- Kroeger, J., & 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>
- Leslie, J. F., Summerell, B. A., & Bullock, S. (2008). *The Fusarium Laboratory Manual*.

- Wiley. <https://books.google.hn/books?id=Yu3cBAAAQBAJ>
- Li, K., Liu, D., Pan, X., Yan, S., Song, J., Liu, D., Wang, Z., Xie, Y., Dai, J., Liu, J., Li, H., Zhang, X., & Gao, F. (2022). Deoxynivalenol Biosynthesis in *Fusarium pseudograminearum* Significantly Repressed by a Megabirnavirus. In *Toxins* (Vol. 14, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/toxins14070503>
- Limonciel, A., & Jennings, P. (2014). A Review of the Evidence that Ochratoxin A Is an Nrf2 Inhibitor: Implications for Nephrotoxicity and Renal Carcinogenicity. In *Toxins* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/toxins6010371>
- Loera, J., & 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>
- Loh, Z. H., Ouwerkerk, D., Klieve, A. V., Hungerford, N. L., & Fletcher, M. T. (2020). Toxin Degradation by Rumen Microorganisms: A Review. In *Toxins* (Vol. 12, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/toxins12100664>
- Loi, M., Fanelli, F., Liuzzi, V. C., Logrieco, A. F., & Mulè, G. (2017). Mycotoxin Biotransformation by Native and Commercial Enzymes: Present and Future Perspectives. *Toxins*, 9(4), 111. <https://doi.org/10.3390/toxins9040111>
- López-Jácome, E., Hernández, M., Colin, C., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación En Discapacidad.*, 3, 10–18.
- Lozano-Santillán, J., & 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.*
- Lyagin, I., & Efremenko, E. (2019). Enzymes for Detoxification of Various Mycotoxins: Origins and Mechanisms of Catalytic Action. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(13), 2362. <https://doi.org/10.3390/molecules24132362>
- Magan, N., & Medina, A. (2016). Integrating gene expression, ecology and mycotoxin production by *Fusarium* and *Aspergillus* species in relation to interacting environmental factors. *World Mycotoxin Journal*, 9(5), 673–684. <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2076>
- Magnoli, A. P., Poloni, V. L., & Cavaglieri, L. (2019). Impact of mycotoxin contamination in the animal feed industry. *Current Opinion in Food Science*, 29, 99–108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.08.009>

- Marin, D., Taranu, I., Burlacu, R., & Tudor, D. (2010). Effects of zearalenone and its derivatives on the innate immune response of swine. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 56, 956–963. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.06.020>
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 60, 218–237. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>
- Mariscal-Aguayo, V., Pacheco-Cervantes, A., Estrella-Quintero, H., Huerta-Bravo, M., Rangel-Santos, R., & Núñez-Domínguez, R. (2017). Estratificación de productores lecheros en los altos de Jalisco. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 14, 547–563.
- Martinez, M., Castañares, E., Dinolfo, M. I., Pacheco, W. G., Moreno, M. V., & Stenglein, S. A. (2014). Presencia de *Fusarium graminearum* en muestras de trigo destinado al consumo humano. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(1), 41–44. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70046-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70046-X)
- Martínez Padrón, H. Y., Hernández Delgado, S., Reyes Méndez, C. A., & Vázquez Carrillo, G. (2013). El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(2), 126–146. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092013000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- McSweeney, C., & Mackie, R. (2012). Micro-organisms and Ruminant Digestion: State of Knowledge, Trends and Future Prospects. In *Background Study Paper No. 61*. Food and Agricultural Organization of the United Nations.
- Medina, A., Akbar, A., Baazeem, A., Rodríguez, A., & Magan, N. (2017). Climate change, food security and mycotoxins: Do we know enough? *Fungal Biology Reviews*, 31. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.04.002>
- Meyers, D. M., & Obrian, G. (1998). Characterization of aflJ, a Gene Required for Conversion of Pathway Intermediates to Aflatoxin... *Applied & Environmental Microbiology*, 64(10), 3713. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=1177669&lang=es&site=ehost-live&scope=site>
- Miklós, G., Angeli, C., Ambrus, A., Nagy, A., Kardos, V., Zentai, A., Kerekes, K., Farkas, Z., Jozwiak, A. B., & Bartók, T. (2020). Detection of Aflatoxins in Different Matrices and

- Food-Chain Positions. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1916.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01916>
- Mobashar, M., Hummel, J., Blank, R., & Südekum, K.-H. (2010). Ochratoxin A in ruminants—A review on its degradation by gut microbes and effects on animals. *Toxins*, 2(4), 809–839. <https://doi.org/10.3390/toxins2040809>
- Molina, A., Chavarría, G., Alfaro-Cascante, M., Leiva, A., & Granados-Chinchilla, F. (2019). Mycotoxins at the Start of the Food Chain in Costa Rica: Analysis of Six Fusarium Toxins and Ochratoxin A between 2013 and 2017 in Animal Feed and Aflatoxin M1 in Dairy Products. In *Toxins* (Vol. 11, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/toxins11060312>
- Moreno, E. C., Garcia, G. T., Ono, M. A., Vizoni, É., Kawamura, O., Hirooka, E. Y., & Ono, E. Y. S. (2009). Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. *Food Chemistry*, 116(1), 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.037>
- Mostrom, M. (2011). *Chapter 54 - Trichothecenes and zearalenone* (R. C. B. T.-R. and D. T. Gupta (ed.); pp. 739–751). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382032-7.10054-2>
- Mostrom, M. S. (2012). *Chapter 95 - Zearalenone* (R. C. B. T.-V. T. (Second E. Gupta (ed.); pp. 1266–1271). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385926-6.00109-5>
- Müller, S., Dekant, W., & Mally, A. (2012). Fumonisin B1 and the kidney: Modes of action for renal tumor formation by fumonisin B1 in rodents. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 50, 3833–3846. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.06.053>
- Murillo, I., Cavallarin, L., & Segundo, B. S. (1999). Cytology of Infection of Maize Seedlings by *Fusarium moniliforme* and Immunolocalization of the Pathogenesis-Related PRms Protein. *Phytopathology*®, 89(9), 737–747. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.9.737>
- NOOA. (2021). *Conjuntos de datos climáticos en cuadrícula: temperatura de la superficie*. https://psl.noaa.gov/data/gridded/data.ghcncams.html?fbclid=IwAR0nxFTGGCzBy50tRHjTEjdp8EZelM-xE7h_EeoqAb9fTO1jnzlhv2RR8k8
- Ohara, T., Inoue, I., Namiki, F., Kunoh, H., & Tsuge, T. (2004). REN1 Is Required for Development of Microconidia and Macroconidia, but Not of Chlamydoconidia, in the Plant Pathogenic Fungus *Fusarium oxysporum*. *Genetics*, 166, 113–124.

- <https://doi.org/10.1534/genetics.166.1.113>
- OMS, & FAO. (2012). *Prevención y reducción de la contaminación de los alimentos y piensos* (1st ed.).
- OMS Organización Mundial de la Salud. (2019). *La inocuidad de los el Cambio Climático y la función de la OMS*.
https://www.who.int/foodsafety/publications/all/Climate_Change_SP_WEB.pdf
- Ortega-Beltran, A., Jaime, R., & 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>
- Ostry, V., Malir, F., & Ruprich, J. (2013). Producers and Important Dietary Sources of Ochratoxin A and Citrinin. In *Toxins* (Vol. 5, Issue 9).
<https://doi.org/10.3390/toxins5091574>
- Paterson, R., & 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>
- Payros, D., Alassane-Kpembi, I., Pierron, A., Loiseau, N., Pinton, P., & Oswald, I. P. (2016). Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms. *Archives of Toxicology*, 90(12), 2931–2957. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1826-4>
- Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., & 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>
- Pierron, A., Mimoun, S., Murate, L. S., Loiseau, N., Lippi, Y., Bracarense, A.-P. F. L., Schatzmayr, G., He, J. W., Zhou, T., Moll, W.-D., & Oswald, I. P. (2016). Microbial biotransformation of DON: molecular basis for reduced toxicity. *Scientific Reports*, 6, 29105. <https://doi.org/10.1038/srep29105>
- 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., & 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.
- Pinton, P., & Oswald, I. P. (2014). Effect of deoxynivalenol and other Type B trichothecenes

- on the intestine: a review. *Toxins*, 6(5), 1615–1643.
<https://doi.org/10.3390/toxins6051615>
- Pitt, J I. (2014). *Mycotoxins: Deoxynivalenol and Other Trichothecenes* (Y. B. T.-E. of F. S. Motarjemi (ed.); pp. 295–298). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00193-1>
- Pitt, John Ingram, & 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.
- Pleadin, J., Vulić, A., Zadravec, M., Lešić, T., Benić, M., Tkalec, V. J., & Vahčić, N. (2017). Presence of Fusarium mycotoxins in feedstuffs and cow milk sampled from Croatian farms during 2015. *Prisutnost Mikotoksina Roda Fusarium u Krmivima i Kravljem Mlijeku Uzorkovanim Sa Hrvatskih Farmi Tijekom 2015. Godine.*, 67(2), 102–111.
<http://10.0.60.207/mljekarstvo.2017.0202>
- Ramirez, M., Chulze, S., & Magan, N. (2006). Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of Fusarium graminearum on irradiated wheat grain. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.09.004>
- Ramos Girona, A. J., Marín Sillué, S., Molino Gahete, F., Vila Donat, P., & Sanchis Almenar, V. (2020). Las micotoxinas: el enemigo silencioso. *Arbor*, 196, 540.
<https://doi.org/10.3989/arbor.2020.795n1004>
- Rangel-Muñoz, E., Valdivia-Flores, A., Moreno-Rico, O., Hernández-Delgado, S., Cruz-Vázquez, C., De-Luna-López, M., Quezada, T., Ortiz-Martínez, R., & 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>
- Renaud, J. B., DesRochers, N., Hoogstra, S., Garnham, C. P., & Sumarah, M. W. (2021). Structure Activity Relationship for Fumonisin Phytotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00057>
- Reuhs, B. L. (2017). *High-Performance Liquid Chromatography BT - Food Analysis* (S. S. Nielsen (ed.); pp. 213–226). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_13
- Reyes Velázquez, W., Patricio Martínez, S., IsaíasEspinosa, V. H., Nathal Vera, M. A.,

- Lucas Palacios, E. de, & 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.
- Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y.-J., & Larondelle, Y. (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A. *Chemico-Biological Interactions*, 159, 18–46. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.10.106>
- Rodríguez-Blanco, M, Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2021). Mycotoxins occurrence and fungal populations in different types of silages for dairy cows in Spain. *Fungal Biology*, 125(2), 103–114. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.08.006>
- Rodríguez-Blanco, María, Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2020). Fusarium mycotoxins in total mixed rations for dairy cows. *Mycotoxin Research*, 36(3), 277–286. <https://doi.org/10.1007/s12550-020-00390-z>
- Rogowska, A., Pomastowski, P., Rafińska, K., Railean-Plugaru, V., Złoch, M., Walczak, J., & Buszewski, B. (2019). A study of zearalenone biosorption and metabolisation by prokaryotic and eukaryotic cells. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 169, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.09.008>
- Romo-Bacco, C. E., Valdivia-Flores, A. G., Carranza-Trinidad, R. G., Cámara-Córdova, J., Zavala-Arias, M. P., Flores-Ancira, E., & 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>
- Ropejko, K., & Twarużek, M. (2021). Zearalenone and Its Metabolites-General Overview, Occurrence, and Toxicity. *Toxins*, 13(1), 35. <https://doi.org/10.3390/toxins13010035>
- Rusli, H., Putri, R. M., & Alni, A. (2022). Recent Developments of Liquid Chromatography Stationary Phases for Compound Separation: From Proteins to Small Organic Compounds. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/molecules27030907>
- SAGARPA. (2010). *Diagnóstico Sectorial del Estado de Aguascalientes 2010* (p. 147). http://www.aguascalientes.gob.mx/sedrae/see/info-estatales/Otrostrabajosrealizados/Diagnostico_AGS_mat_2010.pdf
- Saito, M., & 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>

- Salisu, B., Anua, S. M., Wan Ishak, W. R., & Mazlan, N. (2021). *Development and validation of quantitative thin layer chromatographic technique for determination of total aflatoxins in poultry feed and food grains without sample clean-up*. 8, 656–670. <https://doi.org/10.5455/javar.2021.h558>
- Santibáñez Escobar, R., Hernandez Gallardo, M., Montañez Valdez, O. D., Tapia Gonzalez, J. M., Martinez Ibarra, J. A., & Avellaneda Ceballos, J. H. (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., & 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*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20803-0>
- Schatzmayr, G., Zehner, F., Täubel, M., Schatzmayr, D., Klimitsch, A., Loibner, A. P., & Binder, E. M. (2006). Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(6), 543–551. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500181>
- Schelstraete, W., Devreese, M., & Croubels, S. (2019). Impact of Subacute Exposure to T-2 Toxin and Zearalenone on the Pharmacokinetics of Midazolam as CYP3A Probe Drug in a Porcine Animal Model: A Pilot Study . In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 10, p. 399). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2019.00399>
- Schroers, H.-J., O'Donnell, K., Lamprecht, S. C., Kammeyer, P. L., Johnson, S., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Geiser, D. M., & Summerbell, R. C. (2009). Taxonomy and Phylogeny of the *Fusarium dimerum* Species Group. *Mycologia*, 101(1), 44–70. <http://www.jstor.org/stable/20619147>
- Schwartz, H. E., Hametner, C., Slavik, V., Greitbauer, O., Bichl, G., Kunz-Vekiru, E., Schatzmayr, D., & Berthiller, F. (2013). Characterization of Three Deoxynivalenol Sulfonates Formed by Reaction of Deoxynivalenol with Sulfur Reagents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(37), 8941–8948. <https://doi.org/10.1021/jf403438b>
- 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>
- Sergent, T., Ribonnet, L., Kolosova, A., Garsou, S., Schaut, A., De Saeger, S., Van

- Peteghem, C., Larondelle, Y., Pussemier, L., & Schneider, Y.-J. (2008). Molecular and cellular effects of food contaminants and secondary plant components and their plausible interactions at the intestinal level. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 46(3), 813–841. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.12.006>
- Sharaf, S. O. (2016). Aflatoxin M1 Levels in Raw Milk, Pasteurised Milk and Infant Formula. *Italian Journal of Food Safety*, 5(3), 5788. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.5788>
- Shimshoni, J. A., Cuneah, O., Sulyok, M., Krska, R., Galon, N., Sharir, B., & Shlosberg, A. (2013). Mycotoxins in corn and wheat silage in Israel. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(9), 1614–1625. <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.802840>
- SIAP. (2021a). *Datos Abiertos. Estadística de Producción Ganadera*. http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos_p.php
- SIAP. (2021b). *Producción ganadera*. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pecuaria>
- Singh, J., & Mehta, A. (2020). Rapid and sensitive detection of mycotoxins by advanced and emerging analytical methods: A review. *Food Science & Nutrition*, 8. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1474>
- Slongo, A. P., & 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., & 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>
- Tangni, E. K., & Pussemier, L. (2007). Ergosterol and mycotoxins in grain dusts from fourteen Belgian cereal storages: A preliminary screening survey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(7), 1263–1270. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.2838>
- Tao, Y., Xie, S., Xu, F., Liu, A., Wang, Y., Chen, D., Pan, Y., Huang, L., Peng, D., Wang, X., & Yuan, Z. (2018). Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 112, 320–331. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.002>
- 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., & 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.
[http://10.0.74.193/cienvet-](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)

[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](http://dibpxy.uaa.mx/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=133358600&lang=es&site=eds-live&scope=site)

Trail, F. (2009). For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiology*, 149(1), 103–110. <https://doi.org/10.1104/pp.108.129684>

Tran, V. N., Viktorova, J., Augustynkova, K., Jelenova, N., Dobiasova, S., Rehorova, K., Fenclova, M., Stranska-Zachariasova, M., Vitek, L., Hajslova, J., & Ruml, T. (2020). In Silico and In Vitro Studies of Mycotoxins and Their Cocktails; Their Toxicity and Its Mitigation by Silibinin Pre-Treatment. *Toxins*, 12(3).
<https://doi.org/10.3390/toxins12030148>

Tran, V. N., Viktorová, J., & Ruml, T. (2020). Mycotoxins: Biotransformation and Bioavailability Assessment Using Caco-2 Cell Monolayer. *Toxins*, 12(10).
<https://doi.org/10.3390/toxins12100628>

Uscanga-Domínguez, L. F., Orozco-García, I. J., Vázquez-Frias, R., Aceves-Tavares, G. R., Albrecht-Junghans, R. E., Amieva-Balmori, M., Bazaldua-Merino, L. A., Bernal-Reyes, R., Camacho-de León, M. E., Campos-Gutiérrez, J. A., Carmona-Sánchez, R. I., Castro-Marín, L. V, Coss-Adame, E., Cuevas-Estrada, A. J., Escobedo-Martínez, J. A., González-Franco, L. R., Huerta-Iga, F. M., Lozano-Lozano, R., Martínez-Vázquez, S. E., ... Velázquez-Alva, M. C. (2019). Posición técnica sobre la leche y derivados lácteos en la salud y en la enfermedad del adulto de la Asociación Mexicana de Gastroenterología y la Asociación Mexicana de Gerontología y Geriatria. *Revista de Gastroenterología de México*, 84(3), 357–371.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2019.03.002>

Useros, J. (2013). El Cambio Climático: sus causas y efectos medioambientales. *Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid*, 50, 71–98.

Valdivia, A. G., Erika Janet Rangel Muñoz, C. A. M.-C., Tristán, T. Q., Ortiz, R., Vázquez, C. R. C.-, Esparza, L. E. M., & 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*.
- Vandicke, J., De Visschere, K., Ameye, M., Croubels, S., De Saeger, S., Audenaert, K., & Haesaert, G. (2021). Multi-Mycotoxin Contamination of Maize Silages in Flanders, Belgium: Monitoring Mycotoxin Levels from Seed to Feed. In *Toxins* (Vol. 13, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/toxins13030202>
- Vázquez Badillo, M. E., & Moreno Martínez, E. (2016). Poscosecha de granos básicos en el medio rural. In *Claridades Agropecuarias* (Vol. 217). https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/185452/revista_271.pdf
- Videmann, B., Mazallon, M., Tep, J., & Lecoeur, S. (2008). Metabolism and transfer of the mycotoxin zearalenone in human intestinal Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 46(10), 3279–3286. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.07.011>
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S.-B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T., & Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78, 343–371. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>
- Wadhwa, M., Bakshi, M. P. S., & Makkar, H. P. S. (2016). Modifying gut microbiomes in large ruminants: Opportunities in non-intensive husbandry systems. *Animal Frontiers*, 6(2), 27–36. <https://doi.org/10.2527/af.2016-0020>
- Wang, Yan, Wang, L., Liu, F., Wang, Q., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhao, Y., & Liu, Y. (2016). Ochratoxin A Producing Fungi, Biosynthetic Pathway and Regulatory Mechanisms. In *Toxins* (Vol. 8, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/toxins8030083>
- Wang, Yan, Wang, L., Wu, F., Liu, F., Wang, Q., Xiaoling, Z., Selvaraj, J., Zhao, Y., Xing, F., Yin, W.-B., & Liu, Y. (2018). A Consensus Ochratoxin A Biosynthetic Pathway: Insights from the Genome Sequence of *Aspergillus ochraceus* and a Comparative Genomic Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 84, AEM.01009-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01009-18>
- Wang, Yanan, Wang, X., Wang, S., Fotina, H., & Wang, Z. (2022). Development of a Highly Sensitive and Specific Monoclonal Antibody Based on Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Zearalenone in Food and Feed Samples. In *Toxins* (Vol. 14, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/toxins14030220>
- Wangikar, P. B., Dwivedi, P., Sinha, N., Sharma, A. K., & Telang, A. G. (2005). Teratogenic effects in rabbits of simultaneous exposure to ochratoxin A and aflatoxin B1 with special

- reference to microscopic effects. *Toxicology*, 215(1), 37–47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.06.022>
- Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Goto, K., & Hara-Kudo, Y. (2011). Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 322. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-322>
- Wen, J., Mu, P., & Deng, Y. (2016). Mycotoxins: cytotoxicity and biotransformation in animal cells. *Toxicology Research*, 5(2), 377–387. <https://doi.org/10.1039/c5tx00293a>
- 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., & 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>
- Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M., & Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(5), 1106–1122. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.5.1106>
- Wu, J., Xu, W., Zhang, C., Chang, Q., Tang, X., Li, K., & Deng, Y. (2013). Trp266 determines the binding specificity of a porcine aflatoxin B₁ aldehyde reductase for aflatoxin B₁-dialdehyde. *Biochemical Pharmacology*, 86(9), 1357–1365. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.08.014>
- Wu, Q.-H., Wang, X., Yang, W., Nüssler, A. K., Xiong, L.-Y., Kuča, K., Dohnal, V., Zhang, X.-J., & Yuan, Z.-H. (2014). Oxidative stress-mediated cytotoxicity and metabolism of T-2 toxin and deoxynivalenol in animals and humans: an update. *Archives of Toxicology*, 88(7), 1309–1326. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1280-0>
- Wu, Q., Dohnal, V., Huang, L., Kuča, K., Wang, X., Chen, G., & Yuan, Z. (2011). Metabolic pathways of ochratoxin A. *Current Drug Metabolism*, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.2174/138920011794520026>
- Xiong, J., Xiong, L., Zhou, H., Liu, Y., & Wu, L. (2018). Occurrence of aflatoxin B1 in dairy cow feedstuff and aflatoxin M1 in UHT and pasteurized milk in central China. *Food Control*, 92, 386–390. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.022>
- Young, J., Zhou, T., Yu, H., Zhu, H., & Gong, J. (2007). Degradation of Trichothecene

Mycotoxins by Chicken Intestinal Microbes. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 45, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.028>

Yu, J. (2012). Current Understanding on Aflatoxin Biosynthesis and Future Perspective in Reducing Aflatoxin Contamination. *Toxins*, 4(11), 1024–1057. <http://10.0.13.62/toxins4111024>

Zachariasova, M., Dzuman, Z., Veprikova, Z., Hajkova, K., Jiru, M., Vaclavikova, M., Zachariasova, A., Pospichalova, M., Florian, M., & Hajslova, J. (2014). Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. *Animal Feed Science and Technology*, 193, 124–140. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.02.007>



ANEXOS

Anexo A. Publicación de artículo científico en revista Toxins

Anexo B. Concertación de estancia de investigación en el INTA-EEA Rafaela de Argentina

Anexo C. Formato de encuesta para recolección de datos durante muestreo

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

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

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

Anexo G. Técnica de Elisa para la cuantificación de AFM₁ en muestras de leche cruda

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

Anexo J. Variables y unidades de medición

Anexo K. Logística y recursos del proyecto

Anexo A. Publicación de artículo científico en revista Toxins



Article

Aspergillus flavus and Total Aflatoxins Occurrence in Dairy Feed and Aflatoxin M₁ in Bovine Milk in Aguascalientes, Mexico

Fernanda Álvarez-Días ¹, Barenca Torres-Parga ¹, Arturo Gerardo Valdivia-Flores ^{1,*}, Teódulo Quezada-Tristán ¹, José Isidro Alejos-De La Fuente ², Joaquín Sosa-Ramírez ¹ and Erika Janet Rangel-Muñoz ¹

¹ Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20131, Mexico; al266239@edu.uaa.mx (F.A.-D.); barenca.torres@gmail.com (B.T.-P.); teodulo.quezada@edu.uaa.mx (T.Q.-T.); jsosar@correo.uaa.mx (J.S.-R.); janelrangel@edu.uaa.mx (E.J.R.-M.)

² Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco 56230, Mexico; jalejosd@chapingo.mx

* Correspondence: avaldiv@correo.uaa.mx; Tel.: +52-449-910-8101



Citation: Álvarez-Días, F.; Torres-Parga, B.; Valdivia-Flores, A.G.; Quezada-Tristán, T.; Alejos-De La Fuente, J.I.; Sosa-Ramírez, J.; Rangel-Muñoz, E.J. *Aspergillus flavus* and Total Aflatoxins Occurrence in Dairy Feed and Aflatoxin M₁ in Bovine Milk in Aguascalientes, Mexico. *Toxins* 2022, 14, 292. <https://doi.org/10.3390/toxins14050292>

Received: 15 March 2022

Accepted: 16 April 2022

Published: 20 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Contamination of food chains by toxigenic fungi and aflatoxins is a global problem that causes damage to human health, as well as to crop and livestock production. The objective is to evaluate *Aspergillus flavus* and total aflatoxins (AFs) occurrence in totally mixed rations (TMRs) for dairy cows and aflatoxin M₁ (AFM₁) in milk for human consumption. Ninety-nine dairy production units located in Aguascalientes, Mexico, were randomly selected, and samples were collected from TMRs, raw milk, and milk marketed in the city in two consecutive agricultural cycles. AFs were quantified in TMRs and milk by indirect enzyme immunoassay and HPLC; aflatoxigenic and molecular (PCR) capacity of monosporic *A. flavus* isolates in the feed was characterized. All feed, raw, and pasteurized milk samples showed aflatoxin contamination (26.0 ± 0.4 µg/kg, 32.0 ± 1.0, and 31.3 ± 0.7 ng/L, respectively), and a significant proportion (90.4, 11.3, and 10.3%) exceeded the locally applied maximum permissible limits for feed and milk (20.0 µg/kg and 50 ng/L). Aflatoxin contamination in both TMRs and milk indicated a seasonal influence, with a higher concentration in the autumn–winter cycle when conditions of higher humidity prevail. The results obtained suggest the existence of contamination by aflatoxigenic *A. flavus* and aflatoxins in the diet formulated for feeding dairy cows and, consequently, in the dairy food chain of this region of the Mexican Highland Plateau.

Keywords: *Aspergillus flavus*; aflatoxins; aflatoxin M₁; dairy cows; Mexican Highland Plateau; totally mixed rations

Key Contribution: This report reveals the occurrence of *Aspergillus flavus* and its aflatoxins in the dairy food chain of the Mexican Highland Plateau, both in dairy cow feed and in the persistence of its hydroxylated metabolites in raw and pasteurized milk. Therefore, this study provides a basis for the determination of the risk that the urban population has of being exposed to the ingestion of aflatoxin metabolites that exceed the maximum permissible limits and expose their health to risk.

1. Introduction

Aspergillus spp. is a genus of telluric filamentous fungi very abundant on the planet. Most agricultural products for human or livestock intake are susceptible to contamination by these fungi during the various stages of cultivation, harvesting, storage, and transport [1]. Especially *A. flavus* has been associated with aflatoxins contamination in many different feed ingredients for dairy cows feeding [2,3].

Aflatoxins (AFs) are synthesized when *A. flavus* grows on grains, forages, and other substrates [4]. AFs are considered the most dangerous mycotoxins because of their great potential for liver, immune, and kidney damage [5,6]; moreover, chronic exposure to AFs

induces mutagenic, carcinogenic, and teratogenic effects [7,8]. Exposure to AFs represents a public health problem, as it is claimed that 20–50% of all cancers are related to dietary factors [9,10]. AFs also affect animal health and lead to a decrease in milk production, decreasing the profitability of dairy production units [1,11,12].

It has been reported that the global problem of AF contamination is more severe in tropical and subtropical climates [13]. In addition, evidence of AF contamination in dairy cow rations has been found in studies carried out in several countries [14–16]. In Mexico, it has been estimated that the natural frequency of AFs occurs widely (99.3%) in dairy cow feed, which has been associated with the presence (39.9%) of milk contamination by a hydroxylated derivative of AFs called aflatoxin M₁ (AFM₁) [17]. Thus, the presence of AFs in dairy cow feed represents a risk to human health by a carry-over effect since a fraction (1.0–6.0%) of ingested AFs are excreted in milk as AFM₁ [18].

Although multiple studies have been conducted on the food contamination scenario by *A. flavus* and AFs, the information available in the Mexican Highland Plateau region is scarce and dispersed. Therefore, the objective of this study was to evaluate the contamination by toxigenic strains of *A. flavus* and AFs of the total mixed ration (TMR) for dairy cows, as well as the risk of contamination by AFM₁ in the milk locally marketed in the Mexican Highland Plateau.

2. Results and Discussion

2.1. Fungi Isolation

Slightly less than half (48.4%) of the feed samples obtained from the dairy production units (DPU) were found to contain a fungal concentration greater than 10⁶ CFU/kg, while 10.1% showed a count greater than 10⁸ CFU/kg. In the feed samples, the growth of one or more fungal colonies was observed in 88.9% of the 99 participating DPUs. A total of 2496 fungal isolates were identified, of which 55.5% showed morphological characteristics coinciding with those described for the *Aspergillus* genus. Isolates with morphology corresponding to that of the genera *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Emericella*, and *Candida* were also found (21.0, 14.1, 3.6, 2.9, 1.6, 0.9, and 0.3%). Of the *Aspergillus* spp. isolates, 1.5% (21/1385) corresponded to *A. flavus* morphology. These proportions are consistent with those found in studies carried out in Mexico, where the same fungal genera were identified; likewise, moderate to high fungal contamination counts (higher than 10⁶ CFU/kg) have been found in feed and soil [17,19,20]. Only 19 *A. flavus* strains obtained from dairy cow feed produced AF (10.4 ± 1.7 mg/kg) in the culture media.

2.2. Molecular Characterization

Twenty-one TMR isolates congruent with the morphology of *A. flavus* and with the capacity to produce a detectable concentration of AFs in the culture media were obtained. All these isolates amplified the internal transcribed spacers region (ITS), the calmodulin gene (CaM), and the aflatoxin biosynthetic pathway gene (aflR). Therefore, they were identified as *A. flavus*, considering that the International Fungal Barcoding Subcommittee has proposed the ITS region as the default barcode for the identification of these fungi. Additionally, it has been pointed out that the CaM gene provides better resolution to identify most *Aspergillus* species [21], while the expression of the aflR gene is related to the AF production capacity of *A. flavus* isolates [22].

2.3. Quantification of Aflatoxins in Total Mixed Ration

AF contamination was detected in all TMR samples obtained from participating DPUs. The mean AF concentration was 26.0 ± 0.4 µg/kg. Of all samples, 90.4% exceeded the maximum permissible limit (MPL) of AFs for feed intended for dairy cows recommended by legislation in Latin America and the U.S. (20 µg/kg) [14], although all samples exceeded the current MPL for AF content in rations in the European Union (5 µg/kg). Other studies carried out in Mexico have also detected comparable values of AF contamination in both concentrated feeds and dairy cattle feed [17,19,23]. The formulation of the ration fed for

the dairy cows in each of the DPUs of the study was very heterogeneous since different ingredients and different proportions were used, and the origin of the foodstuffs was from states of the Mexican Highland Plateau. When concentrates or protein nuclei were included in the total mixed rations, there was a higher AF concentration ($p < 0.05$) compared with when they were not included (Table 1). The range of AF contamination in the samples with concentrates was not wide (25.9–27.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$), suggesting that the quality and composition of the concentrates were homogeneous; however, the proportion of samples exceeding the MRL was very large (87.5–100%). This may be because the main ingredients (cereals, oilseeds, flours, by-products) from which concentrate feeds or commercial protein nuclei are made are very susceptible to contamination by toxigenic fungi and, therefore, mycotoxins and come from different geographical origins [24].

Table 1. Odds ratio (OR) associated with the frequency of samples exceeding the maximum permissible limit (MPL) of aflatoxin (AF) concentration, according to the inclusion of feedstuffs in totally mixed rations used in dairy production units (DPU).

Feedstuff	DPU (n)	Incorporated into TMR			Not Incorporated into TMR			P(χ^2)	OR
		AF ($\mu\text{g}/\text{kg} \pm \text{SEM}$)	CI 95%	>MPL (%)	AF ($\mu\text{g}/\text{kg} \pm \text{SEM}$)	CI 95%	>MPL (%)		
Fresh forage	81	26.3 ^a \pm 0.4	25.7–26.9	92.0	24.8 ^a \pm 0.8	23.6–26.0	83.3	0.11	2.29
Grain	41	26.3 ^a \pm 0.6	25.5–27.1	92.7	25.8 ^a \pm 0.5	25.2–26.5	88.8	0.36	1.6
Agro-industrial by-product	21	25.2 ^a \pm 0.8	24.1–26.3	90.5	26.3 ^a \pm 0.4	25.7–26.8	90.4	0.99	1.0
Corn silage	88	25.9 ^a \pm 0.4	25.4–26.5	90.3	26.9 ^a \pm 1.1	25.4–28.4	90.9	0.93	0.9
Concentrate	78	26.5 ^a \pm 0.4	25.9–27.0	89.1	24.4 ^b \pm 0.8	23.3–25.5	95.2	0.23	0.4
Straw	89	25.9 ^a \pm 0.4	25.4–26.4	89.3	27.2 ^a \pm 1.1	25.6–28.8	100	0.12	0.0
Total	99	26.0 \pm 0.4	25.3–26.7	90.4					

MPL—maximum permissible limit 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$; ^{a,b}—means in the same row with different literals show statistically significant differences ($p < 0.05$; Tukey’s HSD test). Abbreviations: SEM—standard error of the mean; CI 95%—Confidence Interval at 95%; P(χ^2)—probability of the chi-square test ($p < 0.05$).

The average concentration of AFs in the TMR samples obtained in the autumn–winter period was significantly higher ($p < 0.05$) compared with the estimated AF concentration in the spring–summer period (Table 2). Similarly, a significant association (χ^2) was detected between samples collected in autumn–winter and the proportion of samples that exceeded the MRL ($p < 0.05$), so the risk (odds ratio) of finding feed with concentrations above the MRL was more than double that of the spring–summer period.

Table 2. Odds ratio (OR) associated with the frequency of feed and milk samples exceeding the maximum permissible limit (MPL) of aflatoxin (AF) or AFM₁ concentrations, according to sampling time in dairy production units (DPU).

Sampling Time	Mean \pm SEM	CI 95%	>MPL (%)	P(χ^2)	OR
Totally mixed rations (AF $\mu\text{g}/\text{kg}$)					
Fall–winter	26.9 ^a \pm 0.4	26.3–27.5	93.4	0.03	2.87
Spring–summer	24.1 ^b \pm 0.6	23.2–25.0	83.3		
Total	26.0 \pm 0.4	25.3–26.7	90.4		
Raw milk (AFM₁ ng/L)					
Fall–winter	36.1 ^a \pm 0.8	34.0–38.4	16.9	0.00	3.5
Spring–summer	27.8 ^b \pm 1.2	26.3–29.4	5.6		
Total	32.0 \pm 1.0	30.2–33.9	11.3		

MPL—maximum permissible limit in feed (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and raw milk (50 ng/L); ^{a,b}—means in the same column with different literals show statistically significant differences ($p < 0.05$; Tukey’s HSD test). Abbreviations: SEM—standard error of the mean; CI 95%: LL and UL—lower and upper confidence intervals at 95%; P(χ^2)—probability of the chi-square test ($p < 0.05$).

Coincidentally, the average AFM₁ content in milk obtained in the autumn–winter period was significantly higher ($p < 0.05$) compared with AFM₁ in samples collected in the spring–summer period (Table 2). Moreover, there was a significant association (χ^2 : $p < 0.01$)

in the proportion of milk samples that exceeded the MPL (50 ng/L) in a autumn–winter [25], so the odds ratio of finding milk with concentrations above the MPL was more than three times higher than in the –summer period.

These data suggest that there was a seasonality effect in the level of AFM₁ in milk and in the higher proportion of samples that exceeded the MPL; therefore, the season of the year with the highest contamination in milk coincided with the season of the highest presence of AFs in the rations. AFM₁ contamination has been reported in several countries around the world at levels that exceed the maximum permissible limit of European legislation [25]. Similar studies in Jordan, Iran, Italy, Brazil, Nicaragua, and Mexico have also found a seasonality effect, with winter being the season with the highest AFM₁ concentration in dairy products [26–31]. In this study, it was found that a high percentage (92%) of the samples with fresh forages (Table 1) had a high AF content, which coincides with the suggested idea that the result could be attributed to both the winter shortage of feedstuffs and a suggestion that the weather conditions prevailing in that season cause stress on toxigenic fungi, especially contaminating feedstuffs stored under inadequate conditions [32,33].

The results of this study show an association of AF contamination as a function of the climatic conditions prevailing during the crop growing and storage cycle of agricultural products, which has been attributed to the dependence of *A. flavus* on optimal conditions of water activity and ambient temperature (0.96–0.98 aw, 28–30 °C) for AF production [34,35]. The effect of time of year on aflatoxin contamination in dairy cattle feed in several countries has been described previously [17,27,33]. In the Mexican Highland Plateau, the highest agricultural production occurs during the spring–summer cycle, so both grains and fodder produced in that season go into storage and are distributed and used in the autumn–winter season [36]. AF contamination of stored agricultural products may be due to *A. flavus* causing infection in the field, as well as reinfection in storage when it finds optimal conditions of temperature and humidity [33]. This study found that most feed samples (90.4%) had AF contamination above the MPL applied in all the countries (20 µg/kg), regardless of their geographic origin (Table 3), suggesting that elevated contamination of raw materials was associated with TMR contamination as a widespread geographic event.

Table 3. Odds ratio (OR) associated with the frequency of dairy rations exceeding the maximum permissible limit (MPL) of aflatoxin (AF) concentration by the origin of feedstuffs included in totally mixed ration in dairy production units (DPU).

Origin of Feedstuffs (State)	DPU (n)	AF (µg/kg)	±SEM	CI 95%	>MPL (%)	P(χ ²)	OR
Durango	12	27.0 ^b	±1.0	25.5–28.4	87.5	0.61	1.4
Zacatecas	36	25.9 ^b	±0.6	25.1–26.8	93.1	0.34	0.6
Jalisco	51	26.3 ^b	±0.5	25.6–27.0	95.1	0.02	0.3
San Luis Potosí	2	32.1 ^a	±2.5	28.6–35.6	100	0.51	0.0
Michoacán	4	26.6 ^b	±1.8	24.1–29.2	100	0.35	0.0
Guarajuato	5	25.6 ^b	±1.6	23.3–27.8	100	0.29	0.0
Aguascalientes	99	26.0 ^b	±0.4	25.3–26.7	90.4	-	-
Total	99	26.0	±0.4	25.3–26.7	90.4		

MPL—maximum permissible limit in feed (20 µg/kg) and raw milk (50 ng/L). ^{a,b}—means in the same column with different literals show statistically significant differences ($p < 0.05$; Tukey's HSD test). Abbreviations: SEM—standard error of the mean; CI 95%: LL and UL—lower and upper confidence intervals at 95%; P(χ²)—probability of the chi-square test ($p < 0.05$).

2.4. Quantification of Aflatoxins in Pasteurized Milk

The presence of AFM₁ was found in all of the pasteurized milk samples marketed in city areas of the state of Aguascalientes; the samples registered AFM₁ levels in a range of 10.6–73.8 (ng/L), while the mean concentration was 30.9 ± 6.0 (ng/L), and 10.3% of the samples surpassed the MPL established by the European Union (50 ng/L) [25]. Although this concentration represents a risk to human health, the milk can be marketed because the MRL allowed by legislation in Mexico and all nations that follow the Codex Alimentarius

tolerates a tenfold higher content of AFM₁ in milk than the European standard [13]. In this study, a significant difference ($p < 0.05$) was observed between the means of AFM₁ concentration in milk marketed in the city as a function of the place of origin of the milk (Table 4); however, it was not related ($p > 0.05$) to the origin of the feed (Table 3). In a similar study that evaluated AFM₁ contamination in pasteurized and ultrapasteurized milk of different brands, the authors found aflatoxin contamination in milk from states located in the Mexican Highland Plateau [37].

Table 4. Odds ratio (OR) associated with the frequency of marketed milk surpassed the maximum permissible limit (MPL) of aflatoxin M₁ concentration (AFM₁), according to the origin of the pasteurizer brand.

Origin of Milk	Samples (n)	AFM ₁ (ng/L)	CI 95%	SEM	>MPL (%)	P(χ^2)	OR
State of Mexico	20	37.3 ^a	34.6–40.1	±2.4	20.0	0.03	2.52
Aguascalientes	33	34.9 ^{ab}	32.8–37.0	±1.7	16.7	0.06	2.08
Hidalgo	10	32.1 ^{abcd}	28.2–36.0	±2.9	10.0	0.96	0.97
Durango	41	31.9 ^{bc}	29.9–33.8	±1.5	12.2	0.52	1.29
Jalisco	30	28.9 ^{cd}	26.7–31.2	±1.2	3.3	0.05	0.26
Nuevo León	15	27.0 ^{cde}	23.8–30.1	±2.3	6.7	0.49	0.60
Guanajuato	18	25.6 ^{de}	22.7–28.5	±1.5	0.0	0.03	0.0
San Luis Potosí	3	18.1 ^e	11.0–25.2	±0.7	0.0	0.40	0.0
Mean	170	31.3	29.9–32.6	±0.7	10.3		

MPL—maximum permissible limit in milk (50 ng/L). ^{abcde}—means in the same column with different literals show statistically significant differences ($p < 0.05$; Tukey’s HSD test). Abbreviations: SEM—standard error of the mean; CI 95%/LL and UL—lower and upper confidence intervals at 95%; P(χ^2)—probability of the chi-square test ($p < 0.05$).

3. Conclusions

The results of the study indicated that contamination of the dairy food chain of the Mexican Highland Plateau is frequent through the occurrence of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and its aflatoxins, both in agricultural products and in the persistence of their hydroxylated metabolites in raw or pasteurized milk destined for human consumption. This fact is influenced by both the conditions prevailing in each agricultural cycle and the exchange of feed and traded milk among the different states that make up this biogeographic region. The results suggest that it is necessary to design more effective strategies to verify the safety of the ingredients used in feed formulation, with the purpose of offering safe dairy products to the consumer, as well as maintaining animal health and achieving the potential productivity of dairy cows.

4. Materials and Methods

4.1. Study Design

The study of the contamination of the dairy food chain in the Mexican highland plateau (MHP) was developed in the following three stages: (a) AF and *A. flavus* in TMR, (b) AFM₁ in raw milk, and (c) AFM₁ in milk marketed in urban areas. We selected dairy production units (DPUs) registered in the official registers (N = 3155) located in the biogeographic province of the MHP, which granted permission to obtain feed and raw milk samples and provided the reference data. A sample size ($n = 93 + 6$ possible defections) to estimate proportions was calculated for a finite population (without replacement), considering a precision of 10%, 95% confidence level, and an expected proportion of 0.5 of DPUs with TMR or milk contaminated by AF or AFM₁. Samples of TMR and milk were collected in 99 DPUs in two consecutive agricultural cycles (spring–summer and fall–winter 2020–2021). Additionally, samples of commercially sold milk (pasteurized and ultrapasteurized) were acquired by visiting each establishment included in an alphabetically ordered list of supermarkets in the state of Aguascalientes. The method of collecting commercial milk samples was nonprobabilistic in a “snowball” style, in which the acquisition of new milk samples was suspended when in three consecutive establishments no brands or origins

with the aid of software (Ridasoft Win ver. 1.8) and by comparing against a calibration curve prepared with purified aflatoxins (B₁, B₂, G₁, and G₂; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). The limit of quantification of the HPLC method for AF was 2.5 µg/kg.

AFM₁ quantification in milk samples was performed by indirect enzyme immunoassay [5,14,16]. The milk samples were skimmed by centrifugation (10 min/3500 s/10 °C), and the defatted supernatant was tested. The extraction of AFM₁ was performed with methanol (70%) according to the manufacturer's instructions (Ridascreen Fast[®] Aflatoxin and Aflatoxin M₁, R-Biopharm, Darmstadt, Germany, ref. R1121). The absorbance reading was performed in a microplate reader (ELx800TM, Bio Tek, Winooski, VT, USA) at 450 nm, and the results were compared to a calibration curve prepared with purified AFM₁ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

4.6. Statistical Analysis

Quantitative data were subjected to analysis of variance (ANOVA) using the general linear model (GLM) procedure in the Statistical Analysis System (2004) software. To identify significant differences in the categorical variables (samples exceeding or not exceeding the LMP), the Chi-square test (χ^2) was performed. A probability level of $p < 0.05$ was considered. The odds ratio was calculated using a ratio of the DPU portion that exceeded the MPL for AF concentration and were exposed to a specific factor (a particular feedstuff, sampling time, or milk origin) divided by the DPU portion that exceeded the MPL for AF concentration but was not exposed to that specific factor.

Author Contributions: Conceptualization, F.Á.-D. and A.G.V.-F.; methodology, E.J.R.-M.; resources, F.Á.-D. and B.T.-P.; data curation, B.T.-P.; writing—original draft preparation, F.Á.-D. and A.G.V.-F.; writing—review and editing, A.G.V.-F., T.Q.-T., J.I.A.-D.L.F. and J.S.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT, 951218) and the Universidad Autónoma de Aguascalientes (project: PIP/SA 19-1).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank the dairy-farm owners for allowing us access to their animals and data.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Magnoli, A.P.; Poloni, V.L.; Cavagliari, L. Impact of Mycotoxin Contamination in the Animal Feed Industry. *Curr. Opin. Food Sci.* **2019**, *29*, 99–108. [CrossRef]
- Rodríguez-Blanco, M.; Marín, S.; Sanchis, V.; Ramos, A.J. Fusarium Mycotoxins in Total Mixed Rations for Dairy Cows. *Mycotoxin Res.* **2020**, *36*, 277–286. [CrossRef] [PubMed]
- Rodríguez-Blanco, M.; Ramos, A.J.; Sanchis, V.; Marín, S. Mycotoxins Occurrence and Fungal Populations in Different Types of Silages for Dairy Cows in Spain. *Fungal Biol.* **2021**, *125*, 103–114. [CrossRef] [PubMed]
- Kebede, H.; Liu, X.; Jin, J.; Xing, F. Current Status of Major Mycotoxins Contamination in Food and Feed in Africa. *Food Control* **2020**, *110*, 106975. [CrossRef]
- Wacoo, A.; Wendiro, D.; Vuzi, P.; Hawumba, J. Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops. *J. Appl. Chem.* **2014**, *2014*, 706291. [CrossRef]
- Moudgil, V.; Redhu, D.; Dhanda, S.; Singh, J. A Review of Molecular Mechanisms in the Development of Hepatocellular Carcinoma by Aflatoxin and Hepatitis B and C Viruses. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **2013**, *32*, 165–175. [CrossRef]
- Iqbal, S.Z.; Jinap, S.; Pirouz, A.A.; Ahmad Faizal, A.R. Aflatoxin M₁ in Milk and Dairy Products, Occurrence and Recent Challenges: A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2015**, *46*, 110–119. [CrossRef]
- Hope, J. A Review of the Mechanism of Injury and Treatment Approaches for Illness Resulting from Exposure to Water-Damaged Buildings, Mold, and Mycotoxins. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 767482. [CrossRef]

9. IARC International Agency for Research on Cancer. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*; Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans IE Lyon, France, 2002; p. 590.
10. OMS Organización Mundial de la Salud. Las 10 Principales Causas de Defunción. Available online: <https://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/index2.html%0A> (accessed on 20 September 2019).
11. del Palacio, A.; Bettucci, L.; Pan, D. Fusarium and Aspergillus Mycotoxins Contaminating Wheat Silage for Dairy Cattle Feeding in Uruguay. *Braz. J. Microbiol.* **2016**, *47*, 1000–1005. [CrossRef]
12. Kemboi, D.C.; Antonissen, G.; Ochieng, P.E.; Croubels, S.; Okoth, S.; Kangethe, E.K.; Faas, J.; Lindahl, J.E.; Gathumbi, J.K. A Review of the Impact of Mycotoxins on Dairy Cattle Health: Challenges for Food Safety and Dairy Production in Sub-Saharan Africa. *Toxins* **2020**, *12*, 222. [CrossRef]
13. Wälte, H.G.; Schwake-Anduschus, C.; Geisen, R.; Fritsche, J. Aflatoxin: Food Chain Transfer from Feed to Milk. *J. Verbraucherschutz Leb.* **2016**, *11*, 295–297. [CrossRef]
14. Capelli, A.; Suárez, G.; García y Santos, C. Aflatoxinas En Alimentos y Leche de Vacas de 18 Establecimientos Comerciales de Las Regiones Centro-Sur y Este de Uruguay. *Veterinaria* **2019**, *55*, 52–56. [CrossRef]
15. Pleadin, J.; Vulić, A.; Peršić, N.; Škrivanko, M.; Capek, B.; Cvetnić, Ž. Aflatoxin B1 Occurrence in Maize Sampled from Croatian Farms and Feed Factories during 2013. *Food Control* **2014**, *40*, 286–291. [CrossRef]
16. Abbas, S.; Salah-Abbès, J.; Bouraoui, Y.; Oueslati, S.; Oueslati, R. Natural Occurrence of Aflatoxins (B-1 and M-1) in Feed, Plasma and Raw Milk of Lactating Dairy Cows in Beja, Tunisia, Using ELISA. *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* **2012**, *5*, 11–15. [CrossRef]
17. Rangel-Muñoz, E.; Valdivia-Flores, A.; Moreno-Rico, O.; Hernández-Delgado, S.; Cruz-Vázquez, C.; De-Luna-López, M.; Quezada, T.; Ortiz-Martínez, R.; Máyek-Pérez, N. Characterization of *Aspergillus flavus* and quantification of aflatoxins in feed and raw milk of cows in Aguascalientes, Mexico. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* **2020**, *11*, 435–454. [CrossRef]
18. Cenni, C.; Costanzo, N.; Spina, A.A.; Rodolfi, M.; Tilocca, B.; Piras, C.; Britti, D.; Morittu, V.M. Fungal Contamination and Aflatoxin B1 Detected in Hay for Dairy Cows in South Italy. *Front. Nutr.* **2021**, *8*, 641. [CrossRef]
19. Santibáñez Escobar, R.; Hernández Gallardo, M.; Montañez Valdez, O.D.; Tapia González, J.M.; Martínez Ibarra, J.A.; Avellaneda Ceballos, J.H. Identificación y Cuantificación de Hongos Micotoxigénicos En Alimento Para Bovinos. *Cienc. Tecnol.* **2011**, *4*, 19–23. [CrossRef]
20. Ortega-Beltran, A.; Jaime, R.; Cotty, P.J. Aflatoxin-Producing Fungi in Maize Field Soils from Sea Level to over 2000masl: A Three Year Study in Sonora, Mexico. *Fungal Biol.* **2015**, *119*, 191–200. [CrossRef]
21. Samson, R.A.; Visagie, C.M.; Houbaken, J.; Hubka, V.; Perrone, G.; Seifert, K.A.; Susca, A.; Szigeti, G.; Yaguchi, T.; Frisvad, J.C.; et al. Phylogeny, Identification and Nomenclature of the Genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* **2014**, *78*, 141–173. [CrossRef]
22. Okayo, R.O.; Andika, D.O.; Dida, M.M.; K’Otuto, G.O.; Gichimu, B.M. Morphological and Molecular Characterization of Toxicogenic *Aspergillus Flavus* from Groundnut Kernels in Kenya. *Int. J. Microbiol.* **2020**, *2020*, 8854718. [CrossRef]
23. Hernandez-Valdivia, E.; Valdivia, A.G.; Cruz-Vázquez, C.; Quezada, T. Diagnosis of Subclinical Aflatoxicosis by Biochemical Changes in Dairy Cows under Field. *Pak. Vet. J.* **2020**, *41*, 2074–2764. [CrossRef]
24. Martínez-Martínez, L.; Valdivia-Flores, A.G.; Guerrero-Barrera, A.L.; Quezada-Tristán, T.; Rangel-Muñoz, E.J.; Ortiz-Martínez, R. Toxic Effect of Aflatoxins in Dogs Fed Contaminated Commercial Dry Feed: A Review. *Toxins* **2021**, *13*, 65. [CrossRef] [PubMed]
25. Sharaf, S.O. Aflatoxin M1 Levels in Raw Milk, Pasteurised Milk and Infant Formula. *Ital. J. Food Saf.* **2016**, *5*, 5788. [CrossRef]
26. Flores-Flores, M.E.; Lizarraga, E.; López de Cerain, A.; González-Peñas, E. Presence of Mycotoxins in Animal Milk: A Review. *Food Control* **2015**, *53*, 163–176. [CrossRef]
27. Bahrami, R.; Shahbazi, Y.; Nikousefat, Z. Occurrence and Seasonal Variation of Aflatoxin in Dairy Cow Feed with Estimation of Aflatoxin M1 in Milk from Iran. *Food Agric. Immunol.* **2016**, *27*, 388–400. [CrossRef]
28. Picinin, L.C.A.; Cerqueira, M.M.O.P.; Vargas, E.A.; Lana, Á.M.Q.; Toaldo, I.M.; Bordignon-Luiz, M.T. Influence of Climate Conditions on Aflatoxin M1 Contamination in Raw Milk from Minas Gerais State, Brazil. *Food Control* **2013**, *31*, 419–424. [CrossRef]
29. Fallah, A.A.; Rahnama, M.; Jafari, T.; Saei-Dehkordi, S.S. Seasonal Variation of Aflatoxin M1 Contamination in Industrial and Traditional Iranian Dairy Products. *Food Control* **2011**, *22*, 1653–1656. [CrossRef]
30. Peña-Rodas, O.; Martínez-López, R.; Pineda-Rivas, M.; Hernández-Rauda, R. Aflatoxin M1 in Nicaraguan and Locally Made Hard White Cheeses Marketed in El Salvador. *Toxicol. Rep.* **2020**, *7*, 1157–1163. [CrossRef]
31. Kamkar, A.; Khaniki, G.; Alavi, S.A. Occurrence of Aflatoxin M1 in Raw Milk Produced in Ardebil of Iran. *Iran. J. Environ. Health Sci. Eng.* **2011**, *8*, 123–128.
32. Omar, S. Incidence of Aflatoxin M1 in Human and Animal Milk in Jordan. *J. Toxicol. Environ. Health. A* **2012**, *75*, 1404–1409. [CrossRef]
33. Ismail, A.; Riaz, M.; Akhtar, S.; Yoo, S.H.; Park, S.; Abid, M.; Aziz, M.; Ahmad, Z. Seasonal Variation of Aflatoxin B1 Content in Dairy Feed. *J. Anim. Feed Sci.* **2017**, *26*, 33–37. [CrossRef]
34. Medina, A.; Akbar, A.; Baazeem, A.; Rodríguez, A.; Magan, N. Climate Change, Food Security and Mycotoxins: Do We Know Enough? *Fungal Biol. Rev.* **2017**, *31*, 143–154. [CrossRef]
35. Assunção, R.; Martins, C.; Viegas, S.; Viegas, C.; Sletting Jakobsen, L.; Pires, S.; Alvim, P. Climate Change and the Health Impact of Aflatoxins Exposure in Portugal—An Overview. *Food Addit. Contam. Part A* **2018**, *35*, 1610–1621. [CrossRef] [PubMed]

36. Vázquez Badillo, M.E.; Moreno Martínez, E. Poscosecha de Granos Básicos En El Medio Rural. *Claridades Agropecuarias* **2016**, *217*, 52.
37. Carvajal, M. Transformación de La Aflatoxina B1 de Alimentos, En El Cancerígeno Humano, Aducto AFB1-ADN. *Rev. Espec. Cienc. Químico-Biol.* **2013**, *16*, 109–120. [[CrossRef](#)]
38. Leck, A. Preparation of Lactophenol Cotton Blue Slide Mounts. *Community Eye Health* **1999**, *12*, 24.
39. Klich, M.A. *Identification of Common Aspergillus Species*, 1st ed.; Centraalbureau voor Schimmelcultures: Utrecht, The Netherlands, 2002.
40. Raper, K.B.; Fennell, D.I. *The Genus Aspergillus*; Williams and Wilkins Co.: Baltimore, MD, USA, 1965.
41. Hoffman, C.S.; Winston, F. A Ten-Minute DNA Preparation from Yeast Efficiently Releases Autonomous Plasmids for Transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **1987**, *57*, 267–272. [[CrossRef](#)]
42. Saito, M.; Machida, S. A Rapid Identification Method for Aflatoxin-Producing Strains of *Aspergillus Flavus* and *A. Parasiticus* by Ammonia Vapor. *Mycoscience* **1999**, *40*, 205–208. [[CrossRef](#)]
43. Fani, S.R.; Moradi, M.; Probst, C.; Zamanizadeh, H.; Mirabolfathy, M.; Haidukowski, M.; Logrieco, A. A Critical Evaluation of Cultural Methods for the Identification of Atoxigenic *Aspergillus Flavus* Isolates for Aflatoxin Mitigation in Pistachio Orchards of Iran. *Eur. J. Plant Pathol.* **2014**, *140*, 631–642. [[CrossRef](#)]
44. Geiser, D.M.; Pitt, J.I.; Taylor, J.W. Cryptic Speciation and Recombination in the Aflatoxin-Producing Fungus *Aspergillus Flavus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 388–393. [[CrossRef](#)]
45. Shapira, R.; Paster, N.; Eyal, O.; Menashevo, M.; Mett, A.; Salomon, R. Detection of Aflatoxigenic Molds in Grains by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 3270–3273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. In *PCR Protocols*; Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., Eds.; Academic Press, Inc.: New York, NY, USA, 1990; pp. 315–322. [[CrossRef](#)]
47. Scott, P.M. Mycotoxin Methodology. *Food Addit. Contam.* **1995**, *12*, 395–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Anexo B. Concertación de estancia de investigación en el INTA-EEA Rafaela de Argentina


CONICET **INTA**
IdCaL
"2022 - Las Malvinas son Argentinas"

Rafaela, 9 de mayo de 2022

A quien corresponda:

Por la presente, en mi carácter de Director del Instituto de Investigación de la Cadena Láctea – IdCaL (CONICET – INTA), emito esta carta de aceptación e invitación para que la alumna María Fernanda Álvarez Días realice una estancia en el Instituto durante el período septiembre – noviembre de 2022. El director de dicha estancia será Marcelo Signorini perteneciente al Área de Sanidad Animal.

Quedo a su disposición por cualquier duda o aclaración, saludos


Ing. Prod. Agrar. MSc. JORGE VILLAR EZCURRA
DIRECTOR
EEA INTA RAFAELA
Jorge Villar Ezcurra
Director del IdCaL



I D I C A L

"2022 – LAS MALVINAS SON ARGENTINAS"

Plan de trabajo

Estancia en el Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (INTA – CONICET)

El objetivo general de esta estancia es que la doctoranda adquiera sólidos conceptos estadísticos y epidemiológicos aplicados a la identificación de factores de riesgos asociados a la presencia de aflatoxina M₁ en leche cruda y productos lácteos que sirvan como sustento científico en la definición de estrategias de control.

Los objetivos específicos son:

1. Se realizará una aproximación al sistema de producción primaria de leche bovina en Argentina y a las investigaciones existentes sobre la presencia y los niveles de contaminantes en la leche cruda en tambos de la cuenca lechera central Argentina.
2. Capacitar en la metodología estadística disponible para la identificación de factores de riesgo asociados a la presencia de contaminantes en la leche cruda, especialmente aflatoxina M₁.
3. Capacitar en la metodología requerida para la realización de evaluaciones cuantitativas de riesgo, especialmente enfocadas a peligros químicos asociados con la ingesta de leche y productos lácteos.
4. Entrenamiento en la utilización de herramientas estadísticas y epidemiológicas como base científica para proponer estrategias de manejo del riesgo destinadas a evitar o minimizar los riesgos para la salud humana y animal debido a la presencia de contaminantes en la leche.

Actividades a realizar durante la pasantía

Objetivo 1: Se realizarán visitas guiadas a establecimientos lecheros de la cuenca lechera central santafesina además de los existentes en la EEA Rafaela INTA (Tambo Roca, Tambo Experimental, UPLI y Tambo Robot). Se analizarán los aspectos fundamentales de dichos establecimientos (nutrición, manejo de cultivos, manejo sanitario de los rodeos lecheros, facilidades y equipamientos disponibles) y se realizarán comparaciones con los sistemas lecheros existentes en México. Se realizarán entrevistas con profesionales de la EEA Rafaela INTA y del Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (INTA-CONICET) para conocer aspectos específicos de los sistemas lecheros argentinos, se dialogará sobre las líneas de investigación actualmente en curso y la problemática sectorial actual y a futuro.

Adicionalmente, se realizará una búsqueda bibliográfica exhaustiva, empleando las bases de datos disponibles por el sector de Ciencia y Tecnología, sobre la presencia de contaminantes en leche, con énfasis en aflatoxina M₁. Se compararán dichos estudios con los disponibles en México.

EEA RAFAELA – Centro Regional Santa Fe
 Ruta Nacional 34 Km 227 - 2300 | Rafaela – Santa Fe | Tel 03492-440121 Fax 03492-440114
 eearafe@a.sdir@inta.gob.ar | www.inta.gob.ar/rafaela



Ministerio de Agricultura,
 Ganadería y Pesca
 Presidencia de la Nación



I D I C A L

"2022 - LAS MALVINAS SON ARGENTINAS"

Objetivo 2: Se realizará una capacitación sobre las bases estadísticas aplicadas en el proceso de identificación de factores de riesgos asociados a la presencia de aflatoxina M_1 en leche cruda. Se abordarán aspectos metodológicos para realizar estudios epidemiológicos observacionales transversales, definición del número de establecimientos a incorporar, diseño y aplicación de encuestas, recopilación de datos y sistematización de los datos disponibles. Posteriormente, se abordarán las metodologías estadísticas usuales para la identificación de factores de riesgos (chi-cuadrado y test exacto de Fisher, regresión logística, Modelos Lineales Generalizados simples y mixtos) así como los programas estadísticos disponibles. Se trabajará con bases de datos reales disponibles en el IdICaL, se ejecutarán las técnicas estadísticas y se capacitará sobre su interpretación.

Objetivo 3: La segunda herramienta sobre la cual se brindará asistencia y capacitación a la pasante es sobre la realización de evaluaciones cuantitativas de riesgos en general y sobre la presencia de aflatoxina M_1 presente en leche y productos lácteos. Inicialmente, se trabajará sobre la base estadística y probabilística de la técnica, se profundizará sobre la manera de generar modelos estocásticos de riesgos y se entrenará sobre el uso del software más reconocido para la realización de dicha actividad (@Risk). Finalmente, se capacitará sobre la interpretación de los resultados y se realizará una lectura crítica de artículos científicos sobre evaluaciones de riesgos en peligros que afectan la seguridad alimentaria en general y sobre aflatoxina M_1 en leche bovina en particular.

Objetivo 4: A partir de la información generada por los dos objetivos anteriores, se entrenará en la utilización de los resultados de las técnicas estadísticas y epidemiológicas para definir estrategias de manejo de los riesgos en seguridad alimentaria en general y sobre aflatoxina M_1 en particular. Se realizará una búsqueda de artículos científicos relacionados con esta actividad y se procederá a su lectura crítica y discusión grupal.

Marcelo Signorini

Director de la estancia

IdICaL (INTA - CONICET)

EEA RAFAELA - Centro Regional Santa Fe
 Ruta Nacional 34 Km 227 - 2300 | Rafaela - Santa Fe | Tel 03492-440121 Fax 03492-440114
 eearafeela.sdr@inta.gob.ar | www.inta.gob.ar/rafaela



Ministerio de Agricultura,
 Ganadería y Pesca
 Presidencia de la Nación

Anexo D. Técnica de vaciado en placa por diluciones seriadas 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 gelificado 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 depositará 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 horas. Las placas se revisaron diariamente y las observaciones se registraron en una bitácora.



Anexo E. 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 cultivos en los que se observó crecimiento fúngico.

Se dejó el material 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, colonia, número de aislado y fecha. Las preparaciones se observaron al microscopio óptico (Carl Zeiss, Axiostar plus, EUA) a diferentes aumentos (5x, 10x y 40x) para identificar sus características morfológicas microscópicamente y determinar el género del hongo. La identificación de hongos a nivel de género se realizó con la ayuda de las descripciones de Barnett y Hunter (1998). La identificación morfológica de las especies *Aspergillus*, se basó en las claves taxonómicas descritas por Klich (2002), para *Fusarium*, se utilizaron las descripciones de Leslie y Summerell (2006). Se registró en una bitácora el género de las colonias identificadas y se realizó la cuantificación de UFC/g con la fórmula:

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

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).

Anexo F. Técnica de Elisa para la cuantificación de aflatoxinas 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 utilizaron a temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F). Como solución de lavado se utilizó un tampón PBS-Tween, el sobre completo del tampón se disolvió en un litro de agua destilada, el tampón se mantuvo estable entre cuatro y seis semanas a una T° de 2 a 8°C (35-46°F).

Se colocaron pocillos suficientes en el soporte de la microplaca para los estándares y las muestras. Se registró la posición de los estándares y las muestras en una hoja impresa en la que 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 enérgicamente en un recipiente (tres veces consecutivas), se limpió la microplaca para la eliminación de los residuos líquidos con golpes ligeros en el marco del portapocillos sobre un papel absorbente.

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. El lavado 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 a 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 micotoxinas correspondiente a la absorción se leyó directamente en la curva de calibración para cada micotoxina (Figura 37).

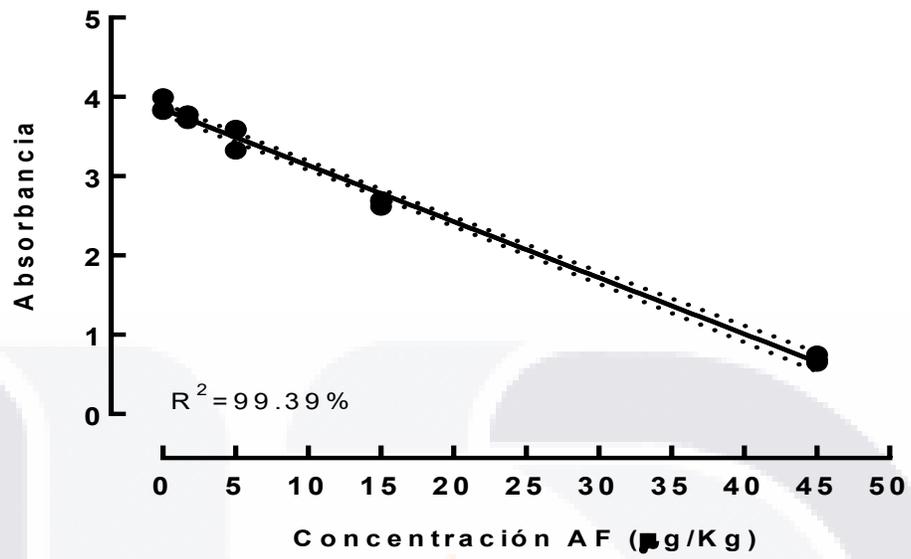


Figura 37. Curva de estándar para aflatoxinas totales cuantificadas con ELISA

Anexo G. Técnica de Elisa para la cuantificación de AFM₁ en muestras de leche cruda

Las muestras de leche cruda se descremaron mediante centrifugación (10 min/3500 s/10°C). Después de la centrifugación se separó la capa superior de crema con ayuda de una pipeta Pasteur. En los pocillos de la microplaca se agregaron 100µL de anticuerpo diluido y se incubó en obscuridad durante 15 min. Posteriormente, se eliminó el líquido de los pocillos y se enjuagó con 250µL de solución de lavado dos veces. La microplaca fue secada con papel absorbente. Se agregaron 100µL de cada estándar y 100µL de cada muestra por duplicado en la microplaca. Se Incubó durante 30 min a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad. Se eliminaron los residuos de líquido de la placa y se lavó con 250µL de solución de lavado dos veces. Después se secó la placa con papel absorbente. Se agregaron 100µL de conjugado de enzima diluida a cada uno de los pozos. La placa se agitó ligeramente y se incubó en oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente. Se eliminaron los residuos de líquido de la placa y se lavó con 250µL de solución de lavado dos veces. Se secó la microplaca con papel absorbente.

Se agregaron 100µL de substrato/cromógeno a cada pocillo, se agitó la placa e incubó en oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente. Se agregaron 100µL de solución stop a cada pocillo. Se mezcló el contenido de la placa suavemente y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas de ELISA (ELx800TM, Bio Tek, EUA). Los resultados de la absorbancia se registraron en una bitácora y se calculó la concentración de AFM₁ usando el software Ridasoft Win versión 1.8 a partir de los datos de una curva de calibración elaborada a partir de estándares de concentración de micotoxinas conocida (Figura 38).

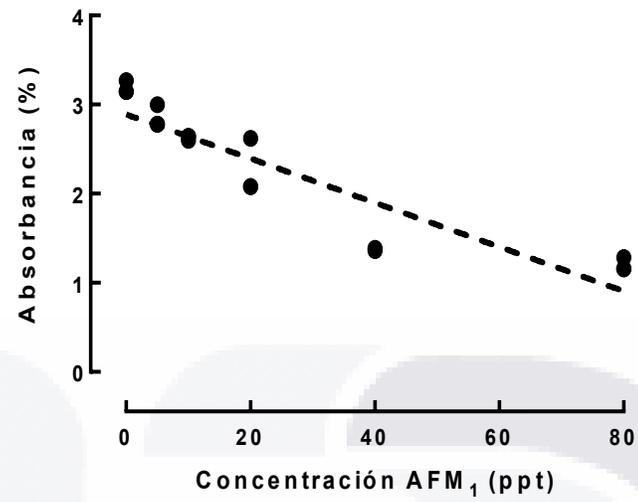


Figura 38. Curva de estándar para AFM₁ cuantificadas con ELISA

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

En condiciones asépticas, se pesarán 200 g de coco rallado y se agregarán 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 guardarán 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 oscuridad 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 I. Técnica de Elisa para la cuantificación de aflatoxinas totales de aislados compatibles con la morfología *Aspergillus*

Dentro de la campana de flujo laminar, en ambiente estéril, se tomó una porción del micelio polisporico 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 verterán 100 μ L de la solución de esporas. Se agitará 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 registró el peso de los cultivos monospóricos. Dentro de la campana de extracción los cultivos se cortaron en tiras y se colocaron con ayuda de una espátula en matraces de 250 mL. Se realizaron extracciones de las colonias utilizando las sustancias e indicaciones descritas en los protocolos de los kits comerciales para cada micotoxina. Se filtraron sobre papel filtro con porosidad 1, se usaron 50 μ L del filtrado para cada uno de los pocillos de la microplaca del kit comercial de ELISA (R-Biopharm, Alemania) y se siguió el procedimiento descrito en el anexo D 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 micotoxinas correspondiente a la absorción se leyó directamente en la curva de calibración de aflatoxinas (Figura 37).

Anexo J. Variables y unidades de medición

Variables	Cualitati va	Cuantitativ a	Unidad de medición
Zootécnicas			
Composición de la RTM	X		Pajas y/o rastrojos, 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	%
Meteorológicas			
Temperatura media mensual		X	°C
Temperatura máxima mensual		X	°C
Temperatura máxima máxima		X	°C
Temperatura mínima mensual		X	°C
Temperatura mínima mínima		X	°C
Precipitación pluvial mensual		X	mm
Días con lluvia en el mes		X	N° días
Agronómicas			
Variedad de maíz	X		Nominal
Manejo de cultivo	X		Categórica
Presencia de plagas y enfermedades	X		Categórica
De respuesta (Toxicológicas)			
Contaminación de RTM por colonias micotoxigénicas (<i>Aspergillus, Fusarium, Penicillium</i>)		X	UFC/g de muestra
Nivel de contaminación UFC/g	X		Bajo, moderado, alto
Contaminación de RTM por AF		X	µg/kg
Muestras de RTM que exceden LMP de AF	X		Si, No
Contaminación de muestras de leche por AFM ₁		X	ng/kg
Muestras de leche que exceden LMP de AFM ₁	X		Si, No

(Nota: cada "X" corresponde a un mes) En verde: actividades realizadas. En naranja:
actividades reprogramadas

Fuentes de recursos para el desarrollo del proyecto

Los recursos técnicos y económicos se obtienen del proyecto institucional PIP/SA22-2
"Control de micotoxinas en ración total mezclada de vacas lecheras con base en
información climática".

