



Caracterización de *Aspergillus flavus* y cuantificación de aflatoxinas en pienso y leche cruda de vacas en Aguascalientes, México



Erika Janet Rangel-Muñoz ^a

Arturo Gerardo Valdivia-Flores ^{a*}

Onésimo Moreno-Rico ^b

Sanjuana Hernández-Delgado ^c

Carlos Cruz-Vázquez ^d

María Carolina de-Luna-López ^a

Teódulo Quezada-Tristán ^a

Raúl Ortiz-Martínez ^a

Netzahualcóyotl Máyek-Pérez ^e

^a Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Agropecuarias, Av. Universidad 940, Col Cd. Universitaria, 20131, Aguascalientes, México.

^b Universidad Autónoma de Aguascalientes. Centro de Ciencias Básicas. Aguascalientes, Aguascalientes, México.

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

^d Instituto Tecnológico El Llano, Municipio de El Llano, Aguascalientes, México.

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

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

Resumen:

La contaminación de productos agrícolas y pecuarios con aflatoxinas (AF) está distribuida mundialmente. Las AF son tóxicas, inmunodepresoras y carcinogénicas, pero en México es escasa la información sobre *Aspergillus flavus*, principal hongo que las produce. El objetivo fue caracterizar morfológica, molecular y aflatoxigénicamente aislados de *A. flavus* y cuantificar AF en pienso y en leche de vacas Holstein en Aguascalientes (México). Se seleccionó por conveniencia una unidad de producción lechera (2,749 vacas) y se recolectaron muestras mensuales (24 meses) de ingredientes alimenticios y ración total mezclada (n= 267), leche cruda (n= 288) y suelo agrícola (n= 40), las cuales se cultivaron (PDA) mediante vaciado en placa con diluciones seriadas. Los hongos se caracterizaron mediante MEB, TLC y vapores de amonio en agar coco; se secuenciaron los genes de calmodulina y regulador de la ruta biosintética de AF, así como la región de los espaciadores internos de la transcripción. Se cuantificaron AF en pienso con HPLC y en leche con ELISA. Se caracterizaron molecularmente 283 aislados fúngicos; 88 resultaron ser *Aspergillus spp*, de los que 5 fueron *A. flavus* con capacidad aflatoxigénica y uno no aflatoxigénico. El 99.3 % de las muestras de alimento y 39.9 % de las muestras de leche presentaron niveles detectables de AF (14.8 y 0.021 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Las vacas ingirieron diariamente 621 μg de AF y eliminaron el 0.09 % como aflatoxina M₁ en leche. Lo anterior sugiere que la ocurrencia *A. flavus* aflatoxigénico en el alimento de vacas lecheras conduce a una amplia contaminación por AF de las dietas y de la cadena alimenticia.

Palabras clave: Aflatoxinas, *A. flavus*, Alimentos lácteos, Gen de calmodulina, Gen regulador de aflatoxinas.

Recibido: 04/09/2018

Aceptado: 29/04/2019

Introducción

La lechería bovina mexicana se desarrolla especialmente en una provincia biogeográfica denominada Altiplano central mexicano⁽¹⁾. En el interior de esta región, las unidades de producción lechera (UPL) enfrentan problemas de insuficiencia en la producción, rentabilidad económica y de inocuidad de los productos⁽²⁾. Dentro de los problemas de inocuidad se ha resaltado la presencia de aflatoxinas (AF) porque ocasionan un fuerte impacto económico asociado a la contaminación de las cosechas agrícolas, al deterioro de la salud de los animales, la disminución de su productividad, así como a la contaminación de alimentos de origen animal⁽³⁾. Las AF tienen propiedades hepatotóxicas, nefrotóxicas e

inmunosupresoras, y son consideradas como los carcinógenos naturales más potentes que se conocen⁽⁴⁾. Las AF se han cuantificado en piensos, leche y productos lácteos destinados para la alimentación de la población humana mexicana⁽⁵⁻⁷⁾. Lo cual sugiere que la presencia de AF en el pienso de las vacas es un problema usual en las UPL que induce a la contaminación de la leche con los metabolitos de AF.

Cuando las vacas lecheras ingieren productos agrícolas contaminados con AF, los mecanismos enzimáticos bioactivan la micotoxina mediante la formación de un epóxido que reacciona con las estructuras celulares y ácidos nucleicos dañando su integridad⁽⁴⁾. El epóxido reactivo puede también neutralizarse mediante su conjugación con glutatión o su excreción como un metabolito que se elimina en la leche principalmente como aflatoxina M₁ (AFM₁); también AFM₁ es considerada como un agente tóxico y carcinogénico para los humanos⁽⁴⁾.

Las AF son metabolitos secundarios de varios hongos filamentosos del género *Aspergillus*, los cuales se encuentran distribuidos mundialmente y contaminan una gran variedad de productos agrícolas, especialmente los cereales⁽⁸⁾. También *A. flavus* ha sido identificado en México, tanto en suelo agrícola y como en grano de maíz^(9,10). La reproducción asexual del género *Aspergillus* ha sido descrita previamente^(11,12), así como también su filogenia, morfología y ciclo biológico^(8,13). Aunque *Aspergillus flavus* es considerado la especie con mayor capacidad de producción de aflatoxinas⁽¹⁴⁾, también hay cepas de *A. flavus* sin capacidad aflatoxigénica, así como otras especies de *Aspergillus* que producen AF (*A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudonomius*, *A. arachidicola*, *A. bombycis*, *A. pseudotamarii*, *A. minisclerotigenes* y *A. togoensis*)⁽¹⁵⁾. La capacidad aflatoxigénica se expresa principalmente bajo condiciones de estrés ambiental^(16,17), siempre y cuando su genotipo incluya la información involucrada en la cadena metabólica de producción de AF^(18,19). Una estrategia para la identificación molecular de las diferentes especies del género *Aspergillus* es el empleo del gen de la calmodulina (CaM), los fragmentos correspondientes a la región de los espaciadores internos de la transcripción (ITS) y el gen regulador de la ruta biosintética de aflatoxinas (*aflR*)^(8,20).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar morfológica, molecular y aflatoxigénicamente aislados de *Aspergillus flavus* obtenidos de unidades de producción lechera del altiplano central mexicano.

Material y métodos

Lugar de estudio

El estudio se realizó con un diseño descriptivo, longitudinal y no experimental. Se seleccionó una unidad de producción lechera con el método no probabilístico por conveniencia y se le

dio seguimiento por 24 meses. La UPL se ubicó en el Altiplano Central Mexicano (21°48'N, 102°03' O; 1986-2008 msnm), con clima templado-seco y semicálido-semiseco, con lluvias en verano, temperatura promedio de 18.4 °C, precipitación pluvial anual de 518.4 mm y altitud máxima de 2,300 msnm.

En el periodo de observación, la UPL contó con un promedio de 2,749 vacas Holstein, alojadas en estabulación libre dentro de corrales limitados con cercas metálicas, áreas sombreadas y comederos al libre acceso. El proceso de ordeño de las vacas se realizó con equipo automatizado obteniendo una producción promedio diario por vaca de 28.1 litros. La producción láctea se destinó a plantas agroindustriales de la región. Las dietas alimenticias se elaboraron como una ración total mezclada (RTM) en una fábrica de piensos, donde el ensilaje de maíz y el concentrado se incorporaron en carros mezcladores. La RTM se formuló para satisfacer los requerimientos nutricionales de las vacas lecheras. El maíz para ensilaje se obtuvo directamente de las áreas agrícolas de la UPL, mientras que el concentrado proteico-energético se adquirió en la Asociación Local de Ganaderos Lecheros de Aguascalientes; empleando como principales ingredientes canola, soya, maíz rolado, sorgo, pasta de soya, grano de maíz seco destilado, semilla de algodón, heno de alfalfa y avena, así como premezcla de vitaminas y minerales.

Obtención y manejo de muestras

Se obtuvieron un total de 288 muestras alimenticias (1.0 kg): ración total mezclada (RTM), alimento concentrado y ensilaje de maíz; se secaron en una estufa con circulación forzada de aire (OF-22G JEOI-TECH, Lab Companion, Corea). Las muestras se pulverizaron (500-800 μm) en un molino universal de funcionamiento continuo (MF series 10 Basic, IKA®-Werke, Alemania) y se almacenaron en refrigeración (4-5 °C) hasta su procesamiento (< 7 días). Durante el ordeño (matutino y vespertino) se obtuvieron un total de 288 muestras de leche cruda, directamente del tanque recolector (500 ml), por cada lote productivo (altas, medias y bajas). Las muestras se transportaron en refrigeración y se conservaron en congelación (-20°C) hasta su procesamiento (< 7 días).

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

Cuantificación de aflatoxinas

Las muestras de alimento se analizaron de acuerdo con el método oficial 990.33 de la AOAC⁽²¹⁾, empleando columnas de fase sólida (SPE; SupelcleanTM LC-18 SPE tube, Sigma-Aldrich, EUA). El eluato extraído de las muestras derivatizadas con ácido trifluoroacético se analizó mediante HPLC (Límite mínimo de detección 2 µg/kg) con detector de fluorescencia (Bomba binaria Varian Pro Star; FP detector 2020, Varian Associates Inc., Victoria, Australia), columna C18 y guarda columna (LC-18 y LC-18; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Los datos de cuantificación se obtuvieron a través del software Galaxie (Ver. 1.9.302.530) y las concentraciones de AF se calcularon mediante curvas estándar de AF purificadas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). La AFM₁ se cuantificó en la leche cruda con la técnica de ELISA competitivo empleando un kit comercial (Ridascreen fast[®] aflatoxin M₁ R-1121, R-Biopharm, Alemania; rango de detección 0.005-0.08 µg/kg). De acuerdo a las instrucciones del fabricante, las muestras se homogeneizaron y se centrifugaron. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector de microplacas de ELISA (BioTek Instruments, Inc., USA). Los resultados se interpretaron con base a la curva de calibración realizada con AFM₁ purificada (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Aislamiento y caracterización fúngica

Los hongos se aislaron empleando la técnica de vaciado en placa con cuatro diluciones seriadas en agua peptonada estéril⁽²²⁾; las muestras se sembraron en agar papa y dextrosa (PDA), extracto de malta con rosa de Bengala y Czapeck; se incubaron (28 °C) en oscuridad durante 7 días. Se aislaron y purificaron las colonias y se identificaron las características morfológicas microscópicas congruentes con la descripción del género⁽¹³⁾. Los aislados congruentes con *A. flavus*^(8,13) se sometieron al proceso de fijación con glutaraldehído (2%), deshidratación con alcoholes graduales y acondicionamiento con un secador de punto crítico (Samdri 795, Tousimis Research Rockville, Meryland) y un metalizador (Desk II, Denton Vacuum, EUA); se digitalizaron en un microscopio electrónico de barrido (JSM-5900 LV, JEOL, EUA) y se realizaron diez mediciones de cada estructura (estípita, vesícula, espora, esclerocio y fiálide) mediante un software (JEOL Scanning Electron Microscope). Las estructuras morfológicas de los aislados identificados se compararon contra cepas conocidas de *A. flavus*, denominadas AF-36, AF-Cuatitlán (AF-C) y AF-Tamaulipas, (AF-T)^(14,23). Las cepas obtenidas en este estudio fueron registradas en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) con las claves de acceso respectivas.

La capacidad aflatoxigénica de los aislados se caracterizó mediante cromatografía en capa fina (TLC)⁽²⁴⁾; se usaron placas de sílica gel sin indicador de fluorescencia (Z265829, Sigma-Aldrich, EUA) activadas en una estufa de alta temperatura (OF-22G JEOI-TECH, Lab

Companion, Corea). Las placas con estándares purificados de AF (A6636-50MG, Sigma Aldrich, EUA) se colocaron dentro de una cámara cromatográfica con fase móvil cloroformo:acetona:isopropanol (85:10:5, v/v/v) durante hora y media. Finalmente, las placas secas se visualizaron en un transiluminador. También se utilizó la técnica de vapores de amonio en agar coco de acuerdo a la metodología descrita anteriormente⁽²⁵⁾. Se inocularon aislados monospóricos en agar coco estéril y se dejaron incubar en oscuridad (30 °C, 5-7 días). Posteriormente, se agregó hidróxido de amonio (200 µl; J.T. Baker, México) al 25% en la tapa de las cajas Petri y se observó la distribución y la intensidad del color. La presencia de color se tomó como indicativo de producción de AF.

Análisis molecular

La extracción de ADN genómico de cultivos monospóricos de *Aspergillus* spp. se realizó siguiendo métodos estandarizados previamente⁽²⁶⁾. La calidad de ADN obtenido se visualizó con electroforesis (45 min a 85 volts) en gel de agarosa (1%) con amortiguador TAE 1X y se cuantificaron comparando contra concentraciones conocidas de ADN de fago λ (Thermo Fisher Scientific, MA USA). La visualización del ADN se realizó en un fotodocumentador (Bio-Rad Molecular Imagen®- Gel Doctm XR, CA EUA) con el software Quantity One versión 4.6.7.

Siguiendo los protocolos descritos previamente^(27,28), se realizó la amplificación de un fragmento correspondiente a la región de espaciadores internos de la transcripción (ITS; ITS1-5.8S-ITS2 RNAr) con los iniciadores universales ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATG -3'); se amplificó el gen de la calmodulina (CaM) con los iniciadores CMDA7F (5'-GCCAAAATCTTCATCCGTAG-3') y CMDA8R (5'-ATTTTCGTTTCAGAATGCCAGG-3') y se amplificó el gen regulador de la ruta biosintética de aflatoxinas (*aflR*) empleando los iniciadores *aflR*-F (5'-GGGATAGCTGTACGAGTTGTGCCAG-3') y *aflR*-R (5'-TGGKGCCGACTCGAGGAAYGGGT-3') de Eurofins Genomics, Louisville KY, USA. Para la amplificación fue utilizada la enzima Go-Taq polimerasa (Promega, Madison, WI USA) y un termociclador (modelo 9700 Applied Biosystems). Los productos de PCR obtenidos (ITS, calmodulina y *aflR*) se separaron por electroforesis en gel de agarosa (1%) y para observarlos se emplearon como intercalantes los reactivos SYBR® Gold y Orange DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, MA USA); las bandas resultantes se observaron en un fotodocumentador de imágenes (BIO-RAD Molecular Imagen®- GEL DOCTM XR CA, EUA) con el software Quantity One (versión 4.6.7.). Se incluyeron escaleras marcadoras de peso molecular (Axygen Biosciences, CA, EUA). Los productos de PCR se purificaron con el reactivo ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup (Afflymetrix, Thermo Fisher Scientific Inc. Santa Clara, California, EUA). Los productos de PCR purificados se secuenciaron en cadenas *forward* y *reverse* con el método dideoxi⁽²⁹⁾. Las muestras se inyectaron en un secuenciador

(ABI 3730XL Genetic Analyzers) y las secuencias resultantes se registraron en un electroferograma. Los electroferogramas fueron visualizados con el software Chromas Lite y se compararon con los registros del NCBI usando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Análisis estadístico

Los datos de cantidad de ración total mezclada, producción lechera, concentración de AF en pienso y leche, así como de las mediciones de las estructuras de cada aislado se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANDEVA) considerando separadamente como factores la época del año y el nivel de producción de leche (alta, media o baja) en el cual se tuvieron lotificadas las vacas. Para determinar las diferencias entre las medias y los intervalos de confianza al 95% se realizó el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de la prueba de Tukey; $P < 0.05$ fue considerado como significativo para todos los análisis estadísticos.

Resultados

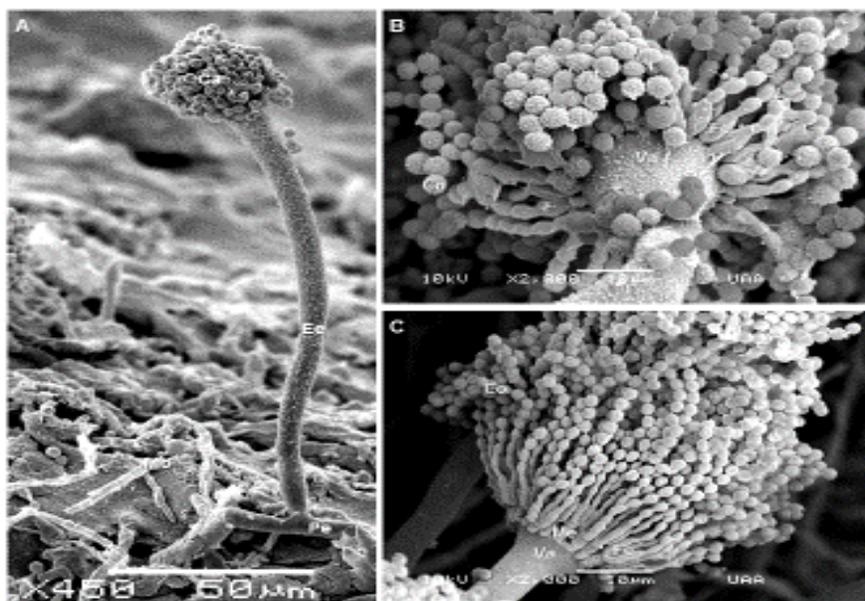
Frecuencia de *Aspergillus* spp

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

Cuadro 1: Géneros fúngicos identificados en muestras mensuales * de una unidad productora lechera en el altiplano central mexicano

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

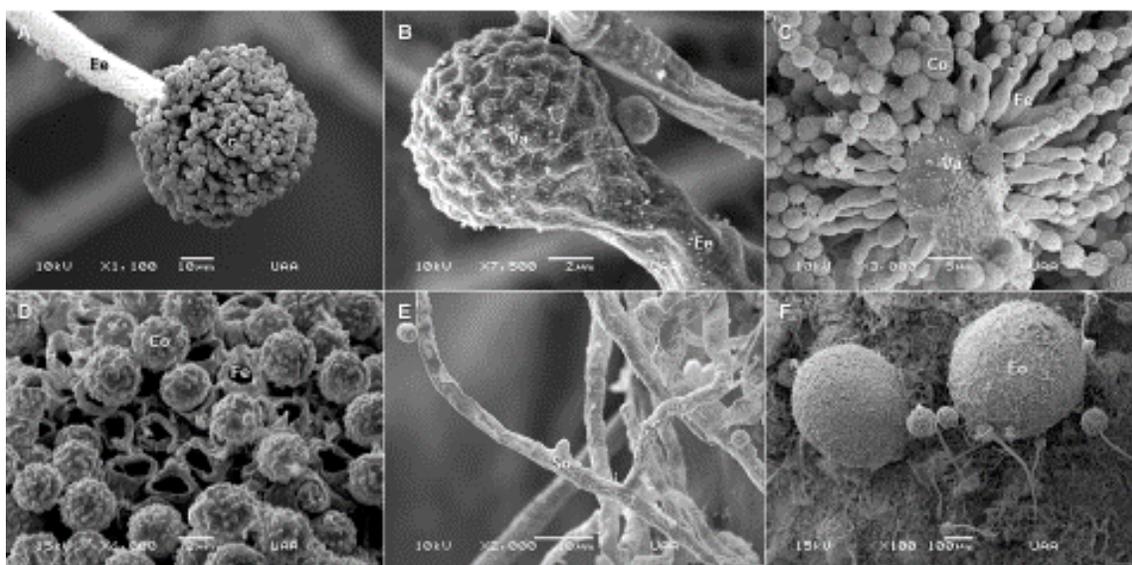
* Muestras de ingredientes alimenticios: 24 meses, por cuadruplicado. Muestras de suelo: 5 parcelas, por cuadruplicado, 2 temporadas.

Figura 1: Estructuras morfológicas del género *Aspergillus*

Páneos: **A)** Conidióforo: Cc = Cabeza conidial, Ee = Estípote, Pe = Célula pie, Mo = Micelio. **B)** Cabeza conidial uniseriada: Co = Conidio o espora; Fe = Fiálide, Va = Vesícula. **C)** Cabeza conidial biseriada: Co = Conidio, Fe = Fiálide, Va = Vesícula, Me = Métula.

Solamente seis aislamientos mostraron una morfología coincidente con *A. flavus* y provinieron del alimento concentrado (AC1, AC2 y AC3) y del ensilaje de maíz (EM1, EM2, EM3); al ser cultivados en PDA, mostraron una coloración verde olivo con la periferia blanquecina. La mayoría de los aislados (5/6) mostraron presencia de esclerocios de color marrón oscuro, mientras que sólo uno no presentó estas estructuras. Microscópicamente, los conidióforos de *A. flavus* presentaron cabezas conidiales irradiadas y uniseriadas, el estípite con paredes rugosas, la vesícula esférica, los conidios tenían forma globosa con irregularidades en la superficie y el micelio septado y blanquecino (Figura 2).

Figura 2: Estructuras morfológicas de *Aspergillus flavus*



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

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

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

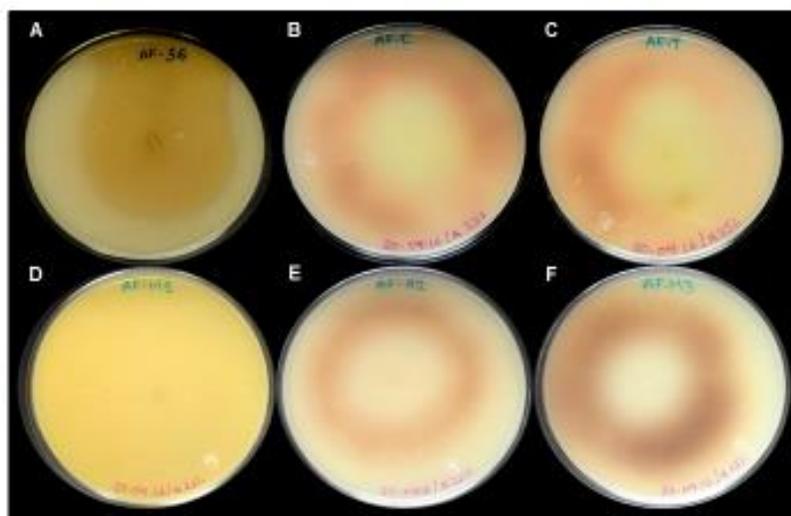
Aislado	Estípite			Vesícula			Espora			Esclerocio			Fiálide		
	Media	LI	LS	Media	LI	LS	Media	LI	LS	Media	LI	LS	Media	LI	LS
AF-C	237	^c 183	291	33.6	^c 27.5	39.7	3.3	^b 3.1	3.4	418	^{cd} 353	483	5.9	^{ab} 4.9	6.9
AF-T	646	^a 564	727	76.6	^a 67.7	85.5	2.8	^c 2.7	2.9	453	^{bc} 361	545	6.4	^{ab} 4.9	7.8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

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

abcd Medias de columnas con diferente literal muestran diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

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

Figura 3: Intensidad de color en medio agar coco al contacto con vapores de amonio de aislamientos *Aspergillus flavus* a los 4 días de crecimiento



Pánelos: **A)** AF-36, no aflatoxigénico (AF⁻). **B)** AF-Cuautitlán y **C)** AF-Tamaulipas, aflatoxigénico (AF⁺).

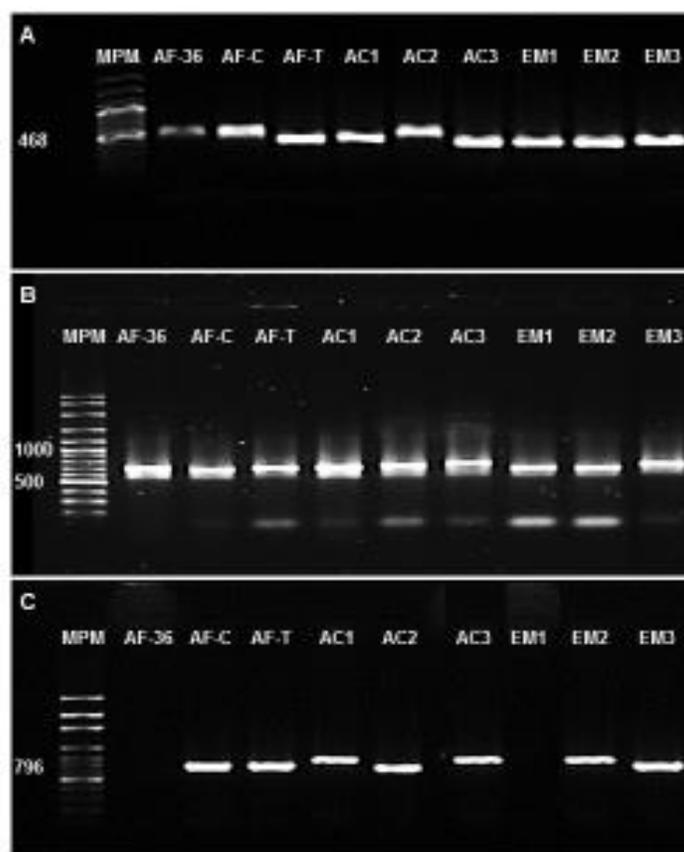
D) AF-EM1, AF⁻ aislado de ensilaje de maíz. **E)** AF-AC2, AF⁺ aislado de alimento concentrado.

F) AF-EM3, AF⁺ aislado de ensilaje de maíz.

Análisis molecular

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

Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados del gen calmodulina (Panel A), región de espaciadores internos de la transcripción 5.8S rDNA-ITS2 (Panel B) y gen regulador de la ruta biosintética de aflatoxinas, *aflR* (Panel C)



Carriles: MPM) Marcador de peso molecular (100pb). Controles: *A. flavus* no aflatoxigénico (AF-36) y aflatoxigénicos (Cuautitlán, AF-C; Tamaulipas, AF-T). *A. flavus* aislados de ensilaje de maíz (EM1, EM2 y EM3) y de alimento concentrado (AC1, AC2 y AC3) destinado a las vacas lecheras

Los cinco aislados locales identificados como *A. flavus* aflatoxigénico amplificaron el fragmento de 796 pb para el gen *aflR*. El análisis de las secuencias de las cepas testigo (AF-36, AF-C y AF-T) y de los seis aislados de *A. flavus* (AF-AC1, AF-AC2, AF-AC3, AF-EM1, AF-EM2 y AF-EM3) mostraron tener un porcentaje de identidad mayor al 90% con aislamientos de *A. flavus* registrados en la base de datos del NCBI (Cuadro 3).

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

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

		ITS4	LN482513.1	100
EM2 (AHY203)	Ensilaje de maíz	AFLRF	MH752566.1	100
		AFLRR	KY769955.1	100
EM3 (AHY204)	Ensilaje de maíz	CMDA7F	XM_002374071.1	100
		CMDA8R	XM_002374071.1	100
		ITS1	KX572367.1	99
		ITS4	KT356196.1	99
		AFLRF	L32577.1	100
		AFLRR	MH752564.1	100

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

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

Aflatoxinas detectadas en pienso y en leche

De las 288 muestras obtenidas de alimento, 286 (99.3 %) presentaron niveles detectables de AF ($18.5 \pm 3.7 \mu\text{g/kg}$); de las cuales el 10.4 % sobrepasaron los límites máximos permisibles por la legislación mexicana ($20 \mu\text{g/kg}$). En las 183 muestras de leche cruda, la presencia de AFM₁ ($0.021 \mu\text{g/kg}$) se detectó en el 39.9 % y el 12.0 % rebasó el límite máximo permisible utilizado como norma por la agroindustria que adquiriría la leche cruda ($0.050 \mu\text{g/kg}$). La mayor incidencia de AF en pienso se presentó en verano y otoño ($P < 0.01$) en comparación con primavera e invierno ($17.4^a \pm 3.2$ y $14.8^{ab} \pm 1.6$ vs $8.1^{bc} \pm 0.5$ y $5.9^c \pm 0.5$, $\mu\text{g/kg}$, respectivamente). A su vez, la concentración de AFM₁ se correlacionó de manera directa con la concentración de AF en la RTM en un modelo doble cuadrado ($P < 0.01$; $R^2 = 30.5$ %). También la presencia de AFM₁ en leche se correlacionó significativamente con el nivel de producción de leche y con el consumo de RTM; en promedio, las vacas consumieron diariamente $621 \mu\text{g}$ de aflatoxinas en 42 kg de RTM, produjeron diariamente 26.2 L de leche con una carga total de $0.603 \mu\text{g}$ de AFM₁, lo que representó una gran capacidad de las vacas lecheras para metabolizar las AF y solamente eliminaron una fracción mínima (0.09 %; Cuadro 4); en general, los lotes productivos de vacas con alta producción se expusieron a la ingestión de mayores cantidades de AF ($658 \mu\text{g/vaca/día}$) y la presencia y eliminación de AFM₁ en la leche de las vacas altas productoras fue mayor al lote de vacas de mediana y de baja producción ($0.22 \mu\text{g/vaca/día}$).

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

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

^{ab} Literales diferentes indican diferencia significativa entre lotes productivos $P < 0.05$.

Discusión

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

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

Aspergillus fue el género micótico con mayor ocurrencia en la UPL (31 %) seguido de *Penicillium* (13.8 %) y *Fusarium* (12.7 %). Estos géneros ya han sido identificados en México en maíz amarillo almacenado⁽⁹⁾ y en híbridos de maíz destinados al consumo humano y animal⁽³⁰⁾. Se ha sugerido que la presencia frecuente de hongos micotoxigénicos y sus toxinas en maíz es debida al manejo inadecuado del cultivo y a la falta de aplicación efectiva de estrategias de control de la infección^(5,31).

En este estudio, *A. flavus* se aisló de pienso para vacas lecheras en una proporción del 6.8 % del total de los *Aspergillus* identificados (6/88). En suelo agrícola destinado a la producción alterna de maíz forrajero con avena no se identificó esta especie. En México, *A. flavus* ha sido identificado en suelo para cultivos de maíz de grano⁽¹⁰⁾ en granos de maíz comercial⁽³²⁾.

Lo anterior sugiere que las poblaciones fúngicas de esta especie se encuentran distribuidas en las zonas agrícolas de México.

En este estudio, el análisis morfométrico mostró que la tercera parte de los aislados de *A. flavus* contenía abundantes esclerocios cortos (< 400 µm) por lo que se clasificaron como cepas S, mientras que el resto fueron denominadas como cepas L con escasos esclerocios, pero de tamaño mayor (>400 µm). Ya se señalado la importancia de esta morfología y su asociación con la aflatoxigenicidad de las cepas S, mientras que las cepas L contienen tanto aislados atoxigénicos como toxigénicos^(33,34).

Análisis molecular

Todas las 25 secuencias obtenidas de los aislados identificados morfológicamente como *A. flavus* mostraron un gran porcentaje de identidad (> 90%) con secuencias registradas de cepas *A. flavus*. También se obtuvieron fragmentos amplificados para el gen *CaM* de 468 pb, para el gen *aflR* de 796 pb y para los ITS con un rango de 600-800 pb (ITS1-5.8S-ITS2). Se ha señalado que la región rADN de los espaciadores internos de la transcripción es el código de barras oficial de ADN para hongos porque es el marcador secuenciado con mayor frecuencia y es una herramienta de gran utilidad para la descripción de especies de *A. flavus*⁽⁸⁾. También se ha referido que el gen *CaM* es capaz de distinguir entre casi todas las especies de *Aspergillus*⁽⁸⁾. Por otra parte, el gen *aflR* es necesario para la transcripción de la mayoría de los genes involucrados en la activación de las reacciones enzimáticas necesarias para la formación de las aflatoxinas⁽³⁵⁻³⁷⁾. Con base a lo anterior este trabajo integra la identificación molecular a la identificación morfológica de seis aislamientos de *A. flavus* obtenidos de la cadena productiva lechera en la región del Altiplano Central Mexicano.

Capacidad aflatoxigénica

Los seis aislados identificados como *A. flavus* se evaluaron con TLC y vapores de amonio en agar coco para identificar su capacidad de producir aflatoxinas, cinco se clasificaron como aflatoxigénicos y uno se clasificó como negativo a la producción de aflatoxinas. Estos resultados mostraron un comportamiento comparable a los obtenidos en otros estudios realizados en México⁽¹⁰⁾ en que identificaron aislamientos de *A. flavus* relacionados genéticamente con *A. flavus* AF-36⁽³²⁾. Esta cepa no aflatoxigénica ha sido empleada en el desarrollo de estrategias de control biológico para reducir la producción de aflatoxinas de cepas aflatoxigénicas en campos productores de algodón⁽¹⁵⁾. Lo anterior sugiere que las poblaciones mayoritarias de *A. flavus* aflatoxigénicas se distribuyen en ecosistemas agrícolas alrededor del mundo y que coexisten con cepas sin capacidad de producir aflatoxinas.

Aflatoxinas detectadas en pienso y en leche

El 99.3 % (286/288) de las muestras de alimento de las vacas lecheras presentaron niveles detectables de AF ($18.5 \pm 3.7 \mu\text{g/kg}$) de las cuales el 10.4 % sobrepasaron los límites máximos permisibles por la legislación mexicana ($20 \mu\text{g/kg}$); además el 39.9 % (73/183) de las muestras de leche cruda mostraron la presencia de AFM₁. Proporciones comparables de contaminación con AF han sido detectadas en piensos balanceados producidos en México⁽⁵⁾, en la ración total mezclada de establos de México⁽³⁸⁾; así como en muestras de alimento de origen asiático⁽³⁹⁾. En México se han reportado la incidencia de AFM₁ en leche cruda de vaca^(6,7); también en diversos países se ha identificado incidencia de AFM₁ en la leche destinada al consumo humano^(3,40-42). Lo anterior sugiere que la contaminación por aflatoxinas de alimento destinado al consumo humano y animal es una problemática mundial de salud pública.

En este estudio se mostró una asociación entre el nivel de producción de leche de las vacas con la cantidad y de la concentración de AFM₁ eliminada en la leche, de tal forma que las vacas altas productoras consumieron una mayor cantidad de alimento y se expusieron a cantidades más grandes de aflatoxinas en su pienso; por consiguiente, fue mayor la cantidad total, así como la concentración de AFM₁ en la leche cruda ($P < 0.05$). Se ha señalado que la tasa de eliminación de AFM₁ en leche se ve influenciada por la cantidad de pienso ingerido al día por cada animal, la cantidad de leche que produce al día y la etapa de lactación en la que se encuentra⁽⁴³⁾.

Conclusiones e implicaciones

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

Agradecimientos

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

Conflictos de interés

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

Literatura citada:

1. Domínguez-Domínguez O, Pérez-Ponce de León G. ¿La mesa central de México es una provincia biogeográfica? Análisis descriptivo basado en componentes bióticos dulceacuícolas. *Rev Mex Biodivers* 2009;80(3):835–52.
2. Romo CE, Valdivia AG, Carranza RG, Camara J, Zavala MP, Flores E, *et al.* Brechas de rentabilidad económica en pequeñas unidades de producción de leche en el altiplano central mexicano. *Rev Mex Cienc Pecu* 2014;5(3):273–89.
3. Rahimi E, Bonyadian M, Rafei M, Kazemeini HR. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. *Food Chem Toxicol* 2010;48(1):129–31.
4. IARC. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 82. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans II. Lyon, Press. 2002.
5. Flores CM, Hernández LB, Vázquez J. Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Rev Mex Cienc Pecu* 2006;44(2):247–256.
6. Pérez J, Gutiérrez R, Vega S, Díaz G, Urbán G, Coronado M, *et al.* Ocurrencia de aflatoxina M1 en leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica producidas y comercializadas en el Altiplano Mexicano. *Rev Salud Anim* 2008;30(2):103–109.
7. Landeros P, Noa M, López Y, González DG, Noa E, Real M, *et al.* Niveles de aflatoxina M1 en leche cruda y pasteurizada comercializada en la zona metropolitana de Guadalajara, México. *Rev Salud Anim* 2012;34(1):40–45.
8. Samson RA, Visagie CM, Houbraeken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* 2014;78:141–173.
9. Hernández-Delgado S, Reyes-López MÁ, García-Olivares JG, Mayek-Pérez N, Reyes-Méndez CA. Incidencia de hongos potencialmente toxígenos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Rev Mex Fitopatol* 2007;25(2):127–133.

10. Ortega-Beltran A, Jaime R, Cotty PJ. Aflatoxin-producing fungi in maize field soils from sea level to over 2000 masl: A three-year study in Sonora, Mexico. *Fungal Biol-Uk* 2015;119(4):191–200.
11. Frisvad JC, Larsen TO. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. *Appl Microbiol Biot* 2015;99(19):7859–7877.
12. Varga J, Szigeti G, Baranyi N, Kocsubé S, O’Gorman CM, Dyer PS. *Aspergillus*: sex and recombination. *Mycopathologia* 2014;178(5-6):349–362.
13. Klich MA. Identification of common *Aspergillus* species. First edition. Louisiana, USA: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands; 2002.
14. Bayman P, Cotty PJ. Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: association with aflatoxin production and morphology. *Can J Bot* 1993;71(1):23–31.
15. Ehrlich KC, Cotty PJ. An isolate of *Aspergillus flavus* used to reduce aflatoxin contamination in cottonseed has a defective polyketide synthase gene. *Appl Microbiol Biot* 2004;65(4):473–8.
16. Cotty PJ, Jaime-Garcia R. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *Int J Food Microbiol* 2007;119(1-2):109–15.
17. Cheli F, Campagnoli A, Dell’Orto V. Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. *Anim Feed Sci Tech* 2013;183(3):1–16.
18. Ehrlich KC, Montalbano BG, Cotty PJ. Sequence comparison of aflR from different *Aspergillus* species provides evidence for variability in regulation of aflatoxin production. *Fungal Genet Biol* 2003;38(1):63–74.
19. Reis TA, Baquião AC, Atayde DD, Grabarz F, Corrêa B. Characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from organic Brazil nuts using a polyphasic approach. *Food Microbiol* 2014;42:34–39.
20. Yu J. Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins* 2012;4(11):1024–1057.
21. Scott PM. Natural toxins. *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemistry*. 1995;49:1–30.
22. Iheanocho HE, Njobeh PB, Dutton FM, Steenkamp PA, Steenkamp L, Mthombeni JQ, *et al*. Morphological and molecular identification of filamentous *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolated from compound feeds in South Africa. *Food Microbiol* 2014;44:180–184.

23. de Luna-López MC, Valdivia-Flores AG, Jaramillo-Juárez F, Reyes JL, Ortiz-Martínez R, Quezada-Tristán T. Association between *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxins production in immature grains of maize genotypes J Food Sci Eng 2013;3(12):688–698.
24. Fani SR, Moradi M, Probst C, Zamanizadeh HR, Mirabolfathy M, Haidukowski M, *et al.* A critical evaluation of cultural methods for the identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates for aflatoxin mitigation in pistachio orchards of Iran. Eur J Plant Pathol 2014;140(4):631–642.
25. Saito M, Machida S. A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. Mycoscience 1999;40(2):205–208.
26. Hoffman CS, Winston F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. Gene 1987;57(2-3):267–272.
27. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal Ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, *et al.*, editors. PCR protocols: a guide to methods and application New York, USA. Academic Press; 1990:315–322.
28. Shapira R, Paster N, Eyal O, Menasherov M, Mett A, Salomón R. Detection of aflatoxinogenic molds in grains by PCR. Appl Environ Microbiol 1996;62:3270-3273.
29. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 1977;74(12):5463–5467.
30. Montes GN, Reyes MCA, Montes RN, Cantu AMA. Incidence of potentially toxigenic fungi in maize (*Zea mays* L.) grain used as food and animal feed. CyTA-J Food 2009;7(2):119–25.
31. Martínez HY, Hernández S, Reyes CA, Vázquez G. El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. Rev Mex Fitopatol 2013;31(2):126–146.
32. Ortega-Beltran A, Grubisha LC, Callicott KA, Cotty PJ. The vegetative compatibility group to which the US biocontrol agent *Aspergillus flavus* AF36 belongs is also endemic to Mexico. J Appl Microbiol 2016;120(4):986–98.
33. Cotty PJ. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. Phytopathology 1989;79(7):808–814.
34. Probst C, Bandyopadhyay R, Cotty PJ. Diversity of aflatoxin-producing fungi and their impact on food safety in sub-Saharan Africa. Int J Food Microbiol 2014;174:113–122.

35. Yu J, Chang PK, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, *et al.* Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(3):1253–1262.
36. Bhatnagar D, Cary JW, Ehrlich K, Yu J, Cleveland TE. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia* 2006;162(3):155–166.
37. Amare MG, Keller NP. Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. *Fungal Genet Biol* 2014;66(3):11–18.
38. Reyes W, Martínez SP, Isaías VH, Nathal MA, De Lucas E, Rojo F. Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM1 en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. *Tec Pecu Mex* 2009;47(2):223–230.
39. Ruadrew S, Craft J, Aidoo K. Occurrence of toxigenic *Aspergillus spp.* and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin sourced in the West of Scotland. *Food Chem Toxicol* 2013;55:653–658.
40. Cano-Sancho G, Marin S, Ramos AJ, Peris-Vicente J, Sanchis V. Occurrence of aflatoxin M1 and exposure assessment in Catalonia (Spain). *Rev Iberoam Micol* 2010;27:130–135.
41. Shundo L, Navas SA, Lamardo LCA, Ruvieri V, Sabino M. Estimate of aflatoxin M1 exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control* 2009;20(7):655–657.
42. Iha MH, Barbosa CB, Okada IA, Trucksess MW. Occurrence of aflatoxin M1 in dairy products in Brazil. *Food Control* 2011;22(12):1971–1974.
43. Masoero F, Gallo A, Diaz D, Piva G, Moschini M. Effects of the procedure of inclusion of a sequestering agent in the total mixed ration on proportional aflatoxin M1 excretion into milk of lactating dairy cows. *Anim Feed Sci Tech* 2009;150(1-2):34–45.