

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Área Académica de Química

Licenciatura de Química en Alimentos

Incidencia de mohos toxigénicos y aflatoxinas en alimento para ganado y leche proveniente de cuencas lecheras del Valle del Mezquital, Hidalgo

TESIS

Que para obtener el título de
Licenciado de Química en Alimentos

PRESENTAN

Sandra Ramírez Montes
Edgar Adonai Meneses Escorcia

Directores

Dra. Elizabeth Contreras López
Dr. Luis Guillermo González Olivares

Codirectora

M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruíz

Mineral de la Reforma, Hidalgo, 2018



Mineral de la Reforma, Hgo., a 6 de septiembre de 2018

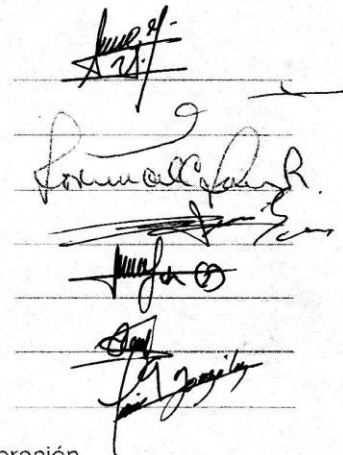
Número de control: ICBI-D/736/2018
 Asunto: Autorización de impresión.

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
 DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

Por este medio le comunico que el Jurado asignado a los Pasantes de Licenciatura en Química en Alimentos **Edgar Adonai Meneses Escorcía** y **Sandra Ramírez Montes**, quienes presentan el trabajo de titulación **“Incidencia de mohos toxigénicos y aflatoxinas en alimento para ganado y leche proveniente de cuencas lecheras del Valle del Mezquital, Hidalgo”** después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación firman de conformidad los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE: Dr. Javier Añorve Morga
 PRIMER VOCAL: Dra. Elizabeth Contreras López
 SEGUNDO VOCAL: M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz
 TERCER VOCAL: Dr. Ernesto Alanís García
 SECRETARIO: Dra. Judith Jaimez Ordaz
 PRIMER SUPLENTE: Dra. Araceli Castañeda Ovando
 SEGUNDO SUPLENTE: Dr. Luis Guillermo González Olivares



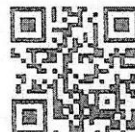
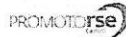
Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
 “Amor, Orden y Progreso”

Dr. Óscar Rodolfo Suárez
 Director del ICBI



ORSCI/SEPC



Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5
 Colonia Carboneras
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P.
 Tel. +52 771 7172000 exts 2231, Fax 2109
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx



El presente trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de Físicoquímica 2 y Biotecnología 2 en el edificio de Química de Alimentos del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.



Este trabajo fue desarrollado gracias al financiamiento del Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP) en su modalidad de Redes de Colaboración (Convocatoria 2015) y como parte del proyecto “Aflatoxinas en leche: prevalencia, interacción con los componentes de la leche y estabilidad ante agentes físicos y biológicos”.

Parte de este trabajo fue presentado en los siguientes eventos:

6° Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía
Celebrado del 27 al 29 de septiembre de 2017 en Zapopan, Jalisco; bajo el título:
“Identificación de hongos con actividad micotoxigénica en alimento para ganado
proveniente del Valle de Tulancingo, Hidalgo.”

Coloquio Aflatoxinas en la Cadena de Producción de Leche y Derivados.
Celebrado el 31 de enero de 2018 en el Centro de Negocios del CEUNI-UAEH,
Mineral de la Reforma, Hidalgo; bajo el título:
“Evaluación de la incidencia de aflatoxinas en alimento para ganado y leche
provenientes de cuencas lecheras del Valle del Mezquital, Hidalgo”

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elizabeth Contreras López por aceptar ser nuestra directora y apoyo en todo momento.

Al Dr. Luis Guillermo González Olivares por el tiempo que le dedicó a la revisión de la presente tesis.

A los miembros del Cuerpo Académico de Propiedades y Funcionalidad de Alimentos.

A los investigadores invitados, la M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruíz y el Dr. Ernesto Alanís García.

A los compañeros del laboratorio de Fisicoquímica 2 por su apoyo y colaboración.

DEDICATORIA

A Dios que siempre está conmigo en todo momento.

A mis padres por todo el apoyo que me han brindado siempre.

A mi abuelita que ha estado en todo momento alentándome a seguir adelante.

A mis tíos y primos por darme un consejo en el momento justo.

A Lili por sus consejos y ayuda.

Sandy

DEDICATORIA

A mis padres, que más allá de darme la vida, me ayudaron a formar una, me apoyaron y alentaron en todo momento, pero, sobre todo, nunca perdieron la fe en mí.

A mis hermanos, por su apoyo incondicional.

A la Doctora Araceli Castañeda Ovando, por ser la Doctora que más ayudó en mi formación académica, haciéndome el profesionalista que ahora soy.

Al Doctor Luis Guillermo González Olivares, por el consejo, orientación y apoyo cuando más lo necesité.

A mi mejor amigo, Rubén, por ser la persona que estuvo a mi lado en todo momento, me apoyó, aconsejó y escuchó siempre, por alentarme a superarme, a ser mejor y por siempre creer en mí.

A mis amigos, Ricardo, Aldo, Judith, Emanuel, Kelsey, Mare, Michelle y Anto, por estar siempre ahí para aconsejarme cuando lo necesitaba.

A todas las personas que me apoyaron y llevaron a ser la persona que soy hoy en día.

Edgar

Contenido

Índice de figuras	10
Índice de tablas.....	10
1. RESUMEN.....	11
2. MARCO TEÓRICO	12
2.1. Micotoxinas.....	12
2.1.1. Micotoxinas en un contexto histórico	13
2.1.2. Micotoxinas en alimentos y la salud humana	13
2.2. Aflatoxinas	16
2.2.1. Biosíntesis de aflatoxinas	19
2.2.2. Factores para el desarrollo de aflatoxinas	20
2.2.3. Efectos de las aflatoxinas sobre la salud humana	24
2.3. Métodos de determinación de aflatoxinas	24
2.3.1. Cromatografía en capa fina (TLC)	24
2.3.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	25
2.3.3. Cromatografía de gases (GC).....	25
2.3.4. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	25
2.4. Aflatoxinas presentes en la producción de leche y sus derivados	26
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo general	28
3.2. Objetivos específicos.....	28
3. METODOLOGÍA.....	29
3.1. Muestras.....	29
3.2. Análisis microbiológico	31
3.2.1. Recuento de mohos y levaduras.....	31
3.2.2. Identificación de colonias fúngicas.....	32
3.2.3. Aislamiento de colonias fúngicas con potencial micotoxigénico	33
3.3. Extracción y determinación de aflatoxinas totales.....	33
3.3.1. Preparación de las muestras	33
3.3.2. Procedimiento del ensayo.....	34
3.4. Análisis proximal.....	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1. Recuento de mohos y levaduras.....	36
4.2. Determinación de aflatoxinas.....	40
4.3. Determinación la composición proximal.....	45
5. CONCLUSIÓN.....	49
6. REFERENCIAS	50

Índice de figuras

Figura 1. Fases del crecimiento fúngico y localización de la síntesis de las micotoxinas.	12
Figura 2. Estructura química de las principales aflatoxinas.	17
Figura 3. Estructura química de la AFM ₁ y AFM ₂	19
Figura 4. Factores que afectan la incidencia de micotoxinas en las cadenas alimenticias de humanos y animales.	23
Figura 5. Puntos de muestreo del Valle del Mezquital.	29
Figura 6. Diagrama de la metodología utilizada para el estudio de la incidencia de mohos y levaduras en muestras de alimento para ganado.	31
Figura 7. Depósito del inóculo de esporas sobre la superficie del medio.	33
Figura 8. Recuento de mohos y levaduras en muestras de alfalfa recolectadas en el Valle del Mezquital, Hidalgo.	36
Figura 9. Recuento de mohos y levaduras en muestras de silo recolectadas en el Valle del Mezquital, Hidalgo.	38
Figura 10. Concentración de AFs totales en muestras de alfalfa provenientes del Valle del Mezquital, Hidalgo.	41
Figura 11. Concentración de AFs totales en muestras de ensilaje provenientes del Valle del Mezquital, Hidalgo.	42
Figura 12. Concentración de AFs totales en muestras de leche provenientes del Valle del Mezquital, Hidalgo.	44

Índice de tablas

Tabla 1. Micotoxinas en los alimentos y sus efectos sobre la salud en humanos y en animales.	14
Tabla 2. Propiedades de las aflatoxinas.	18
Tabla 3. Mínima a _w para el desarrollo de mohos y sus micotoxinas.	21
Tabla 4. Rangos de temperatura para el desarrollo de mohos y producción de micotoxinas.	21
Tabla 5. Codificación de muestras de alfalfa, silo y leche.	30
Tabla 6. Incidencia de mohos toxigénicos en muestras de alfalfa.	37
Tabla 7. Incidencia de mohos toxigénicos en muestras de silo.	40
Tabla 8. Análisis proximal de los forrajes evaluados, presentado en base seca.	46
Tabla 9. Análisis proximal de los forrajes evaluados reportados por diversos autores en base seca.	46

1. RESUMEN

Las aflatoxinas (AFs) son metabolitos secundarios producidos principalmente por los mohos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius* que pueden crecer en diferentes productos agrícolas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la incidencia de mohos toxigénicos y aflatoxinas en muestras de alimento para ganado y leche provenientes de cuencas lecheras del Valle del Mezquital, Hidalgo. Para ello se realizó un análisis microbiológico a muestras de alfalfa y ensilados. La determinación de aflatoxinas totales se llevó a cabo mediante la técnica de ELISA y para determinar una posible relación entre el crecimiento fúngico con la composición de las muestras, se realizó un análisis proximal. El recuento de mohos y levaduras fue elevado, teniendo rangos de $1.0 \cdot 10^2$ a $2.9 \cdot 10^6$ UFC/g de mohos y $4.0 \cdot 10^3$ a $2.1 \cdot 10^7$ UFC/g de levaduras en muestras de alfalfa, mientras que en las muestras de silo se hallaron rangos de $1.0 \cdot 10^2$ a $2.0 \cdot 10^5$ UFC/g de mohos y $1.5 \cdot 10^5$ a $2.3 \cdot 10^8$ UFC/g de levaduras. Por otro lado, se encontró incidencia de aflatoxinas en la totalidad de las muestras de alfalfa, silo y leche analizadas. Finalmente, se determinó que la composición del forraje no es un factor que parezca influir de manera importante en el desarrollo de mohos ni de aflatoxinas, pero sí lo son tanto los factores ambientales como la microbiota nativa, la cual se encuentra en constante competencia por los nutrientes. En conclusión, se determinó que la contaminación de los forrajes se atribuye principalmente a malas prácticas agrícolas, y en particular a un deficiente control en el proceso de ensilaje. Esto trae como consecuencia que el consumo de forrajes contaminados por parte del ganado bovino lleva al metabolismo de aflatoxinas para finalmente ser segregadas en la leche.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Micotoxinas

La palabra micotoxina deriva de los vocablos griegos *mikes* y *toxina*, que significan hongo y veneno, respectivamente (Soriano, 2007). Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos (Pankaj *et al.*, 2018), con bajo peso molecular (300 a 700 Da) (Paterson & Lima, 2010; Turner *et al.*, 2015). Estos compuestos tienen lugar en el desarrollo fúngico cuando la fase exponencial del crecimiento llega a su etapa final y durante la fase estacionaria (Figura 1).

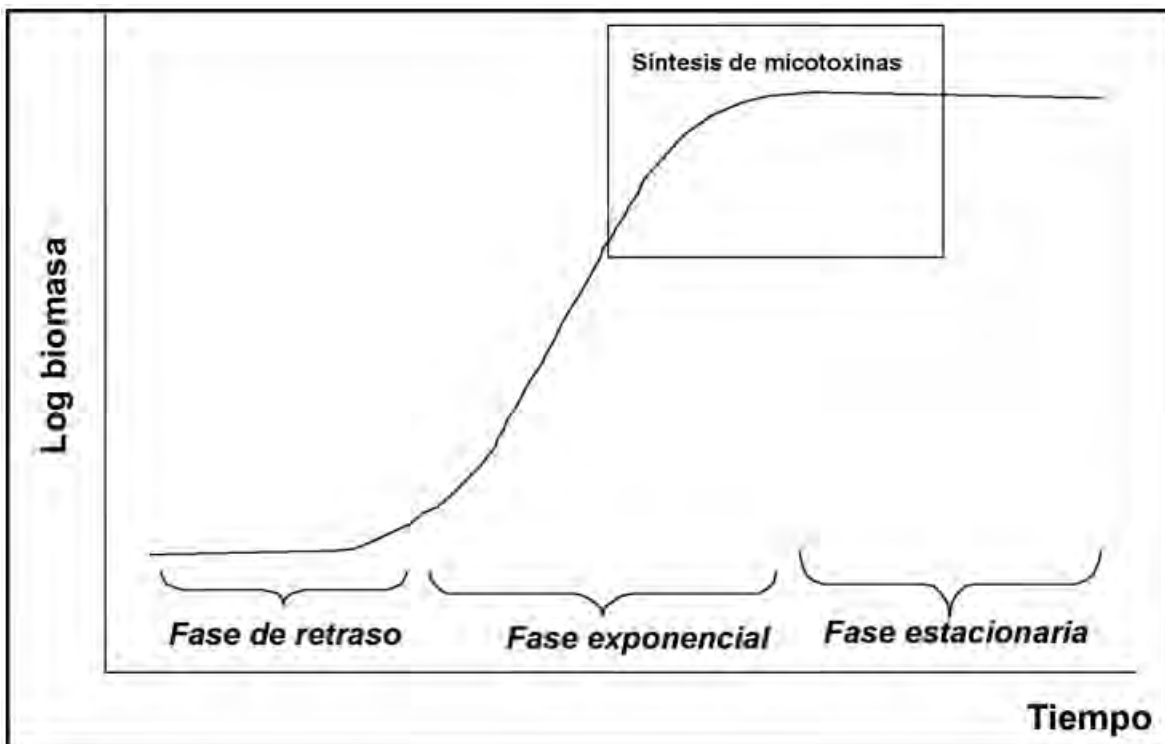


Figura 1. Fases del crecimiento fúngico y localización de la síntesis de las micotoxinas. Fuente: Soriano, 2007.

La mayoría de las micotoxinas conocidas hasta ahora han sido aisladas de los géneros fúngicos del grupo *Deuteromycetes* (*Fungi imperfecti*), entre los que destacan *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Claviceps*, *Neotyphodium*, *Strachybotrys*, *Myrothecium*, *Phoma* y *Diplodia* (Martínez & Anadón, 2012).

2.1.1. Micotoxinas en un contexto histórico

Durante la Edad Media, comenzó a desplegarse la introducción del centeno en Europa, donde la elaboración del pan se realizaba con cualquier tipo de cereal, incluyendo granos contaminados con el cornezuelo del centeno (Soriano, 2007). Como consecuencia del consumo del pan negro, empezaron los brotes de ergotismo (*fuego de San Antonio*), denominado así en aquellos días debido a que en el siglo XI se fundaron los monasterios de San Antonio Abad, para atender a las víctimas de este padecimiento (Laval, 2004).

En 1960 surgió el interés por *Aspergillus flavus* en Europa y Lejano Oriente debido a que se presentaron muertes de aves a causa de las toxinas producidas por este moho. En tanto, el término micotoxina fue creado en 1962, después de la famosa muerte de pavos en Inglaterra, al ingerir comida a base de cacahuete procedente de Brasil y África (Bezerra *et al.*, 2014).

Por otro lado, la citrinina se asoció con el síndrome de "arroz amarillo" en Japón en 1971, debido a la presencia constante de *Penicillium citrinum* en este alimento. Esta micotoxina también ha sido considerada como responsable de la nefropatía en cerdos y otros animales, aunque su toxicidad aguda varía según la especie animal (Bezerra *et al.*, 2014).

2.1.2. Micotoxinas en alimentos y la salud humana

Los mohos micotoxigénicos pueden contaminar productos agrícolas en condiciones ambientales favorables, causando grandes pérdidas económicas por el deterioro de los alimentos en pre-cosecha, post-cosecha y almacenaje (Patriarca & Fernández, 2017). Esta contaminación se da principalmente por la interacción de los mohos, los alimentos susceptibles al daño y el ambiente (Pitt *et al.*, 2008).

En este sentido, las especies de *Fusarium* son patógenas para los cultivos de cereales y otros productos, y pueden producir micotoxinas antes o inmediatamente después de la cosecha. Algunas especies de *Aspergillus* y *Penicillium* también son patógenas de plantas o frutos, pero estos géneros están más asociados con los

productos básicos y los alimentos durante el secado y el almacenamiento (Bosco & Mollea, 2012).

En relación a la presencia de micotoxinas en los alimentos (Tabla 1), ésta puede ser individual o simultánea con otras, lo que puede provocar efectos sinérgicos en su acción sobre el organismo aumentando así su toxicidad (Soriano, 2007). Los residuos de algunas micotoxinas pueden encontrarse en alimentos de origen animal (carne, leche, queso y huevo) como consecuencia de la ingesta de alimentos contaminados por parte de los animales (Pankaj *et al.*, 2018).

Tabla 1. Micotoxinas en los alimentos y sus efectos sobre la salud en humanos y en animales.

Micotoxina	Moho productor	Alimento susceptible	Enfermedad/síntoma
Aflatoxina	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	Maíz, cacahuates, nueces, semillas de algodón, arroz, higos, leche, huevo	Lesiones hepáticas, carcinoma hepático, inmunosupresión, impedimento de crecimiento en infantes
Ocratoxina	<i>Aspergillus section nigri</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>	Cereales, café, cacao, frutos secos, vino, queso	Nefropatía endémica, tumores en el tracto urinario, afecciones en aves de corral
Zearalenona	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>F. graminearum</i>	Maíz, cebada, trigo, arroz, frutas y sus productos (jugos)	Efectos estrogénicos, cáncer cervical
Fumonisinina	<i>F. proliferatum</i> , <i>F. verticillioides</i>	Maíz, sorgo, huevo, leche	Carcinoma esofágico, edema pulmonar por encefalomalacia equina
Toxina T-2, HT-2	<i>F. langsethiae</i> , <i>F. poae</i> , <i>F.</i> <i>sporotrichioides</i>	Trigo, maíz	leucopenia (aleukia)
Desoxinivalenol	<i>F. graminearum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. acuminatum</i>	Arroz, maíz, cebada, avena, centeno, cerveza	Inhibición de síntesis de proteína, náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, rechazo al alimento
Nivalenol	<i>F. crookwellense</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. nivale</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i>	Arroz, maíz, cebada, avena, centeno	Eritropenia, leucopenia, hematotoxicidad
Patulina	<i>Penicillium expansum</i>	Manzanas, peras, subproductos de frutas	Daño en los sistemas gastrointestinal y respiratorio
Alternariol metil éter, alternariol	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. arborescens</i>	Tomate y sus derivados, productos de fruta, cereales, vino, cerveza	Mutagénico, cáncer de esófago
Ácido tenuazónico	<i>A. tenuissima</i> , <i>A. arborescens</i>	Tomate y sus derivados, productos de fruta, cereales, vino, cerveza	Trastorno hematológico
Alertoxina	<i>A. alternata</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. arborescens</i>	Trigo, arroz, girasoles, semillas	Efectos mutagénicos

Fuente: Patriarca & Fernández, 2017.

La exposición a las micotoxinas puede ocurrir por ingestión, inhalación y contacto dérmico, causando así una micotoxicosis. Ésta se define como aquella intoxicación resultante de la ingesta de alimentos contaminados (Bosco & Mollea, 2012), es decir donde hay presencia de metabolitos secundarios producidos por diferentes especies de mohos que generan diferentes cuadros clínicos (Lazo & Sierra, 2008). En relación a la concentración y al tiempo de exposición de una determinada micotoxina, así como factores individuales como edad, sexo entre otros se pueden dar diversas intoxicaciones (Martínez & Anadón, 2012):

- 1) *Micotoxicosis aguda*: se produce cuando se consumen micotoxinas a concentraciones desde moderadas hasta altas, causando manifestaciones específicas, síndrome de enfermedad aguda e incluso la muerte.
- 2) *Micotoxicosis crónica*: se produce por la ingesta de niveles de toxinas desde moderados hasta bajos.
- 3) *Micotoxicosis indirecta*: se produce por la ingesta de muy bajas concentraciones de toxina causando un aumento en la susceptibilidad a otras infecciones o enfermedades.

El modo de acción tóxica de las micotoxinas está determinado por la estructura química ocasionando interacciones con membranas celulares, interferencia con el metabolismo energético, interacciones con el ADN y proteínas, impidiendo su transcripción, así como interacción con receptores hormonales (Martínez & Anadón, 2012).

Los síntomas generales de las micotoxicosis en humanos son vómito, diarrea y otros problemas gastrointestinales asociados. Asimismo, se sabe que las micotoxinas suprimen el sistema inmunitario, principalmente los tricotecenos (como la toxina DON y T-2) que pueden reducir la inmunidad al inhibir la síntesis de proteínas y la proliferación celular (Bhat *et al.*, 2010). En general, los efectos biológicos de la mayoría de las micotoxinas comprenden hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, actividad inmunosupresora, teratogenicidad, mutagenicidad, carcinogenicidad, estrogenicidad y acción diabetógena (Martínez & Anadón, 2012).

En los animales, las micotoxinas producen una amplia gama de efectos nocivos tales como reducción de la productividad animal, aumento de la incidencia de enfermedades debidas a la inmunosupresión, daño a órganos vitales y la interferencia con la capacidad reproductiva, y en algunos casos extremos, puede ocurrir la muerte (Streit *et al.*, 2012). Otros efectos están relacionados a irritación en el tracto digestivo, reducción en la absorción de nutrientes y generalmente interfieren con los sistemas endocrino y exocrino. Además, el crecimiento y la proliferación de mohos reducen los nutrientes disponibles, como las vitaminas y los aminoácidos (Bhat *et al.*, 2010). También pueden causar trastornos crónicos en pulmones, micosis, abortos o mastitis (Bhat *et al.*, 2010).

Finalmente, los factores que afectan la magnitud de la toxicidad por las micotoxinas al ser humano y a los animales dependen de las especies fúngicas implicadas, los mecanismos o modos de acción, el metabolismo y los mecanismos de defensa del organismo vivo afectado (Martínez & Anadón, 2012).

2.2. Aflatoxinas

La palabra aflatoxina proviene de la primera letra “A” que denota al género *Aspergillus*, seguida de las tres letras “FLA” correspondientes a la especie *flavus* y el sustantivo “toxina” que significa veneno (Ellis *et al.*, 1991).

Las aflatoxinas (AFs) químicamente son cumarinas sustituidas, conteniendo moléculas de dihidrofurano o tetrahidrofurano (Wang *et al.*, 2016). Las cuatro principales aflatoxinas han sido subdivididas en los grupos B y G, con base en la fluorescencia que presentan bajo luz ultravioleta, azul (*blue*) o verde (*green*). Estas se denominan AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ (Figura 2) (Méndez & Moreno, 2009; Bezerra *et al.*, 2014). Las aflatoxinas del grupo B tienen un anillo ciclopentanona, mientras que las del grupo G tienen un anillo lactona (Carvajal, 2013; Sandoval, 2013).

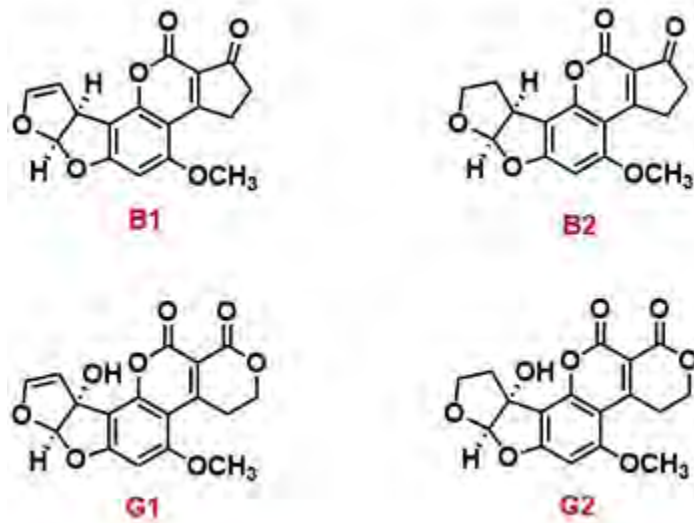


Figura 2. Estructura química de las principales aflatoxinas.

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos principalmente por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius* (Fernández, 2008; Rojas & Wilches, 2009; Bezerra *et al.*, 2014; Zachariasova *et al.*, 2014). Estos microorganismos pueden crecer en climas templados, subtropicales y tropicales (FAO, 2003).

Estas micotoxinas pueden producirse en numerosos alimentos tales como semillas oleaginosas, nueces y cereales. La producción de aflatoxinas se puede presentar tanto antes como después de la cosecha. De igual manera, los piensos y forrajes para ganado vacuno son susceptibles a la contaminación por estos metabolitos (FAO, 2003). En la Tabla 2 se muestran algunas propiedades de las aflatoxinas.

Tabla 2. Propiedades de las aflatoxinas.

Propiedades	Valor o rango
PM	312 – 350 Da
Características	Cristales sólidos que van del blanco al amarillo, sin olor y sin sabor.
Solubilidad	Poco solubles en agua. Solubles en disolventes orgánicos, moderadamente polares (Cloroformo, etanol, metanol, acetona, acetonitrilo y dimetilsulfóxido).
Termorresistencia	En forma cristalina (purificadas).
pH (estabilidad)	3 - 10
Punto de fusión	> 250 °C

Fuente: Carvajal, 2013 y Sandoval, 2013

Generalmente, la AFB₁ es la de mayor incidencia y se presenta en mayor concentración en los productos alimenticios. La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasificó a la AFB₁ como carcinógeno en el Grupo 1 dado, la evidencia de su poder cancerígeno en humanos (Méndez & Moreno, 2009; Çagındı & Gürhayta, 2016).

Hasta el momento han sido identificadas 20 aflatoxinas diferentes, sin embargo, únicamente las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ se originan de manera natural en sustratos contaminados por *Aspergillus*. Las demás aflatoxinas (M₁, M₂, P₁, Q₁, aflatoxicol, etc.) se presentan como productos metabólicos de sistemas microbianos o animales (Rojas & Wilches, 2009).

Existen varios derivados hidroxilados de la AFB₁ y AFB₂, entre los que destacan la AFM₁ y AFM₂, respectivamente (Figura 3). Estas se excretan en la leche de animales que consumieron alimentos contaminados con aflatoxinas. Estas aflatoxinas son igualmente activas y eso constituye un riesgo para la salud humana (Rojas & Wilches, 2009).

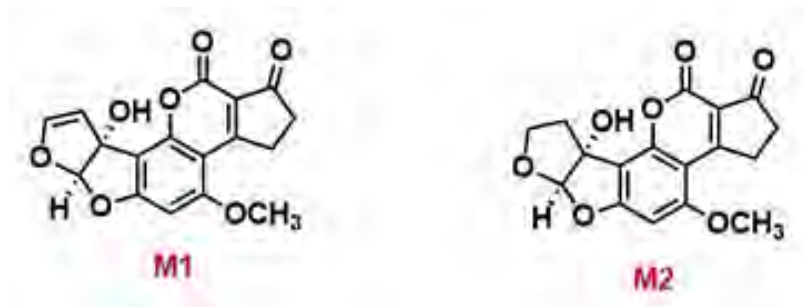


Figura 3. Estructura química de la AFM₁ y AFM₂.

En el año de 1977 la FDA estableció un límite permisible de 20 µg/kg para las aflatoxinas totales en los alimentos destinados al consumo humano. Sin embargo, en algunos países europeos se han establecido límites de tolerancia más estrictos, específicamente para la AFB₁, reglamentando 5 µg/kg para los alimentos destinados tanto al consumo humano como animal (Méndez & Moreno, 2009).

2.2.1. Biosíntesis de aflatoxinas

La biosíntesis de aflatoxinas consta de varios pasos y es probablemente afectada por factores ambientales (estrés, presencia de proteínas, etc.) así como factores genéticos (Gacem & El Hadj-Khelil, 2016). Un ejemplo de factores ambientales de afectación es la presencia de aminoácidos como el triptófano, el cual inhibe la síntesis de aflatoxinas, mientras que la tirosina la aumenta. Los compuestos nitrogenados y de carbono son las principales limitantes en la producción de estos compuestos, tal es así que la presencia de lípidos induce la aflatoxinogénesis (Gacem & El Hadj-Khelil, 2016).

Esta síntesis se relaciona con la condensación de un Acetil CoA que reacciona con tres o más grupos malonatos, produciendo malonil CoA, formando un compuesto policetónico. Posteriormente, hay ciclización y aromatización para formar antrona y su compuesto oxidado (ácido norsolínico), el cual, por medio de reacciones diversas, provoca la formación de las aflatoxinas (Gimeno & Martins, 2011).

2.2.2. Factores para el desarrollo de aflatoxinas

Las condiciones para la producción de aflatoxinas, tienen que ver directamente con las condiciones ambientales para el desarrollo de los mohos productores (Mohapatra *et al.*, 2017; Wawrzyniak *et al.*, 2018). Un ejemplo de ello es que *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* no pueden crecer o producir aflatoxinas en sustratos con actividad de agua menor a 0.7, humedad relativa menor a 70% y temperaturas por debajo de 10°C (Mohapatra *et al.*, 2017).

Es así que, el crecimiento de *Aspergillus* y la contaminación de los productos con aflatoxinas son consecuencia de la interacción del moho, el anfitrión y el ambiente. La combinación adecuada de estos factores determina tanto la concentración de la biomasa fúngica, como la de aflatoxinas producidas.

Existen factores físicos, químicos y biológicos que influyen de manera directa en la producción de aflatoxinas, los cuales son mencionados brevemente a continuación.

Factores físicos

Actividad de agua (a_w). Dentro de los factores abióticos más importantes para el crecimiento de mohos y la producción de micotoxinas se encuentran la a_w y la temperatura (Wawrzyniak *et al.*, 2018). La a_w óptima para la proliferación de *A. flavus* es aproximadamente 0.99; el valor máximo es 0.998 y el mínimo es aproximadamente 0.82 (Pitt & Miscamble, 1995; FAO, 2003). En la Tabla 3 se muestra la a_w tanto para el desarrollo de algunos mohos como para la producción de toxinas.

Tabla 3. Mínima a_w para el desarrollo de mohos y sus micotoxinas.

Mohos	Micotoxinas	Desarrollo	Producción de toxinas
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxina	0.78-0.84	0.82-0.84
<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxina	0.84	0.87
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxina	0.77	0.85
<i>Penicillium patulum</i>	Patulina	0.81	0.95
<i>P. expansum</i>	Patulina	0.82-0.84	0.99
<i>P. verrucosum</i>	Ocratoxina	0.80-0.81	0.83-0.86
<i>Fusarium proliferatum</i>	Fumonisina	0.88	0.93
<i>F. verticillioides</i>	Fumonisina	0.88	0.93

Fuente: Cheli *et al.*, 2013; Fleurat Lessard, 2017

Temperatura. La temperatura para el desarrollo de *A. flavus* pueden ir de 10 a 43°C (Fernández, 2008). La tasa de crecimiento óptima, hasta 25 mm al día, se produce a una temperatura ligeramente superior a 30°C. Este moho produce aflatoxinas en el intervalo de temperaturas de 13-15 y 31-37°C, con una producción mayor en el intervalo de 20 a 30°C (FAO, 2003; Fernández, 2008). En la Tabla 4 se muestra la temperatura tanto para el desarrollo de algunos mohos como para la producción de toxinas.

Tabla 4. Rangos de temperatura para el desarrollo de mohos y producción de micotoxinas.

Mohos	Micotoxinas	T (°C) desarrollo	T (°C) Producción de toxinas
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxina	10–43, óptima: 32-35	12–40
<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxina	10–43, óptima: 32-35	12–40
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxina	8–37, óptima: 24–37	12–37, óptima: 31
<i>Penicillium expansum</i>	Patulina	0-40, óptima: 24–37	No reportado
<i>P. verrucosum</i>	Ocratoxina	0-31, óptima: 20	4–20
Especies de <i>Fusarium</i>	Deoxinivalenol, nivalenol, T-2, Zearalenona	24–26	24–26

Fuente: Cheli *et al.*, 2013

Factores químicos

Entre los factores químicos se encuentra el pH, la concentración de dióxido de carbono, la presencia de compuestos nitrogenados, de oxígeno, pesticidas, fungicidas y la composición de sustrato (Bryden, 2012).

pH. La biosíntesis de aflatoxinas ocurre en condiciones ácidas, mientras que en pH alcalino se inhibe, esto podría deberse a que se genera un cruzamiento con el gen *pacC*, esto provoca que el gen que codifica para la producción de aflatoxinas en condiciones ácidas no se exprese en condiciones alcalinas y por consiguiente, no se llegue a la producción de aflatoxinas (Yu, 2012). En el caso de *A. flavus* y *A. parasiticus* el pH óptimo de crecimiento y de producción de aflatoxinas es de 3.5 a 8.0 y 6, respectivamente (Cheli *et al.*, 2013).

Concentración de CO₂. Uno de los factores que recientemente se ha empleado para reducir la cantidad de aflatoxinas que pueden llegar a producirse durante el almacenamiento es el uso de empaque de atmósferas modificadas, empleando el CO₂ como gas modificante. El uso de estos empaques por sí mismos no son tan eficientes, por lo que se considera la combinación de estos con otros factores como *a_w* y humedad relativa (Mousa *et al.*, 2016).

Compuestos nitrogenados. Los compuestos nitrogenados se relacionan de manera muy estrecha con la producción de aflatoxinas, ya que compuestos tales como asparagina, aspartato, alanina, nitrato y nitrito de amonio, sulfato de amonio, glutamato, glutamina y prolina favorecen la producción de aflatoxinas, mientras que el nitrato y nitrito de sodio no lo hacen, debido a que presentan un efecto supresor sobre la formación de aflatoxinas (Yu, 2012).

Factores Biológicos

Algunos ejemplos de estos factores son variedad, estrés, carga de esporas entre otros (Bryden, 2012). La presencia de diferentes microorganismos en el mismo hábitat puede desarrollar interacciones ecológicas entre ellos, éstas pueden ser positivas, negativas o indiferente al crecimiento fúngico (Asurmendi *et al.*, 2015).

En la Figura 4 se presentan los factores que permiten la incidencia de micotoxinas en alimentos de humanos y animales.

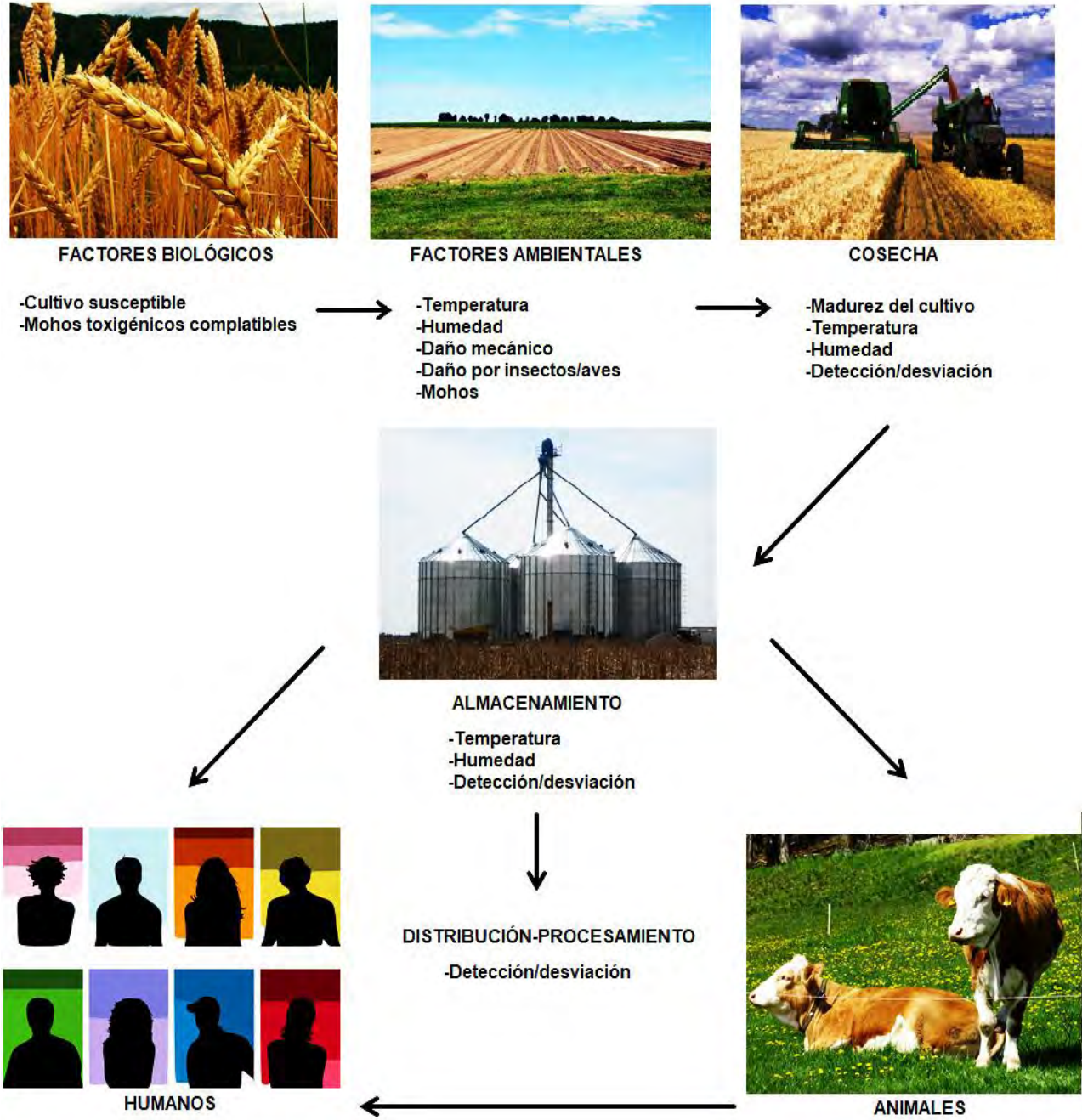


Figura 4. Factores que afectan la incidencia de micotoxinas en las cadenas alimenticias de humanos y animales. Adaptado de Bryden, 2012.

2.2.3. Efectos de las aflatoxinas sobre la salud humana

Entre las principales manifestaciones asociadas a la exposición de aflatoxinas, están el daño hepático (cirrosis) y renal, mutagénesis (mutación en el codón 249 de hepatocélulas humanas), teratogénesis (pueden cruzar la placenta humana y crean malformaciones fetales), inmunosupresión (suprime la respuesta mediada por células, altera la funcionalidad del sistema del complemento e inhibe la acción de la IgA y la IgG), genotoxicidad (formación de aductos, con el ADN y junto con la albúmina induce a la mutación de genes y alteraciones cromosómicas como intercambio entre cromátidas hermanas y recombinación) (Rojas & Wilches, 2009).

De igual manera, afectan la absorción y el metabolismo de lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales. Su toxicidad altera el transporte electrónico de la cadena respiratoria y las membranas celulares. Las aflatoxinas ingeridas por los alimentos se absorben por la mucosa intestinal, pasando de la sangre al hígado, riñón, conductos biliares y sistema nervioso (Carvajal, 2013).

2.3. Métodos de determinación de aflatoxinas

2.3.1. Cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina todavía es aplicable debido a que es una técnica simple. La TLC ofrece la ventaja de separar aflatoxinas en una muestra dada, que pueden aislarse aún más de los residuos de una matriz interferente mediante la limpieza en una columna de inmovilización previo a la TLC (Stroka & Anklam, 2000).

La cuantificación de aflatoxinas en TLC se realiza comúnmente a través de la comparación de puntos de muestra con los de estándares bajo luz UV (enfoque semicuantitativo) o mediante exploración densitométrica de las placas desarrolladas. En el primer caso, la precisión y confiabilidad de los resultados depende directamente del personal. Los densitómetros de fluorescencia disponibles en el mercado han sido desarrollados para ofrecer precisión, resolución de datos y flexibilidad (Stroka & Anklam, 2000).

2.3.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Una de las técnicas más empleadas para la determinación de aflatoxinas es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los métodos de detección usualmente utilizados son absorción UV, fluorescencia (que dependen de la presencia de un cromóforo en las moléculas), espectrometría de masas y amperométricos. Sin embargo, la detección por fluorescencia requiere una derivatización ya sea en pre-columna o post-columna para mejorar las propiedades fluorescentes (Abdel-Azeem *et al.*, 2015).

Por otro lado, HPLC acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) ha mejorado dramáticamente la sensibilidad y la capacidad de identificación debido a que la espectrometría de masas puede seleccionar e identificar simultáneamente los iones de las micotoxinas en una sola ejecución (Zhang *et al.*, 2016).

2.3.3. Cromatografía de gases (GC)

La GC también es utilizada para la determinación de micotoxinas en muestras de alimentos. Frecuentemente se acopla con espectrometría de masa permitiendo límites de detección más bajos y mayor selectividad (Mahmoud *et al.*, 2018).

Debido a que las micotoxinas no son volátiles, estas deben ser derivatizadas para su análisis, para esto se emplean agentes como N, Obis (trimetilsilil) acetamida (BSA), trimetilclorosilano (TMCS) y/o N-trimetilsilimidazol (TMSI) (Mahmoud *et al.*, 2018).

2.3.4. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

La técnica de ELISA se basa en la reacción específica antígeno-anticuerpo y puede ser de tipo competitivo directo o indirecto (Martínez *et al.*, 2013). Frecuentemente se utilizan reacciones de tipo competitivo directo para la determinación de micotoxinas (Osorno, 2015).

Los métodos de base inmunológica dependen de la especificidad de los anticuerpos monoclonales y policlonales contra diferentes micotoxinas (Abd-Elghany & Sallam, 2015). Las altas sensibilidades de los anticuerpos permiten una

gran dilución de la muestra y, por tanto, la reducción de los efectos de la matriz de una muestra. Asimismo, se necesitan buenas reactividades cruzadas (idealmente 100%) en pruebas de aflatoxinas totales para evitar la subestimación de resultados cuando existe mezcla de aflatoxinas en una muestra (Oplatowska *et al.*, 2016).

2.4. Aflatoxinas presentes en la producción de leche y sus derivados

Las aflatoxinas pueden contaminar la leche y sus derivados de forma directa o indirecta. La contaminación directa de los productos lácteos tiene lugar por la presencia de mohos micotoxigénicos. En algunos productos derivados de la leche, los mohos pueden provocar alteraciones organolépticas y generar un rechazo sobre el consumo. Sin embargo, la ausencia de estos mohos en un producto no asegura que éste se encuentre libre de aflatoxinas, debido a que los metabolitos pueden persistir después de que los mohos sean eliminados (Vázquez, 2014).

La contaminación indirecta ocurre cuando crecen mohos aflatoxigénicos productores de AFB₁, en los alimentos del ganado (Vázquez, 2014). La AFB₁ se absorbe vía tracto gastrointestinal dentro del sistema portal sanguíneo del animal y es conducida hacia el hígado donde se metaboliza para transformarla en AFM₁, eventualmente estos residuos van a la leche, músculo y tejidos (Toral, 2010).

En la leche, uno de los principales problemas es la estabilidad de la AFM₁ a procesos como pasteurización (en condiciones tales como 63°C durante 30 min o 77°C durante 16 s), calentamiento (64-100°C durante 15-20 min) y esterilización, ya que se observa que la contaminación original de la leche cruda permanece casi inalterada después de ser sometidos a estos procesos. Aunque, con el calentamiento de 71-120°C durante 30 min se logró disminuir en un 12-35% la contaminación por AFM₁ en leche (Vázquez, 2006).

La AFM₁ presente en la leche no se degrada totalmente durante su procesamiento tecnológico en la producción de derivados lácteos. Por otra parte, la unión de la AFM₁ a las proteínas de la leche hace que su concentración sea mayor en la cuajada, durante la producción de queso, que en la propia leche (Urbán *et al.*, 2009).

La IARC ha reportado a las AFB₁ y AFM₁ como posibles carcinógenos humanos, estos reportes han demostrado el efecto tóxico de las aflatoxinas, por lo que se ha llevado a que se establezcan límites máximos de residuo (LMR) en alimentos. La Unión Europea (UE) ha establecido un LMR para la AFM₁ en leche y productos lácteos de 0.05 µg/L, mientras que el *Codex Alimentarius* de la FAO y la FDA de los Estados Unidos han propuesto valores de 0.5 µg/L (Pérez *et al.*, 2008).

En el caso específico de México, se ha reportado la presencia de AFM₁ en leche en polvo y fluida comercializada durante la década de los 90's y sobretodo en el Estado de Hidalgo y en el Altiplano Mexicano, donde pone en evidencia que la presencia de AFM₁ en leche es una problemática actual en este país (Urbán *et al.*, 2009).

Un dato relevante es que se han reportado valores que sobrepasan el límite máximo permisible de AFM₁ (0.5 µg/L) en leche producida de manera convencional y orgánica en el Estado de México, de ahí que los autores infieran una alta incidencia de esta toxina en productos lácteos con énfasis en la producción de queso, tomando en cuenta que la AFM₁ no se destruye por los procesos tecnológicos (Pérez *et al.*, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar la presencia de mohos toxigénicos y aflatoxinas en muestras de alimento para ganado y leche obtenida de cuencas lecheras del Valle del Mezquital, Hidalgo mediante la aplicación de pruebas microbiológicas y el ensayo de ELISA para determinar su incidencia en esta región.

3.2. Objetivos específicos

- I. Determinar los géneros fúngicos presentes en muestras de alfalfa y silo mediante pruebas microbiológicas para establecer su incidencia.
- II. Cuantificar las aflatoxinas totales presentes en muestras de alfalfa, silo y leche mediante el inmunoensayo ELISA para determinar si su concentración se encuentra dentro de límites establecidos en la normativa.
- III. Analizar la composición proximal de las muestras de forraje mediante técnicas oficiales de análisis para establecer su relación con el crecimiento fúngico.

4. METODOLOGÍA

4.1. Muestras

En total se analizaron 32 muestras de forraje, siendo 17 muestras de alfalfa y 15 muestras de silo, así como 17 muestras de leche. Las muestras fueron obtenidas de diferentes puntos de muestreo de la zona del Valle del Mezquital (Figura 5). Su recolección fue realizada por los técnicos responsables de los centros de acopio, quienes laboran para la Dirección General de Fomento Lechero llevándose a cabo de forma aleatoria.



Figura 5. Puntos de muestreo del Valle del Mezquital.

En muestras de alfalfa y silo, se recolectaron entre 250 y 500 g dependiendo del tipo de muestra a analizar. Las muestras recolectadas se recibieron en bolsas de polietileno. En el caso de las muestras de leche se recolectaron entre 200 y 500 mL siendo contenidas en frascos de plástico y bolsas de polietileno. Todas las muestras se identificaron y se mantuvieron en refrigeración por un periodo no mayor a 48 h hasta su estudio.

Para simplificar el manejo de datos se codificaron las muestras de alfalfa, silo y leche según las zonas de muestreo (Tabla 5).

Tabla 5. Codificación de muestras de alfalfa, silo y leche.

Municipio	Punto de muestreo	Muestra	Código	
Actopan	Centro de Acopio Producción Lechera de Chicavasco	Alfalfa	A-CLC	
		Silo	S-CLC	
		Leche	L-CLC	
	Centro de Acopio Boxaxni	Alfalfa	A-CBX ₁ , A-CBX ₂	
Ixmiquilpan	Centro de acopio Ra Hagma Dhafri, Julián Villagrán	Alfalfa	A-CJV ₁ , A-CJV ₂ , A-CJV ₃ , A-CJV ₄	
		Silo	S-CJV ₁ , S-CJV ₂ , S-CJV ₃	
		Leche	L-CJV ₁ , L-CJV ₂ , L-CJV ₃ , L-CJV ₄ , L-CJV ₅ , L-CJV ₆ , L-CJV ₇	
	Centro de acopio Industrial Lechera Siglo XXI, Bangandho	Alfalfa	A-CLB ₁ , A-CLB ₂ , A-CLB ₃	
		Silo	S-CLB ₁ , S-CLB ₂	
		Leche	L-CLB	
	Centro de acopio Lácteos 2005, Cañada Chica	Silo	S-CCC ₁ , S-CCC ₂ , S-CCC ₃ , S-CCC ₄	
		Leche	L-CCC ₁ , L-CCC ₂ , L-CCC ₃	
	Santiago de Anaya	Centro de Acopio Grupo de Productores de Leche “El Órgano”, El Mezquital	Alfalfa	A-CEO ₁ , A-CEO ₂
			Silo	S-CEO ₁ , S-CEO ₂
			Leche	L-CEO
	Tepetitlán	Centro de acopio Lechería Loma de Guadalupe	Alfalfa	A-CLG ₁ , A-CLG ₂
Silo			S-CLG	
Leche			L-CLG ₁ , L-CLG ₂	
Tula de Allende	Centro de Acopio Sociedad Lechera de Iturbe	Alfalfa	A-CLI ₁ , A-CLI ₂ , A-CLI ₃	
		Silo	S-CLI ₁ , S-CLI ₂	
		Leche	L-CLI	

4.2. Análisis microbiológico

En la Figura 6 se presenta el diagrama de la metodología utilizada a lo largo del estudio microbiológico.

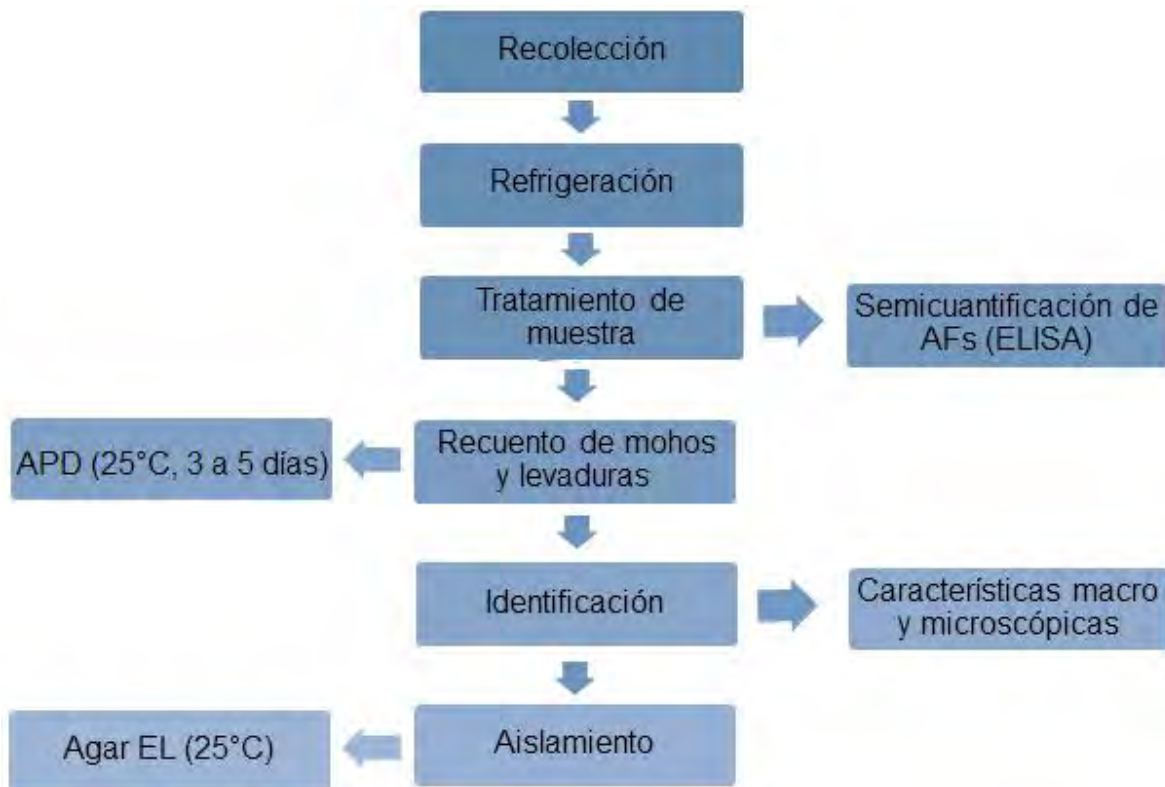


Figura 6. Diagrama de la metodología utilizada para el estudio de la incidencia de mohos y levaduras en muestras de alimento para ganado.

4.2.1. Recuento de mohos y levaduras

Previo al recuento de mohos y levaduras se efectuó el análisis del crecimiento fúngico aparente en las diferentes muestras analizadas, esto se realizó mediante inspección visual.

La determinación de mohos y levaduras se realizó bajo las indicaciones de la NOM 111-SSA1-1994, siendo la técnica siembra en superficie utilizada en este recuento.

Para llevar a cabo el análisis se pesaron 10 g de cada muestra, seguido de una dilución de cada una de ellas en una proporción 1:10 en solución salina adicionada con Tween 80. La suspensión fue homogenizada en el Stomacher® durante aproximadamente 2 min. Esta se consideró como la primera dilución decimal y a partir de ella se realizaron 4 diluciones sucesivas, utilizando el mismo diluyente.

Posteriormente, se sembraron 0.1 mL de muestra homogeneizada mediante la técnica de siembra en superficie en agar de papa-dextrosa (APD). Todas las placas sembradas se incubaron en un periodo de 3-5 días a 25°C.

El conteo de mohos y levaduras se realizó en el periodo de tiempo ya mencionado, y se expresó como el número de unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g) en APD incubadas a 25°C por cinco días.

4.2.2. Identificación de colonias fúngicas

Las colonias fúngicas se identificaron a nivel género, con base a las características macroscópicas y microscópicas. El estudio macroscópico se llevó a cabo a simple vista, observando la morfología y la forma de crecimiento de las colonias sobre la superficie del medio. Inmediatamente, se procedió a realizar el estudio microscópico. La preparación de la muestra se efectuó según la técnica de la cinta adhesiva (Rodríguez & Aviles, 1991), la cual consiste en aplicar una porción de cinta adhesiva transparente sobre la superficie de la colonia y pegarla posteriormente, por presión, sobre un portaobjetos en el que previamente se ha colocado una gota de azul de metileno.

En el caso de las características macroscópicas, se tomaron en cuenta parámetros como: coloración del anverso y reverso de las colonias, textura de las colonias y presencia de pigmento difundido. Los principales parámetros microscópicos tomados en consideración fueron: forma de los cuerpos fructíferos, forma, disposición y ornamentación de las esporas, forma y tamaño de las ascosporas (si las había). Para definir el tipo de mohos encontrados, se utilizaron

los criterios establecidos por el tratado de Von Arx (1981) y el manual de Samson *et al.* (2000).

4.2.3. Aislamiento de colonias fúngicas con potencial micotoxigénico

Paralelo al recuento, se realizó el aislamiento de aquellas colonias que, a simple vista o a través de su observación al microscopio se consideraron pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Mediante el uso de una asa de platino se depositó un inóculo de esporas en tres sitios distintos (formando un triángulo equilátero) (Figura 7) en una placa con agar extracto de levadura (EL), la cual se incubó a 25°C, durante aproximadamente 5 días para el desarrollo óptimo de la colonia fúngica. Cada cepa se aisló por duplicado.

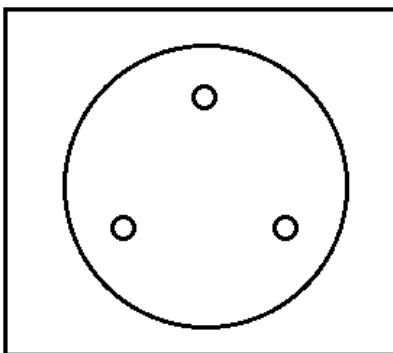


Figura 7. Depósito del inóculo de esporas sobre la superficie del medio.

4.3. Extracción y determinación de aflatoxinas totales

Las muestras se analizaron mediante la técnica de ELISA para determinar la presencia de aflatoxinas totales.

4.3.1. Preparación de las muestras

La extracción y determinación de las aflatoxinas se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el kit comercial utilizado (RIDASCREEN®FAST Aflatoxin).

Para el kit de 48 pocillos se pesaron 5 g de muestra molida y se agregaron 25 mL de metanol al 70%. Se agitó vigorosamente durante 3 min y se filtró el extracto a través de un papel filtro Whatman No. 1. El filtrado se diluyó en una relación 1:1 con agua destilada.

Mientras que, para el kit de 96 pocillos se pesaron 2 g de muestra molida y se adicionaron 10 mL de metanol al 70%. Se agitó durante 10 min en un *shaker*. Posteriormente, se filtró y el filtrado se diluyó 1:6 con agua destilada.

En el caso de las muestras de leche se tomaron 2 mL y se realizó el mismo procedimiento indicado en el kit de 96 pocillos.

Para ambos kits se utilizaron 50 μ L del filtrado diluido en cada pocillo del test. Cabe mencionar que las muestras se almacenaron en un lugar fresco, protegidas de la luz.

4.3.2. Procedimiento del ensayo

Se colocaron los pocillos necesarios en el soporte de la microplaca para los estándares y para las muestras a analizar; los estándares y muestras se identificaron previamente. 50 μ L de ellos se adicionaron a los pocillos correspondientes a través del uso de una punta de pipeta nueva para cada estándar y para cada muestra.

Enseguida, se adicionaron tanto 50 μ L del conjugado aflatoxina-enzima, como 50 μ L del anticuerpo anti-aflatoxina a los pocillos correspondientes. Se mezcló el contenido de la microplaca suavemente y se incubó durante 10 min para el kit de 48 pocillos y 30 min para el kit de 96 pocillos a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Pasado ese tiempo, se vaciaron los pocillos golpeando enérgicamente (tres veces consecutivas) el marco del portapocillos, sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa de restos líquidos.

Se lavaron los pocillos (250 μ L por pocillo) con tampón de lavado y se vaciaron nuevamente los pocillos de la forma ya indicada, este paso se repitió dos veces. Posteriormente, se agregaron 100 μ L de substrato/cromógeno a cada pocillo, se mezcló el contenido de la microplaca suavemente y se incubó 5 min para el kit de 48 pocillos y 15 min para el kit de 96 pocillos en la oscuridad a temperatura ambiente (20-25 °C). Finalmente, se adicionaron 100 μ L de la solución de stop a cada pocillo, se mezcló el contenido de la microplaca suavemente y se midió la absorbancia a 450 nm.

4.4. Análisis proximal

El análisis proximal realizado a muestras de alfalfa y silo se llevó a cabo de acuerdo a lo indicado en los métodos de la AOAC (2005):

- Humedad-secado en estufa (método oficial 930.15)
- Cenizas-método gravimétrico (método oficial 942.05)
- Grasa cruda-método Soxhlet (método oficial 920.39)
- Fibra cruda-método gravimétrico (método oficial 950.02)
- Proteína cruda-método Kjeldahl (método oficial 2001.11)

En el caso de la determinación de carbohidratos, se obtuvo por diferencia.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Recuento de mohos y levaduras

En el caso de las muestras de alfalfa analizadas, se encontraron altas concentraciones de mohos y levaduras (Figura 8), teniendo un rango de $1.0 \cdot 10^2$ a $2.9 \cdot 10^6$ UFC/g de los primeros, así como $4.0 \cdot 10^3$ a $2.1 \cdot 10^7$ UFC/g de las últimas. Estos recuentos demuestran que las muestras de alfalfa en principio representan malas prácticas agrícolas, que propician el desarrollo de mohos toxigénicos y a su vez la producción de aflatoxinas, lo cual fue demostrado debido a la presencia de los principales mohos toxigénicos (Tabla 6), siendo *Aspergillus* y *Penicillium* los géneros fúngicos con mayor incidencia (rango máx. 21.37-37.25%, 16.67-38.85%, respectivamente).

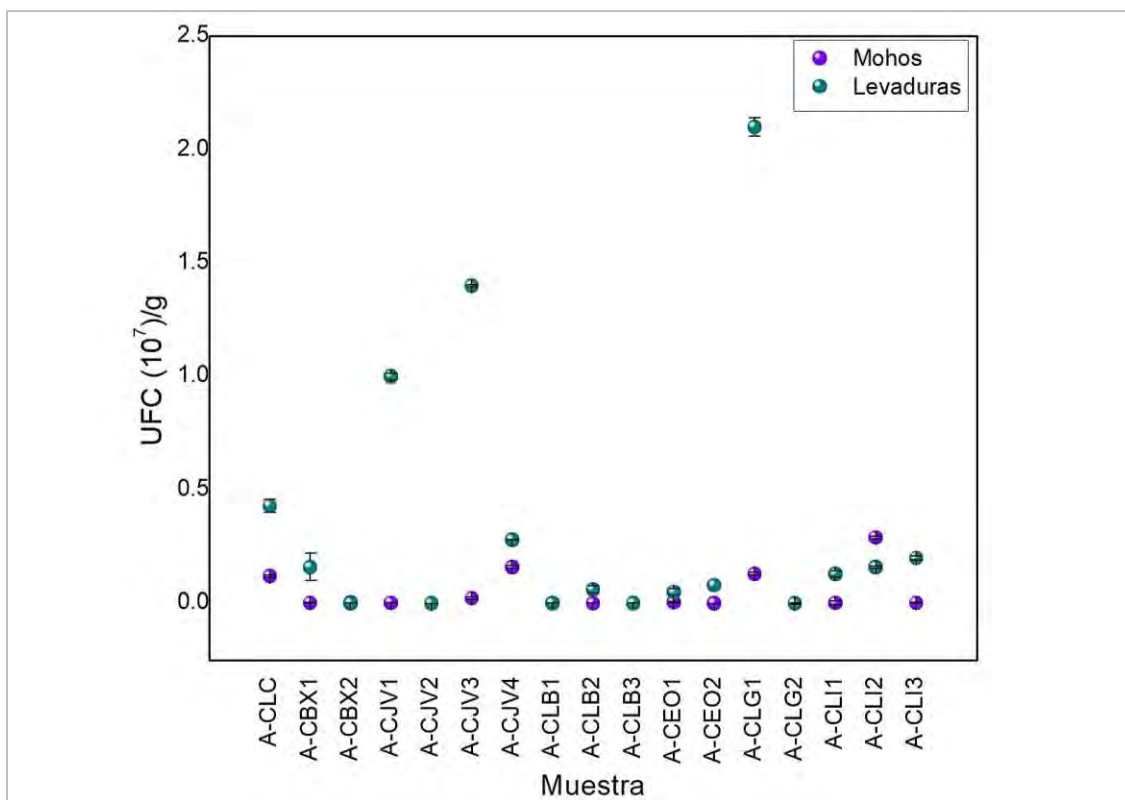


Figura 8. Recuento de mohos y levaduras en muestras de alfalfa recolectadas en el Valle del Mezquital, Hidalgo.

*En las muestras A-CBX2, A-CLB1, A-CLB3 y A-CLG2 presentaron crecimientos extendidos de levaduras, por lo que no fue posible su conteo como lo indica la norma.

Tabla 6. Incidencia de mohos toxigénicos en muestras de alfalfa.

Moho	Muestra	Rango	
		Mínimo	Máximo
<i>Aspergillus</i>	A-CLC, A-CBX1, A-CJV3, A-CEO2	4.45-10%	21.37-37.25%
<i>Penicillium</i>	A-CLC, A-CJV1, A-CJV3, A-CJV4, A-CLB1, A-CLB3, A-CLG2, A-CLI1, A-CLI2, A-CLI3	1.48-3.85%	16.67-38.85%
<i>Fusarium</i>	A-CBX, A-CVJ1, A-CVJ3, A-CLB3, A-CLG1	0.74-2%	20%
<i>Alternaria</i>	A-CJV3, A-CJV4, A-CLB2, A-CEO2, A-CLG2	0.74-4.06%	9.8-12%

La incidencia de mohos es comparable con lo reportado por Whitlow & Hagler (2002), Krnjaja *et al.* (2013) y Trabattoni (2016), quienes identificaron a *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Trichoderma* en muestras de alfalfa, concentrado, ensilaje y demás forraje. Asimismo, en un estudio reciente, la incidencia de *A. flavus* fue de alrededor de 54% en muestras de alimentos para ganado lechero (Khalid *et al.*, 2018).

Por otro lado, Wawrzyniak *et al.* (2018) demostraron que la población de mohos cambia de acuerdo al transcurso del tiempo de almacenamiento de los alimentos. En un estudio realizado por estos autores se reportó que en la etapa inicial se aislaron *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Acremonium* y *Ulocladiu*, mientras que en la etapa final especies de *Aspergillus* y *Penicillium* se hicieron presentes, esto de acuerdo a las condiciones de temperatura y a_w de almacenamiento.

De igual forma, mohos deterioradores como algunas especies de *Aspergillus* y *Penicillium* manifiestan diversas formas de resistencia dado que, tienen carácter xerófilo, es decir, pueden desarrollarse a a_w bajas (0.78-0.80), tolerancia a bajas concentraciones de oxígeno (0.45%), sus respectivas esporas son tolerantes a

altas temperaturas (70-75°C). Esto conlleva a que los mohos contaminen cualquier tipo de alimento, incluyendo a los alimentos para ganado y sobrevivan en el ambiente (Rico *et al.* 2018).

En el caso de las muestras de ensilados, la incidencia de mohos fue menor que en la de alfalfa (Figura 9). Los rangos para este tipo de muestras fue de $1.0 \cdot 10^2$ a $2.0 \cdot 10^5$ UFC/g de mohos. Sin embargo, el crecimiento de levaduras fue de $1.5 \cdot 10^5$ a $2.3 \cdot 10^8$ UFC/g, donde los límites superior e inferior fueron mayores que los observados en alfalfa.

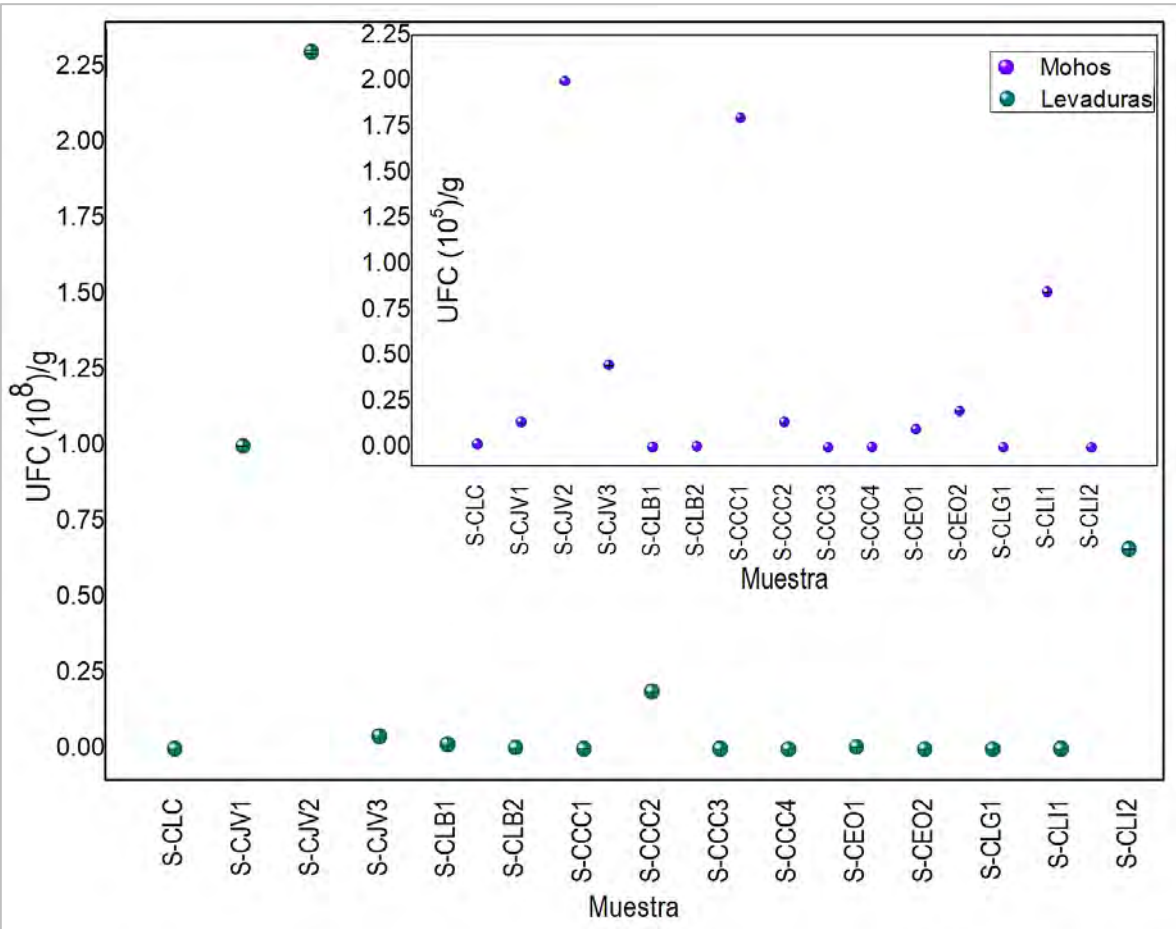


Figura 9. Recuento de mohos y levaduras en muestras de silo recolectadas en el Valle del Mezquital, Hidalgo.

Se sabe que la presencia de estos microorganismos en ensilados se debe, en muchos de los casos, a un mal procesamiento de ensilaje, donde los riesgos de contaminación son muy altos si no se tiene un buen control en alguna de sus

etapas: cosecha de los forrajes, corte, carga de silos, fermentación láctica, almacenamiento, descarga de silos (Cheli *et al.*, 2013; Dunière *et al.*, 2013; Alpízar, 2015).

Otra de las causas es el origen de la materia prima para generar el ensilado. A medida que hay mayor diversidad de materias primas: pasto, trébol, alfalfa, cebada, maíz, trigo, sorgo, entre otros cereales (Dunière *et al.*, 2013; Alpízar, 2015; Oliveira *et al.*, 2017), así como legumbres y subproductos de la industria alimentaria (bagazo de caña de azúcar, pulpa de remolacha azucarera, granos de cerveza) (Alonso *et al.*, 2013) se hace más difícil el control inicial en la carga microbiana.

Además, las levaduras son consideradas como el grupo indeseable más importante, ya que están involucradas en el deterioro aeróbico durante el comienzo del ensilaje o durante la fase de descarga. Asimismo, las levaduras son tolerantes a los ácidos y durante la fase de descarga, la oxigenación del ensilaje reinicia sus rutas de metabolismo de ácidos orgánicos (ácido succínico, cítrico y láctico) induciendo un aumento de pH y por ende permitiendo el crecimiento de microorganismos menos tolerantes a los ácidos (Dunière *et al.*, 2013). De ahí que los altos niveles de levaduras propicien el desarrollo de mohos, tal como se demostró en los resultados obtenidos.

Debido a que los productos finales de fermentación, durante el proceso de ensilaje, tienden a estar a un pH de 3-4 (Ke *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2017) en los ensilados no se espera un recuento de mohos y levaduras mayor a 4 log UFC (Gimeno & Martins, 2011). Es por ello que se puede inferir una mala práctica de procesamiento durante la fabricación de los ensilados muestreados.

Por otro lado, a pesar de que el crecimiento de mohos no fue mayor a 5.26 log UFC/g hubo una importante incidencia de mohos toxigénicos, en especial del género *Aspergillus* (Tabla 7). Resultados semejantes fueron reportados por González *et al.* (2008) y Del Palacio *et al.* (2016) quienes aislaron en muestras de silos un 78% y 70% de *Aspergillus* spp., respectivamente. Mientras que

Baliukoniene *et al.* (2012) y Keller *et al.* (2012) reportaron un 0.9-15.7% y 22.5-54% del mismo género, respectivamente.

Es importante señalar que la incidencia de *Aspergillus* es más elevada en la etapa de post-fermentación que antes del proceso. Así lo reportaron Keller *et al.* (2013), que aislaron un 30% de este género en la pre-fermentación contra ~55% en la post-fermentación. De igual manera, Del Palacio *et al.* (2016) observaron que la incidencia de *Aspergillus* aumentaba conforme transcurrían los días de almacenamiento.

Asimismo, en estudios de diversos países se ha reportado que los mohos toxigénicos son capaces de desarrollarse en diversos tipos de ensilaje. Estos géneros abarcan en su mayoría *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, entre otros mohos (Eckard *et al.* 2011; Van Asselt *et al.* 2012; Alonso *et al.* 2013; Cheli *et al.* 2013; Wambacq *et al.* 2016).

Tabla 7. Incidencia de mohos toxigénicos en muestras de silo.

Moho	Muestra	Rango
<i>Aspergillus</i>	S-CLC, S-CJV1, S-CJV2,	Mín. 4.76-8.33%
	S-CCC1, S-CCC2	Máx. 51.41%
<i>Penicillium</i>	S-CCC1, S-CEO1, S-CEO2	35.29-50%
<i>Fusarium</i>	S-CLC	8.33%

5.2. Determinación de aflatoxinas

Todas las muestras de alfalfa, silo y leche presentaron contaminación por aflatoxinas. En alfalfa la concentración determinada tuvo un rango de 1.37 µg/kg a 24.57 µg/kg de AFs totales (Figura 10). De acuerdo con la legislación de Estados Unidos, la concentración máxima de AFs totales en alfalfa sobrepasa los límites permitidos (20 µg/kg de AFB₁) (Alonso, 2017).

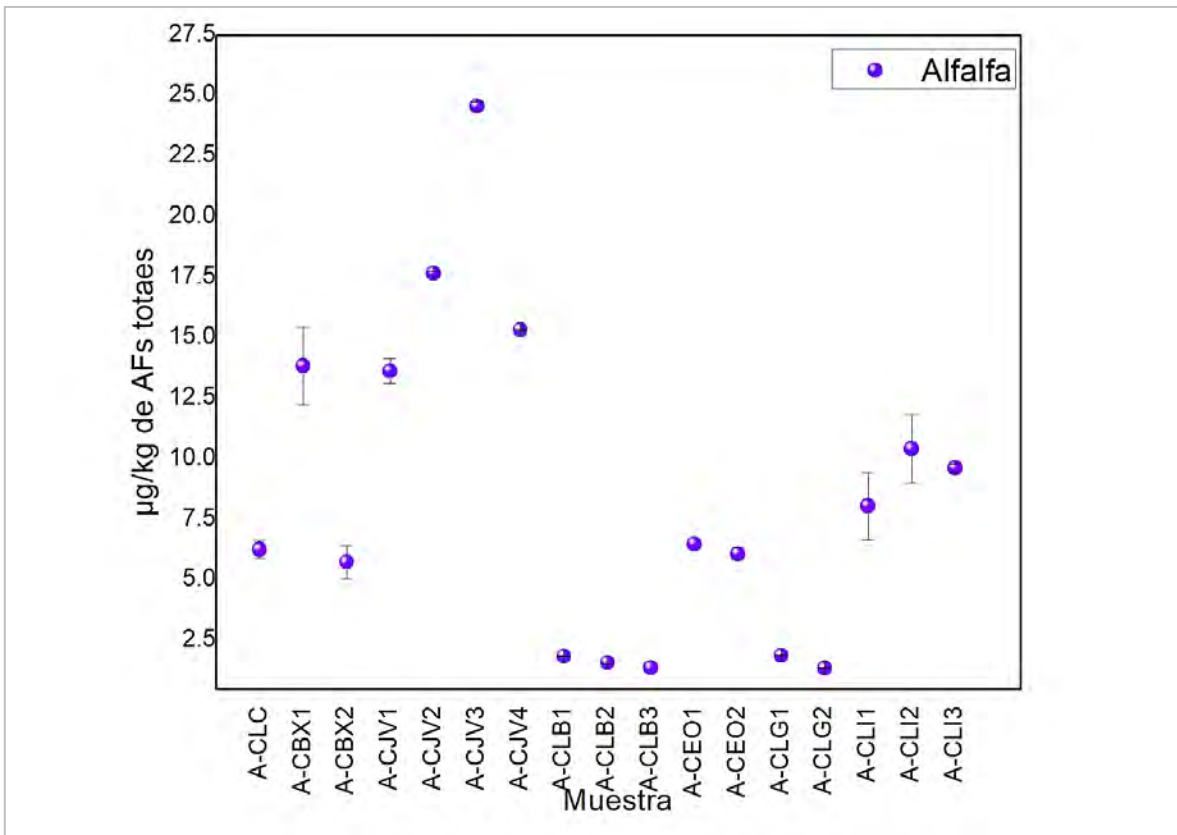


Figura 10. Concentración de AFs totales en muestras de alfalfa provenientes del Valle del Mezquital, Hidalgo.

En general, los resultados obtenidos de AFs totales los forrajes son similares a los reportados por Dashti *et al.* (2009), quienes analizaron 84 muestras de alimento para ganado encontrando niveles entre 0.64 y 19.9 µg/kg de AFs, mientras que Borutova *et al.* (2012) hallaron niveles promedio de 13.9 µg/kg. En otro estudio realizado por Sahin *et al.* (2016) la incidencia de aflatoxinas en muestras de alimento para ganado bovino fue de 26.3%, con un rango de 0.278 a 8.43 µg/kg de AFs y una concentración de 6.89 µg/kg de AFB₁.

En cuanto a la incidencia de aflatoxinas en alfalfa Signorini *et al.* (2012) reportaron un 63.6% de AFB₁ en muestras de heno de alfalfa y un 91.4% de esta misma micotoxina en muestras de alfalfa. Mientras que Zachariasova *et al.* (2014) reportaron una incidencia del 24% de micotoxinas en muestras de alfalfa y pasto.

En el caso de las muestras de silo, el rango de AFs totales fue de 1.53 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 9.26 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Figura 11). Estas concentraciones se encuentran por debajo del límite permisible de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB₁.

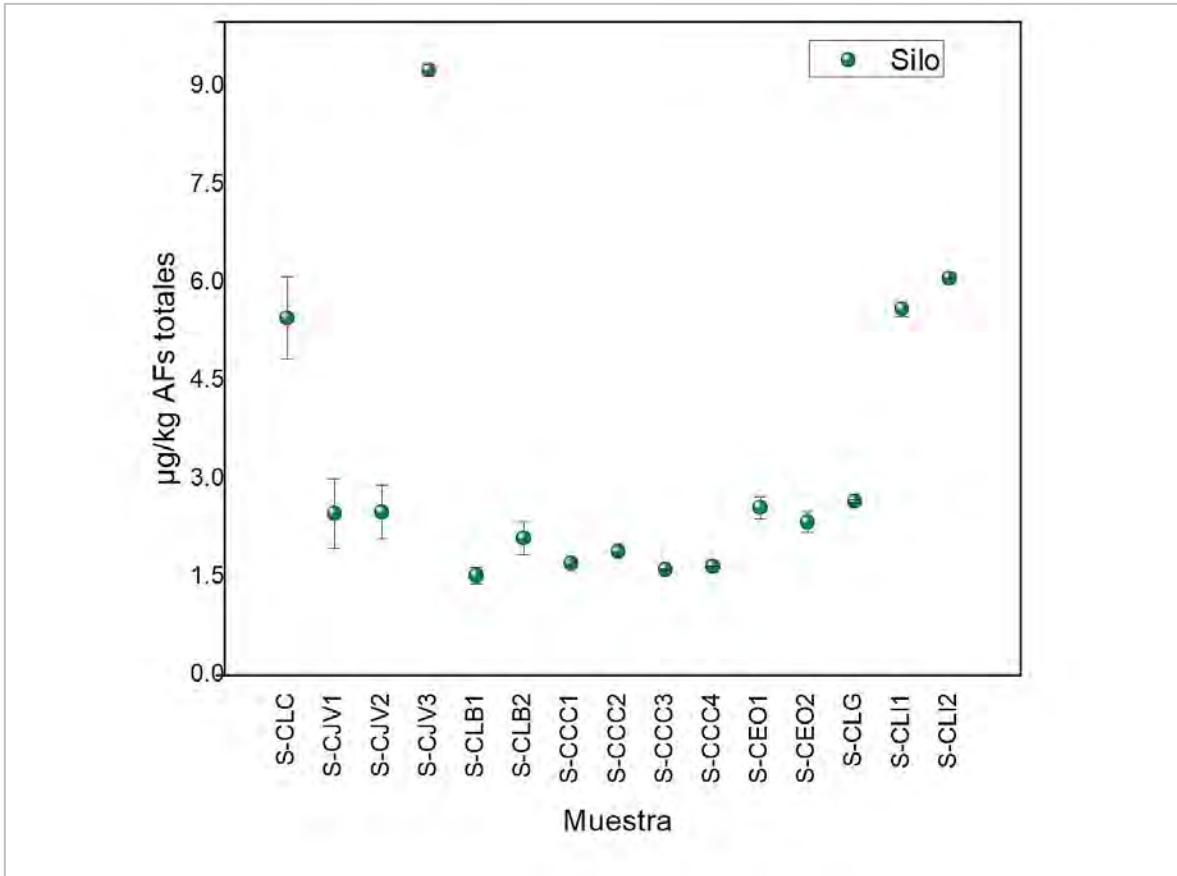


Figura 11. Concentración de AFs totales en muestras de ensilaje provenientes del Valle del Mezquital, Hidalgo.

En un estudio realizado en Argentina por González *et al.* (2008) se reportó una incidencia del 17% de AFB₁, con un amplio rango de concentración (1.43 a 155.78 $\mu\text{g}/\text{kg}$) en muestras de silo de maíz. Asimismo, Cheli *et al.* (2013) encontraron concentraciones de 5 a 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB₁ en el mismo tipo de muestra.

De igual forma, Keller *et al.* (2013) reportaron una incidencia de 10.34 a 17.24% de AFB₁ con un rango de 2 a 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en muestras de silo de maíz obtenidos en la etapa de pre-fermentación, mientras que en la post-fermentación la incidencia fue de 12.07 a 17.24% con un rango de 2 a 61 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A su vez, Wambacq *et al.*

(2016) reportaron 12% de incidencia tanto en pre-fermentación como en post-fermentación con promedios de 0.007 y 0.033 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB₁, respectivamente.

Por su parte Kosicki *et al.* (2016) reportaron una incidencia del 11% en el mismo tipo de silo con una concentración máxima de 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En otro estudio hecho en Uruguay por Del Palacio *et al.* (2016) se reportó un intervalo de 3 a 17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en un periodo de evaluación de 120 días en muestras de silo de trigo.

Estos resultados indican que las condiciones ambientales del lugar de origen de las muestras, como una alta temperatura y una alta humedad, son factores determinantes en el desarrollo de mohos micotoxigénicos y la producción de aflatoxinas, la contaminación del maíz con aflatoxinas generalmente se asocia con regiones tropicales o subtropicales (Hernández & Navarro, 2015).

La contaminación por mohos y micotoxinas en el ensilaje en post-cosecha depende de las condiciones de almacenamiento. Unas condiciones de ensilado favorables, una fermentación extensa y una baja disponibilidad de oxígeno disminuyen el crecimiento de mohos y la contaminación por micotoxinas (Cheli *et al.*, 2013).

Por otro lado, en las muestras de leche el rango de concentración fue de 0.03 $\mu\text{g}/\text{L}$ a 0.79 $\mu\text{g}/\text{L}$ de AFs totales (Figura 12). Las muestras L-CCC₃, L-CEO y L-CLG₂ superan la concentración máxima permitida de 0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ de AFM₁ en leche establecida por la FDA. Sin embargo, para la legislación europea el 70.6% de las muestras de leche superan el límite máximo permitido de 0.05 $\mu\text{g}/\text{L}$ para esta micotoxina (Alonso, 2017).

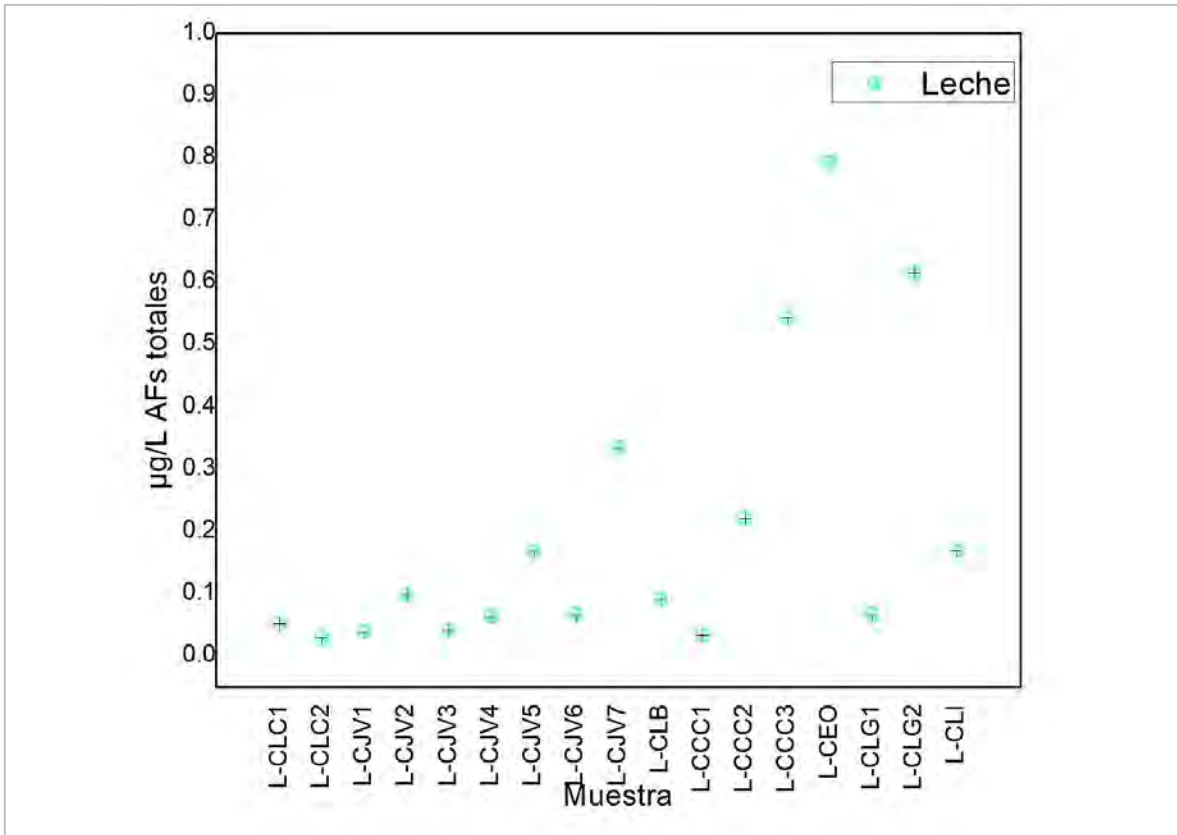


Figura 12. Concentración de AFs totales en muestras de leche provenientes del Valle del Mezquital, Hidalgo.

Comúnmente la aflatoxina más recurrente en leche es la AFM₁, que puede estar presente en la leche por el consumo por parte de las vacas de alimentos contaminados con AFB₁ (Hernández & Navarro, 2015). En relación a esta aflatoxina, Signorini *et al.* (2012) reportaron una estimación de 0.059 µg/L de AFM₁ en las muestras de leche analizadas. Asimismo, Michlig *et al.* (2016) obtuvieron una incidencia del 38.8% de esta aflatoxina, aunque la concentración no fue especificada. Ambos estudios fueron realizados en Argentina. Por su parte Sahin *et al.* (2016) reportó una incidencia del 21.1%, con un rango de 0.011 a 0.1 µg/L y un promedio de 0.036 µg/L de AFM₁.

En estudios más recientes Xiong *et al.* (2018) evaluaron muestras de leche pasteurizada y UHT, donde se obtuvo un rango de incidencia del 87.3 al 97.1% y un rango máximo de concentración de 0.09 a 0.35 µg/L de las primeras, así como

una incidencia del 40.4 al 64.8% y un rango máximo de concentración de 0.04 a 0.07 µg/L de las segundas de AFM₁.

Por su parte, Li *et al.* (2017) encontraron una incidencia del 4.7% de AFM₁ en leche bronca con una concentración máxima del 0.412 µg/L, también mencionaron que la incidencia de esta micotoxina fue mayor en invierno (10.2%) que en primavera, verano u otoño (3.0%, 2.1%, y 4.4%, respectivamente). Esta tendencia estacional refleja el hecho de que, en general, la disponibilidad de los forrajes frescos se reduce en la temporada de invierno y, por lo tanto, los productores de leche aumentan su uso de alimentos concentrados almacenados. Si estos alimentos se almacenan en condiciones inadecuadas, aumenta el riesgo de contaminación por mohos y AFM₁ en la leche bronca producida por las vacas lactantes. Ambos estudios se realizaron en China.

En un meta-análisis realizado por Rahmani *et al.* (2018) encontraron que la concentración de AFM₁ fue mayor en leche UHT que en bronca y pasteurizada (0.082 µg/L, 0.06 µg/L y 0.045 µg/L, respectivamente). Sin embargo estos mismos autores encontraron en otros estudios que el tratamiento de UHT reduce el 63.6% en el nivel de AFM₁. Las diferencias encontradas las atribuyen a un alto nivel de contaminación por micotoxinas en las muestras de leche UHT investigadas, mayor nivel de calidad de leche cruda o pasteurizada en comparación con UHT, bajo nivel de eficacia de los tratamientos térmicos utilizados debido a fallas en el tratamiento UHT, así como los métodos analíticos utilizados.

Por otro lado, Flores *et al.* (2015) encontraron en un estudio realizado en Jordania la presencia de AFB₁ en leche bronca con una incidencia del 8.3% y una concentración promedio de 2.27 µg/L.

5.3. Determinación la composición proximal

En la Tabla 8 se presentan los resultados del análisis proximal de los distintos forrajes evaluados (alfalfa y ensilados). Los valores obtenidos para las muestras de alfalfa son similares a los reportados por diversos autores (Tabla 9). Sin

embargo, los resultados arrojados para las muestras de silo fueron diferentes, lo cual es debido a que los resultados obtenidos son dependientes tanto del origen de la materia prima con la que se elabora el ensilado como del proceso de fermentación que se sigue para su obtención.

Tabla 8. Análisis proximal de los forrajes evaluados, presentado en base seca.

	Forraje	
	Alfalfa	Silo
Humedad (%)	10.00 - 12.00	30.00 - 40.00
Materia seca (%)	88.00 - 90.00	60.00 - 70.00
De la cual:		
Ceniza (%)	7.48 ± 0.18 - 11.28 ± 0.51	7.53 ± 0.32 - 11.14 ± 0.78
Grasa cruda (%)	1.39 ± 0.16 - 2.03 ± 0.02	0.63 ± 0.1 - 2.40 ± 0.18
Fibra (%)	24.29 ± 0.18 - 26.52 ± 0.33	24.67 ± 0.28 - 25.42 ± 0.21
Proteína (%)	15.72 ± 0.14 - 16.63 ± 0.26	7.59 ± 0.25 - 10.61 ± 0.26
Carbohidratos (%)	43.47 ± 0.39 - 51.23 ± 0.13	51.92 ± 0.67 - 59.68 ± 0.78

Tabla 9. Análisis proximal de los forrajes evaluados reportados por diversos autores en base seca.

Forraje	H %	C %	GC %	FC %	PC %	Referencia
Alfalfa	NR	11.7	3.0	25.9	20.2	Contreras & Pirela, 2013
	NR	11.3	1.4	24.4	20.1	Médina <i>et al.</i> , 2013
	NR	11.0	1.1	28.6	16.9	Torres <i>et al.</i> , 2009
	9.2	11.1	2.4	25.4	16.5	FEDNA, 2018
Silo	NR	2.04	4.69	16.77	8.97	Gómez <i>et al.</i> , 2015
	NR	7.40	NR	22.61	11.85	Espinoza <i>et al.</i> , 2015
	76.44	10,44	0,73	NR	8,28	Villa & Hurtado, 2016
	NR	4.18	4.20	24.5	7.13	FEDNA, 2018
H=Humedad, C=Cenizas, GC=Grasa cruda, FC=Fibra cruda, PC=Proteína cruda, NR= No reportado						

Los resultados obtenidos muestran que tanto la alfalfa como los ensilados son medios óptimos para el desarrollo de mohos, debido a que estos microorganismos son quimiorganotrofos, es decir, adquieren energía mediante reacciones de oxidación de compuestos orgánicos (Guerrero, 2009). Es así que, la composición de las muestras analizadas cumple con sus , y además debido a las condiciones de almacenamiento de la alfalfa y el ensilado, y al carácter aeróbico de estos microorganismos, su proliferación es mayor (Guerrero, 2009). Por lo tanto, los forrajes en general parecen ser buenos sustratos de nutrientes para los mohos, en específico, se notó que la alfalfa tiene una considerable cantidad de proteína (15.72-16.63%), lo que se relaciona con las elevadas UFC/g encontradas en la muestra.

Por otro lado, en los ensilados a pesar de que la cantidad de proteína fue menor (7.59-10.61%), hubo crecimiento de mohos. Esto tiene importancia debido a la nula inhibición que se supone debería ejercer el cambio de pH y la presencia de bacterias ácido lácticas (Gacem & El Hadj-Kheilil, 2016).

Sin embargo no debe dejarse a un lado los factores ambientales tales como a_w , temperatura y pH, que son los que más benefician al crecimiento de estos microorganismos. Los mohos pueden crecer en condiciones de pH bajo e incluso a alta temperatura y, combinado con la facilidad de dispersión de las esporas fúngicas, estos organismos son contaminantes habituales de alimentos (Guerrero, 2009). Es por ello que se debe tener un control desde el cultivo, la cosecha y almacenamiento de los forrajes.

Asimismo, la relación de proteína/carbohidratos es responsable de la síntesis de varias micotoxinas. Dado que, para algunas especies una alta cantidad de proteína favorece el desarrollo de estas toxinas y para otros produce un efecto inhibitorio (Sanchis *et al.*, 2007). De la misma forma, la fuente de carbono puede influir en la síntesis de micotoxinas, es decir, la cantidad y tipo de carbohidrato disponible. Se ha visto que las especies de *Aspergillus* producen más ocratoxina cuando están en presencia de glucosa o sacarosa que en otros sacáridos (Sanchis *et al.*, 2007).

Aunque los requerimientos nutricionales básicos para el desarrollo de mohos son proteína y carbohidratos, la presencia de algunos minerales como el calcio, fósforo y magnesio ayudan al crecimiento de mohos. Así lo reportaron Martinson *et al.* (2011), quienes encontraron que a mayor concentración de estos elementos mayor era la concentración de mohos. Por su parte, Eastridge *et al.* (2017) y He *et al.* (2018) reportaron la presencia de estos minerales en silos de alfalfa y maíz. Por lo que, el contenido de cenizas obtenido en las muestras de los forrajes posiblemente contribuyó al desarrollo de estos microorganismos.

Es así que, con este estudio se comprueba que la riqueza de nutrientes en un alimento (para ganado) suele ser un medio natural para el desarrollo de mohos micotoxigénicos y su subsecuente producción de micotoxinas. Sin embargo, no hay un gran efecto de la concentración de proteína y carbohidratos sobre el desarrollo de mohos como lo ejercen los factores ambientales y sobretodo aquellos ligados al almacenamiento.

Es por ello que la importancia de conocer estos resultados tiene que ver con la contaminación en la cadena de producción de leche, ya que se observó que la presencia de aflatoxinas en el alimento está relacionada, probablemente, con la presencia de aflatoxinas en la leche bronca proveniente de vacas que consumen alimento con una alta carga de estas micotoxinas.

6. CONCLUSIONES

Todas las muestras de alfalfa y silo analizadas presentaron altos niveles de contaminación fúngica, hallándose una gran variedad de mohos entre ellos algunos micotoxigénicos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*.

Se corroboró la contaminación por aflatoxinas en la totalidad de las muestras de alfalfa, silo y leche analizadas; en muchos casos exceden los límites permisibles por la normatividad.

La composición proximal de los forrajes no parece ejercer una influencia importante en la contaminación por aflatoxinas en las muestras analizadas; los factores ambientales, las malas prácticas agrícolas y la presencia de flora competitiva parecen ser los factores determinantes en la incidencia de mohos aflatoxigénicos y la aparición de sus metabolitos secundarios.

7. REFERENCIAS

- Abdel-Azeem, S. M., Diab, M. A., & El-Shahat, M. F. (2015). Ultra-high-pressure liquid chromatography–solid-phase clean-up for determining aflatoxins in Egyptian food commodities. *Journal of Food Composition and Analysis*, *44*, 18-24.
- Abd-Elghany, S. M., & Sallam, K. I. (2015). Rapid determination of total aflatoxins and ochratoxins A in meat products by immuno-affinity fluorimetry. *Food Chemistry*, *179*, 253–256.
- Alonso Díaz, D. A. (2017). Micotoxinas. *Secretaría General de Comercio Exterior*, 1-14.
- Alonso, V., Pereyra, C., Keller, L., Dalcerro, A., Rosa, C., Chiacchiera, S., & Cavaglieri, L. (2013). Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *Journal of Applied Microbiology*, *115*, 637-643.
- Alpízar Solís, C. (2015). Presencia de hongos y contaminación con micotoxinas en ensilajes para alimentación de rumiantes. Artículo de Revisión. *Revista de Ciencias Veterinarias*, *33*(1), 7-31.
- AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis*. Obtenido de Association of Official Analytical Chemists: <http://www.eoma.aoac.org>
- Asurmendi, P., Barberis, C., Pascual, L., Dalcerro, A., & Barberis, L. (2015). Influence of *Listeria monocytogenes* and environmental abiotic factors on growth parameters and aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. *Journal of Stored Products Research*, *60*, 60-65.
- Baliukoniene, V., Bakutis, B., Vaivadaite, T., Bartkienė, E., & Jovaišienė, J. (2012). Prevalence of fungi and mycotoxins in silage and milk in Lithuania. *Veterinarija ir Zootechnika*, *59*(81), 3-9.
- Baydar, T., Engin, A., Girgin, G., Aydin, S., & Sahin, G. (2005). Aflatoxin and ochratoxin in various types of commonly consumed retail ground samples in Ankara, Turkey. *Ann Agric Environ Med*, 193-197.
- Bezerra da Rocha, M., Oliveira Freire, F., Feitosa Maia, F., Florindo Guedes, M., & Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, *36*, 159-165.
- Bhat, R., Rai, R., & Karim, A. (2010). Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*, 57-81.
- Blunden, G., Roch, O., Rogers, D., Coker, R., Brandburn, N., & John, A. (1991). Mycotoxins in food. *Medical Laboratory Sciences*, 271-282.
- Borrell, J., & Gimeno, G. (Septiembre de 2012). Micotoxinas en los alimentos: medidas de prevención y detoxificación. *Selecciones Avícolas*, 567-572. Recuperado el 01 de Septiembre de 2016, de <http://www.zeolitanatural.com/docs/animalavicultura.pdf>

- Borutova, R., Acosta-Aragón, Y., Nahër, K., & Berthiller, F. (2012). Co-occurrence and statistical correlations between mycotoxins in feedstuffs collected in the Asia–Oceania in 2010. *Animal Feed Science and Technology*, 190-197.
- Bosco, F., & Mollea, C. (2012). Mycotoxins in Food. En B. Váldez, *Food Industrial Processes - Methods and Equipment* (págs. 169-189). Rijeka, Croatia : InTech.
- Bryden, W. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 173, 134-158.
- Çagındı, Ö., & Gürhayta, O. (2016). Aflatoxins and ochratoxin A in dried eggplant and green bell pepper. *Food Control*, 70, 216-220.
- Carvajal, M. (2013). Transformación de la aflatoxina B1 de alimentos en el cancerígeno humano, aducto AFB1-ADN. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 109-120.
- Cheli, F., Campagnoli, A., & Dell'Orto, V. (2013). Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 183, 1– 16.
- Chen, R., Maa, F., Li, P.-W., Zhang, W., Ding, X.-X., Zhang, Q., . . . Xu, B.-C. (2014). Effect of ozone on aflatoxins detoxification and nutritional quality of peanuts. *Food Chemistry*, 146, 284–288.
- Contreras Peña, D. L., & Pirela León, M. F. (2013). Empleo en la alimentación de bovino. En A. D. Perozo Bravo, *Manejo de Pastos y Forrajes Tropicales* (pág. 238). Maracaibo, Venezuela: Astro Data.
- Dashti, B., Al-Hamli, S., Alomirah, H., Al-Zenki, S., Abbas, A., & Sawaya, W. (2009). Levels of aflatoxin M1 in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. *Food Control*, 686-690.
- 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, 1000–1005.
- Diao, E., Li, X., Zhang, Z., Ma, W., Ji, N., & Dong, H. (2015). Ultraviolet irradiation detoxification of aflatoxins. *Trends in Food Science & Technology*, 42, 64e69.
- Dunière, L., Sindou, J., Chaucheyras Durand, F., Chevallier, I., & Thévenot Sergentet, D. (2013). Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*, 182, 1– 15.
- Eastridge, M., Starkey, R., P.N. Gott, P., Oelker, E., Sewell, A., Mathew, B., & Firkins, J. (2017). Dairy cows fed equivalent concentrations of forage neutral detergent fiber from corn silage, alfalfa hay, wheat straw, and corn stover had similar milk yield and total tract digestibility. *Animal Feed Science and Technology*, 225, 81-86.
- Eckard, S., Wettstein, F., Forrer, H., & Vogelgsang, S. (2011). Incidence of Fusarium species and mycotoxins in maize silage. *Toxins*, 3(8), 949–67.

- Elika. (enero de 2012). Micotoxinas en Alimentos y Piensos. *Fundación Vasca para seguridad Agroalimentaria*. Recuperado el 30 de Agosto de 2016, de Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria.
- Ellis, W., Smith, J., Simpson, B. K., & Oldham, J. (1991). Aflatoxins in Food: Ocurrence biosynthesis, effects on organisms detection, and methods of control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 403 – 439.
- Espinoza Guerra, I., Bolívar Montenegro, L., Torres Vallejo, C., López Vera, M., & García Montes, Y. (2015). Efecto de inoculantes microbianos sobre las características químicas y fermentativas de ensilajes de maíz forrajero. *ESPAMCIENCIA*, 6(1), 15-21.
- FAO. (2003). *Manual Sobre la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la Prevención y Control de las Micotoxinas*. Roma, Italia: FAO/OIEA. Obtenido de Depósitos de documentos de la FAO: <http://www.fao.org/docrep/005/y1390s/y1390s04.htm>
- FEDNA. (2018). *Alfalfa granulada (16,5% PB)*. Obtenido de Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal: http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/alfalfa-granulada-165-pb
- FEDNA. (2018). *Ensilado de maíz*. Obtenido de Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal: <http://www.fundacionfedna.org/forrajes/ensilado-de-ma%C3%ADz>
- Fernández Escartín, E. (2008). *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. Querétaro, México: Universidad Autónoma de Querétaro.
- Fleurat Lessard, F. (2017). Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins-An update. *Journal of Stored Products Research*, 71, 22-40.
- Flores Flores, M., Lizarraga, E., López de Cerain, A., & González-Peñas, E. (2015). Presence of mycotoxins in animal milk: A review. *Food Control*, 53, 163-176.
- Gacem, M. A., & El Hadj-Khelil, A. O. (2016). Toxicology, biosynthesis, bio-control of aflatoxin and new methods of detection. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(9), 808-814. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.07.012>
- Ghali, R., Belouaer, I., Hdiri, S., Ghorbel, H., Maaroufi, K., & Hedilli, A. (2009). Simultaneous HPLC determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Tunisian sorghum and pistachios. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 751-755.
- Gimeno, A. (2004). Aflatoxina M1 en la Leche. Riesgos para la Salud Pública, Prevención y Control. *Alimentación animal*, 32-44.
- Gimeno, A., & Martins, M. (2011). *Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos*. Buenos Aires, Argentina: Talleres graficos.

- Gómez Gurrola, A., Sanginés García, L., Hernández Ballesteros, J., & Benítez Meza, J. (2015). Evaluación químico proximal de ensilado de maíz (variedad DK2034) en diferentes. *Revista EDUCATECONCIENCIA*, 7(8), 62 - 68.
- González, M., Alonso, V., Sager, R., Morlaco, M., Magnoli, C., Astoreca, A., . . . Cavaglieri, L. (2008). Fungi and selected mycotoxins from pre-and postfermented corn silage. *Journal of Applied Microbiology*, 104(4), 1034–1041.
- Guerrero, R. (2009). Biología celular y microorganismos eucariotas. En M. Madigan, J. Martinko, P. Dunlap, & D. Clark, *Biología de los microorganismos*. (págs. 592-593). Madrid, España: Pearson Educación.
- Han, R., Zheng, N., Wang, J., Zhen, Y., Xu, X., & Li, S. (2013). Survey of aflatoxin in dairy cow feed and raw milk in China. *Food Control*, 35-39.
- He, L., Wu, H., Wang, G., Meng, Q., & Zhou, Z. (2018). The effects of including corn silage, corn stalk silage, and corn grain in finishing ration of beef steers on meat quality and oxidative stability. *Meat Science*, 138, 142-148.
- Hernández, R., & Navarro, I. (2015). Surveillance of aflatoxin content in dairy cow feedstuff from Navarra (Spain). *Animal Feed Science and Technology*, 35-46.
- INATEC. (2016). *Manual del protagonista. Nutrición animal*. Nicaragua: Institución Nacional Tecnológico.
- Ke, W., Yang, F., Undersander, D., & Guo, X. (2015). Fermentation characteristics, aerobic stability, proteolysis and lipid composition of alfalfa silage ensiled with apple or grape pomace. *Animal Feed Science and Technology*, 202, 12–19.
- Keller, L., González Pereyra, M., Keller, K., Alonso, V., Oliveira, A., Almeida, T., . . . Rosa, C. (2013). Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation. *Journal of Stored Products Research*, 52, 42-47.
- Keller, M., Keller, K., Monge, M., Pereyra, C., Alonso, V., Cavaglieri, L., . . . Rosa, C. (2012). Gliotoxin contamination in pre- and postfermented corn, sorghum and wet brewer's grains silage in Sao Paulo and Rio de Janeiro State, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 112(5), 865-873.
- Khalid, S., Hussain, N., & Imran, M. (2018). Detection of aflatoxigenicity of *Aspergillus flavus*, based on potential gene marker, from food and feed samples. *Journal of food safety*, 38, 1-9.
- Kosicki, R., Błajet Kosicka, A., Grajewski, J., & Twaruzek, M. (2016). Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs. *Animal Feed Science and Technology*, 215, 165–180.
- Krnjaja, V., Novaković, Ž., Stojanović, L., Ostojic Andric, D., Stanišić, N., Nikšić, D., & Mandić, V. (Enero de 2013). Contamination of cattle feed with molds and mycotoxins. *Researchgate*, 67, 129-138.
- Laval R., E. (2004). Sobre las epidemias del fuego de San Antonio. *Revista Chilena de Infectología*, 74-76.

- Lazo, R., & Sierra, G. (2008). Investigación del efecto de las micotoxinas en el ser humano. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(1), 7-11.
- Lee, J., Her, J.-Y., & Lee, K.-G. (2015). Reduction of aflatoxins (B1, B2, G1, and G2) in soybean-based model systems. *Food Chemistry*, 45-51.
- Li, S., Min, L., Wang, P., Zhang, Y., Zheng, N., & Wang, J. (2017). Aflatoxin M1 contamination in raw milk from major milk-producing areas of China during four seasons of 2016. *Food Control*, 82, 121-125.
- Liu, R., Jin, Q., Huang, J., Liu, Y., Xuang, X., & Zhou, X. (2012). In vitro toxicity of aflatoxin B1 and its photodegradation products in HepG2 cells. *Journal of Applied Technology*, 32, 276-281.
- Mahmoud, A., Escrivá, L., Rodríguez Carrasco, Y., Moltó, J., & Berrada, H. (2018). Determination of trichothecenes in chicken liver using gas chromatography coupled with triple-quadrupole mass spectrometry. *LWT*, 93, 237-242.
- Mallmann, C. A., Hummes Rauber, R., & Giacomini, L. (2017). *Factores de formación de las micotoxinas y sus formas de control*. Obtenido de Laboratorio de análisis micotoxicológicos. Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva. Universidad Federal de Santa María.: http://www.lamic.ufsm.br/papers/20060515_factores.pdf
- Martínez Larragaña, M., & Anadón, A. (2012). Micotoxinas. En M. R. Martínez Larragaña, & A. Anadón, *Micotoxinas: Toxicología alimentaria* (págs. 289-293). Madrid, España: Díaz de Santos.
- Martínez Larragaña, M. R., & Anadón, A. (2012). Micotoxinas. En A. M. Cameán, & M. Repetto, *Toxicología Alimentaria* (págs. 289-290). Madrid, España: Díaz de Santos.
- Martínez, M. M., Vargas, L. M., & Gómez, V. M. (2013). Aflatoxinas: Incidencia, impactos en la salud, control y prevención. *Biosalud*, 12. Recuperado el 23 de Noviembre de 2016, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95502013000200008
- Martinson, K., Coblenz, W., & Sheaffer, C. (2011). The effect of harvest moisture and bale wrapping on forage quality, temperature, and mold in orchardgrass hay. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31, 711-716.
- Médina Córdova, N., Espinoza Villavicencio, J., Ávila Serrano, N., & Murillo Amador, B. (2013). Composición química de forrajes del agostadero y su relación con la composición química de leche de cabras criollas. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*, 38(2), 132-138.
- Méndez Albores, A., & Moreno Martínez, E. (2009). Las micotoxinas: Contaminantes naturales de los alimentos. *Ciencia*, 1-7.
- Michlig, N., Signorini, M., Gaggiotti, M., Chiericatti, C., Basílico, J., Repetti, M., & Beldomenico, H. (2016). Risk factors associated with the presence of aflatoxin M1 in raw bulk milk from Argentina. *Food Control*, 64, 151-156.

- Mohapatra, D., Kumar, S., Kotwaliwale, N., & Kumar Singh, K. (2017). Critical factors responsible for fungi growth in stored food grains and non-Chemical approaches for their control. *Industrial Crops & Products*, 108, 162–182.
- Mousa, W., Ghazali, F., Jinap, S., Ghazali, H., Radu, S., & Salama, A. (2016). Temperature, water activity and gas composition effect on the growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* on paddy. *Journal of Stored Products Research*, 49-55.
- Norma Oficial Mexicana. (1994). *NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos*. México: Secretaría de Salud.
- Oliveira, A., Weinberg, Z., Ogunade, I., Cervantes, A., Arriola, K., Jiang, Y., . . . Adesogan, A. (2017). Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(6), 4587-4603.
- Oplatowska Stachowiak, M., Sajic, N., Xu, Y., A. Haughey, S., Mooney, M., Gong, Y., . . . Elliott, C. (2016). Fast and sensitive aflatoxin B1 and total aflatoxins ELISAs for analysis of peanuts, maize and feed ingredients. *Food Control*, 63, 239e245.
- Osorno Duque, C. (2015). *Estandarización y evaluación de un método para la determinación de micotoxinas por medio de la técnica fotométrica (kit ELISA) a materias primas de avicultura en la industria de alimentos para animales CIPA S.A.* Universidad Tecnológica de Pereira.
- Pankaj, S., Shi, H., & Keener, K. (2018). A review of novel physical and chemical decontamination technologies for aflatoxin in food. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 73–83.
- Paterson, R., & Lima, N. (2010). How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International*, 43, 1902–1914.
- Patriarca, A., & Fernández Pinto, V. (2017). Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. *Current Opinion in Food Science*, 14, 50-60.
- Pérez, J., Gutiérrez, R., Vega, S., Díaz, G., Urbán, G., Coronado, M., & Escobar, A. (2008). Ocurrencia de aflatoxina M1 en leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica producidas y comercializadas en el altiplano mexicano. *SCIELO*.
- Pitt, J. I., & Miscamble, B. F. (1995). Water Relations of *Aspergillus flavus* and Closely Related Species. *Journal of Food Protection*, 7-119.
- Pitt, J., Siantar, D., Trucksess, M., Scott, P., & Herman, E. (2008). Understanding plant–fungus associations as a key to mycotoxin control. *Food Contaminants, ACS Symposium*.
- Rahmani, J., Alipour, S., Miri, A., Fakhri, Y., Riahi, S., Keramati, H., . . . Khaneghah, A. (2018). The prevalence of aflatoxin M1 in milk of Middle East region: A systematic review, meta-analysis and probabilistic health risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 168, 653-666.

- Rico Muñoz, E., Samson, R., & Houbraken, J. (2018). Mould spoilage of foods and beverages: Using the right methodology. *Food Microbiology*, 1-2.
- Rodríguez-Tudela, J. L., & Aviles, P. (1991). Improved adhesive method for microscopic examination of fungi in culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 2604-2605.
- Rojas Contreras, O., & Wilches Flórez, A. (2009). Determinación de aflatoxinas en alimentos de mayor consumo infantil comercializados en la ciudad de Pamplona, norte de Santander. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 7(1).
- Sahin, H., Celik, M., Kotay, S., & Kabak, B. (2016). Aflatoxins in dairy cow feed, raw milk and milk products from Turkey. *Food Additives & Contaminants: Part B*.
- Saladino, F., Bordin, K., Manyes, L., Luciano, F., Mañes, J., Fernández Franzón, M., & Meca, G. (2016). Reduction of the aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Italian piadina by isothiocyanates. *LWT - Food Science and Technology*, 70, 302-308.
- Samson, R., Hoekstra, E., Frisvad, J., & Filtenborg, O. (2000). *Introduction to food-and airborne fungi* (Sixth ed.). Wageningen, The Netherlands: CBS.
- Sanchis, V., Marín, S., & Ramos, A. (2007). Factores determinantes en la producción de micotoxinas. En J. Soriano del Castillo, *Micotoxinas en alimentos* (págs. 75-76). España: Díaz de Santos.
- Sandoval Cañas, G. J. (Junio de 2013). *Determinación de aflatoxinas totales por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*. Quito, Ecuador: Universidad Central del Ecuador. Obtenido de Trabajo de investigación para optar por el grado de Químico de Alimentos. Carrera de Química de Alimentos.
- Signorini, M., Gaggiotti, M., Molineri, A., Chiericatti, C., Zapata de Basílico, M., Basílico, J., & Pisani, M. (2012). Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2), 250-257.
- Soriano del Castillo, J. (2007). *Micotoxinas en Alimentos*. España: Díaz de Santos.
- Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I., . . . Oswald, I. (2012). Current Situation of Mycotoxin Contamination and Co-occurrence in Animal Feed—Focus on Europe. *Toxins*, 4(10), 788-809.
- Stroka, J., & Anklam, E. (2000). Development of a simplified densitometer for the determination of aflatoxins by thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 904(2), 263-268.
- Toral Flores, A. M. (2010). Introducción. En A. M. Toral Flores, *Evaluación de la contaminación por aflatoxinas en alimentos para bovinos y aflatoxina M1 en leche cruda y quesos producidos en la región de los Altos y Ciénega, Jalisco* (pág. 12). Guadalajara, México: Universidad de Guadalajara.
- Torres, G., Arbaiza, T., Carcelén, F., & Orlando, L. (2009). Comparación de las técnicas in situ, in vitro y enzimática (celulasa) para estimar la digestibilidad de forrajes en ovinos. *Rev Inv Vet Perú*, 20(1), 5-9.

- Trabattoni, E. (2016). Efecto de los hongos (micotoxinas) en granos, alimentos y forrajes destinados al consumo animal. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1-75.
- Turner, N., Bramhmbhatt, H., Szabo Vezse, M., Poma, A., Coker, R., & Piletsky, S. (2015). Analytical methods for determination of mycotoxins: An update Analytical methods for determination of mycotoxins: An update. *Analytica Chimica Acta*, 901, 12-33.
- Urbán, G., Pérez, J., Martínez, F., Salas, J., Díaz, G., Ramírez, M. L., . . . Escobar, A. (2009). Niveles de aflatoxina M1 en quesos frescos producidos en diferentes zonas de México. *SCIELO*.
- Van Asselt, E., Azambuja, W., Kastelein, P., De Rijk, T., Stratakou, I., & Van Der Fels Klerx, H. (2012). A Dutch field survey on fungal infection and mycotoxin concentrations in maize. *Food & Control*, 29(10), 1556-1565.
- Vázquez Santa, M. P. (2006). *Evaluación de aflatoxinas en suplementos para vacas lecheras en la sabana de Bogotá, y su relación con la aflatoxina M1 en leche*. Bogotá: Univesidad de la Salle.
- Vázquez Zenteno, J. A. (2014). *Contaminación con aflatoxinas en leche cruda y alimento de Vaca Suizo Americano en la zona centro de Chiapas*. Colegio de posgraduados. Obtenido de Colegio de Postgraduados: http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/10521/2350/1/Vazquez_Zenteno_JA_MC_Ganaderia_2014.pdf
- Villa, R., & Hurtado, J. (2016). Evaluación nutricional de diferentes ensilajes para alimentar conejos. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 33(2), 76-83.
- Von Arx, J. A. (1981). *The genera of fungi sporulating in pure culture, 3rd. edition*. Vaduz, Germany: Cramer, J.
- Wambacq, E., Vanhoutte, I., Audenaert, K., De Gelder, L., & Haesaert, G. (2016). Occurrence, prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: a review. *Journal Scientific of Food Agriculture*, 96, 2284–2302.
- Wang, B., Mahoney, N., Pan, Z., Khir, R., Wu, B., Ma, H., & Zhao, L. (2016). Effectiveness of pulsed light treatment for degradation and detoxification of aflatoxin B1 and B2 in rough rice and rice bran. *Food Control*, 59, 461-467.
- Wang, X., Niessner, R., Tang, D., & Knopp, D. (2016). Nanoparticle-based immunosensors and immunoassays for aflatoxins. *Analytica Chimica Acta*, 912, 10-23.
- Wawrzyniak, J., Waskiewicz, A., & Ryniecki, A. (2018). Evaluation of critical points of mould growth and mycotoxin production in the stored barley ecosystem with a hazardous initial microbiological state of grain. *Journal of Stored Products Research*, 77, 166-176.
- Whitlow, L., & Hagler, w. (3 de Octubre de 2002). Mold and Mycotoxin Issues in Dairy Cattle: Effects, Prevention and Treatment. *Extension*, 1-32.

- 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.
- Yu, J. (2012). Current Understanding Aflatoxin Biosynthesis and Future Perspective in Reducing Aflatoxin Contamination. *Toxins*, 1024 - 1057.
- Zachariasova, M., Dzuman, Z., Veprikova, Z., Hajkova, K., Jiru, M., Vaclavikova, 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.
- Zhang, Z., Hu, X., Zhanga, Q., & Li, P. (2016). Determination for multiple mycotoxins in agricultural products using HPLC–MS/MS via a multiple antibody immunoaffinity column. *Journal of Chromatography B*, 1021, 145–152.