



Junta de Andalucía
Consejería de Agricultura, Ganadería,
Pesca y Desarrollo Sostenible
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
Y FORMACIÓN AGRARIA Y PESQUERA



Grado en Biología.

Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla.

USO DE TÉCNICAS NO DESTRUCTIVAS Y CONTROL BIOLÓGICO EN LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE HONGOS MICOTOXIGÉNICOS EN MAÍZ.

Autora: María Cantarero Lerate.

Tutoras:

Ana Aguado Puig. Dpto. Biotecnología Vegetal. IFAPA “Las Torres”.

María Rosario Álvarez Morales. Dpto. de Biología Vegetal y Ecología. Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

Fecha: Junio, 2023.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. El maíz.....	2
2.2. Infección causada por <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i>	2
2.3. Las bacterias como control biológico.....	3
2.4. El uso de la termografía para la detección de hongos.....	4
2.5. El uso de luz ultravioleta para la detección de aflatoxinas.....	4
3. OBJETIVOS	5
4. MATERIALES Y MÉTODOS	5
4.1. Incidencia de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i> en granos de maíz naturalmente infectado.....	5
4.1.1. Obtención de material fúngico.....	6
4.1.2. Incidencia y severidad de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i> en granos de maíz con distinta sintomatología.....	6
4.2. Detección de las distintas cepas de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i> procedentes de maíz naturalmente infectado procedente de parcelas de ensayo ubicadas en Alcalá del Río (Sevilla).....	7
4.2.1. Identificación morfológica y al microscopio óptico de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i>	7
4.2.2. Identificación molecular de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i>	8
4.3. Detección de las distintas cepas aflatoxigénicas y atoxigénicas de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i> procedentes de campo de maíz de parcelas de ensayo ubicadas en Alcalá del Río (Sevilla).....	9

4.4.	Efecto fungicida y/o fungiestático del uso de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y la bacteria AA (procedentes de cultivo de arándano) frente a <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i>	9
4.5.	Estudio de las variaciones de temperatura por la presencia de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i> en granos de maíz mediante termografía.....	9
4.5.1.	Material vegetal y condiciones del cultivo.....	10
4.5.2.	Preparación del inóculo de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	10
4.5.3.	Inoculación de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	10
4.5.4.	Preparación del inóculo de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i>	10
4.5.5.	Inoculación de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i>	11
4.5.6.	Medida de la termografía en el ensayo.....	11
4.6.	Incidencia y severidad de aflatoxinas mediante el uso de luz UV en granos inoculados con <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i> en presencia o en ausencia de la bacteria <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	11
4.7.	Análisis estadísticos.....	12
5.	RESULTADOS	12
5.1.	Incidencia y severidad de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i> en granos de maíz naturalmente infectado.....	12
5.1.1.	Identificación morfológica de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i>	13
5.1.2.	Identificación molecular de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i>	13
5.2.	Detección de las distintas cepas aflatoxigénicas y atoxigénicas de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i> procedentes de campo de maíz de parcelas de ensayo ubicadas en Alcalá del Río (Sevilla).....	14

5.3. Efecto fungicida y/o fungiestático del uso de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y la bacteria AA frente a <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i>	15
5.4. Variaciones de temperatura por la presencia de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i> en granos de maíz mediante termografía.....	17
5.5. Incidencia y severidad de aflatoxinas mediante el uso de luz UV en granos inoculados con <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i> solos y con control biológico con <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	18
5.6. Relación entre la termografía y la incidencia y severidad de la fluorescencia emitida en presencia de la luz UV debido a la presencia de aflatoxinas.....	20
6. DISCUSIÓN	21
7. CONCLUSIONES	23
8. AGRADECIMIENTOS	24
9. BIBLIOGRAFÍA	24

1. RESUMEN.

Las aflatoxinas son sustancias tóxicas (inmunodepresoras y carcinogénicas) producidas principalmente por hongos del género *Aspergillus*, concretamente de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Por tanto, es importante conocer la situación del grado de infección de estos hongos en maíz naturalmente infectados de la provincia de Sevilla y su contaminación en aflatoxinas. En este sentido, se observó que en todas las sintomatologías de los granos (color rosa, oscuro y verde) estaban presentes ambos hongos, siendo la incidencia de *A. flavus* superior a la de *A. parasiticus*. Los ensayos realizados para detectar las cepas aflatoxigénicas y las atoxigénicas, caracterizadas por la emisión de fluorescencia en la luz UV a 365 nm en el caso de las cepas aflatoxigénicas, permitió conocer que las cepas atoxigénicas son las más representativas del total de los aislados de estos hongos.

La identificación y diferenciación entre ambas especies se llevó a cabo mediante su crecimiento en placa, la morfología de sus conidias al microscopio óptico (MO) y la detección en PCR a tiempo real con sondas específicas para cada especie diseñadas en la región del gen de la calmodulina. Se observó que todas las técnicas permitían una rápida y clara identificación y en concreto la PCR a tiempo real mostró una detección de valores de 10^{-2} y 10^{-4} ng de ADN de *A. parasiticus* y *A. flavus* respectivamente.

Como medida de control de estos hongos se realizó un ensayo de control biológico con dos bacterias, una de ellas identificada como *Bacillus amyloliquefaciens* y la otra sin identificar (AA). Los resultados mostraron que ambas tenían una significativa capacidad fungiestática de ambos hongos y, además, *B. amyloliquefaciens* también presentó la capacidad de inhibir la producción de aflatoxinas por parte de estos hongos. En este ensayo de control biológico se usaron técnicas no destructivas para detectar la presencia del hongo, la termografía y la producción de aflatoxinas por fluorescencia. En los resultados se observó que la presencia de *B. amyloliquefaciens* y la de los hongos (*A. flavus* y *A. parasiticus*) aumenta y reduce la temperatura de los granos de maíz respectivamente. Ambas técnicas, termografía y emisión de fluorescencia por UV, mostraron una altamente significativa y negativa correlación entre ellas a los 11 después de la inoculación (dpi) de los hongos.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1.El maíz.

El maíz (*Zea mays L.*) es una planta herbácea de la familia de las gramíneas que se cultiva por sus granos comestibles. Es uno de los cereales más importantes del mundo, junto con el trigo y el arroz, y se utiliza tanto para la alimentación humana como animal, así como para la producción de biocombustibles, almidón, aceite y otros derivados industriales. Se originó en América, donde fue domesticado por las civilizaciones precolombinas hace unos 10.000 años. Desde allí se difundió a Europa tras el descubrimiento de América y luego al resto del mundo. Es considerado un cultivo muy versátil que permite obtener una gran variedad de productos alimenticios, como harina, tortillas, arepas, pan, palomitas, cereales de desayuno, jarabe, cerveza y whisky. Además, el maíz se utiliza como forraje para el ganado vacuno, porcino, avícola y piscícola, y como materia prima para la elaboración de etanol, plásticos biodegradables, papel y cosméticos. En Andalucía se produce entre el 5% y el 10% del total de la producción nacional (1).

2.2.Infección causada por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*.

El maíz es un cultivo susceptible a la infección por hongos del género *Aspergillus*, entre los que destacan las especies *A. flavus* y *A. parasiticus*. Estos hongos crecen en el suelo, la vegetación en descomposición, el heno y los cereales, y pueden contaminar el grano de maíz durante el cultivo, la cosecha o el almacenamiento. Los factores que favorecen su desarrollo son las condiciones de sequía, calor y estrés hídrico en la planta, así como las heridas causadas por insectos o daños mecánicos (2).

Las especies más importantes desde el punto de vista toxicológico son *A. flavus* y *A. parasiticus*, que producen principalmente aflatoxinas B1, B2 G1 y G2 (3). Estas aflatoxinas son metabolitos secundarios que tienen una estructura química de tipo difuranocumarina y que poseen una elevada actividad carcinogénica, especialmente la aflatoxina B1, que es la más abundante y tóxica (4).

La contaminación por aflatoxinas es considerada como uno de los principales problemas de seguridad alimentaria a nivel mundial. Según la normativa europea el contenido máximo de aflatoxinas B1 en maíz y arroz para el consumo humano está en 5 ppb. El contenido máximo permitido para el conjunto de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 está en 10 ppb. En el caso de alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad el contenido máximo permitido de aflatoxina B1 es de 0,1 ppb. Del mismo modo, la comunidad europea establece unos niveles máximos de aflatoxinas en piensos y materias primas para la alimentación animal de 20 ppb. La aflatoxina B1 es metabolizada por las vacas y excretada en la leche en forma de aflatoxina M1, siendo el nivel máximo permitido en la leche y derivados de 0,05 ppb (5).

Las cepas aflatoxigénicas de *A. flavus* generalmente producen solo aflatoxina B1 y B2, mientras que las de *A. parasiticus*, producen aflatoxinas B1, B2, G1 y G2. (6). La aflatoxina B1, es la más frecuente y tóxica (7).

Debido a la capacidad de producir aflatoxinas, la infección por *A. flavus* y *A. parasiticus* tiene consecuencias negativas para la calidad y la seguridad del maíz. Estas sustancias pueden causar efectos agudos como intoxicación, vómitos, hemorragias y necrosis hepática, o efectos crónicos como inmunosupresión, cáncer de hígado y malnutrición. La exposición a las aflatoxinas puede ocurrir al consumir directamente el maíz contaminado o al ingerir productos derivados de animales que se han alimentado con dicho maíz, como leche, carne o huevos (8).

2.3.Las bacterias como control biológico.

Las bacterias son microorganismos que pueden actuar como agentes de control biológico de plagas y enfermedades en las plantas. El control biológico permite utilizar organismos vivos para reducir las poblaciones de otro organismo que causa daños en los cultivos. El control biológico presenta ventajas como la selectividad, la persistencia y la seguridad ambiental y humana (9).

El uso de bacterias como control biológico requiere un conocimiento profundo de su biología, su modo de acción y su interacción con el agroecosistema. Además, se debe considerar la bioseguridad agrícola, es decir, el impacto que pueden tener las bacterias sobre la salud humana y las comunidades microbianas del suelo y las plantas. Por ello, se

deben seleccionar cepas que no sean patógenas ni invasoras, y que tengan una actividad específica contra el organismo objetivo (10,11).

Entre las bacterias más utilizadas para el control biológico se encuentra el género *Bacillus*, que tiene la capacidad de producir conidias y toxinas que afectan a distintos grupos de insectos y a algunos hongos (12).

2.4.El uso de la termografía para la detección de hongos.

Las enfermedades de las plantas inducidas por patógenos como virus, bacterias y hongos son responsables de importantes pérdidas económicas en la agricultura a nivel mundial. La detección temprana de patógenos es esencial para reducir la propagación de enfermedades y facilitar las prácticas de protección de plantas. La temperatura es uno de los parámetros ambientales más importantes que condicionan el crecimiento y la supervivencia de las plantas. La termografía es una técnica que permite medir la temperatura superficial de los objetos mediante el registro de la radiación infrarroja que emiten. Esta radiación depende de la temperatura y de la emisividad del material, que es una propiedad que indica su capacidad para emitir energía térmica. Además, se puede aplicar a la detección de las aflatoxinas porque los hongos que las producen modifican la emisividad de los granos o frutos secos que infectan, provocando un cambio en su temperatura superficial (13).

Esta técnica se ha utilizado en el análisis de muchas infecciones fúngicas, bacterianas y víricas que atacan las partes aéreas de las plantas. Según estudios como el de Barón et al. 2016, muestran como el desarrollo de hongos provocó una bajada de temperatura mientras que la actividad bacteriana provocó una subida de esta. (14).

2.5.El uso de luz ultravioleta para la detección de aflatoxinas.

Algunas de las aflatoxinas más importantes son las aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 y M2 (15). Estas aflatoxinas pueden estar presentes en cereales, frutos secos, especias, frutas desecadas y productos lácteos, entre otros (16).

La luz ultravioleta (UV) es una radiación electromagnética que tiene una longitud de onda más corta que la luz visible y que puede provocar fluorescencia en algunas sustancias

(17). La fluorescencia es un fenómeno por el cual un material absorbe radiación electromagnética y luego emite otra radiación con una longitud de onda mayor. La luz UV se puede aplicar a la detección de las aflatoxinas porque estas sustancias presentan una fluorescencia azul-verdosa cuando se iluminan con luz UV a 365 nm (18). La nomenclatura hace referencia a sus propiedades físico – químicas, ya que las de tipo B presentan fluorescencia azul (blue) y las de tipo G fluorescencia verde (green) cuando se les observa bajo luz ultravioleta a 365 nm (7).

3. OBJETIVOS.

Los objetivos del estudio son:

1. Conocer la incidencia y severidad de *A. flavus* y *A. parasiticus* en granos de maíz naturalmente infectado con distinta sintomatología basada en la coloración de los granos (verde, rosa y oscura).
2. Detección e identificación de las distintas cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* procedentes de maíz naturalmente infectado procedente de parcelas de ensayo ubicadas en el término de Alcalá del Río, término municipal de la provincia de Sevilla.
3. Detección de la incidencia de cepas aflatoxigénicas y atoxigénicas de las cepas aisladas en el objetivo 2.
4. Estudiar el efecto fungicida y/o fungistáticos del uso de *Bacillus amyloliquefaciens* y la bacteria AA frente a *A. flavus* y *A. parasiticus*.
5. Estudiar las variaciones de temperatura por la presencia de *A. flavus* y *A. parasiticus*, ambos aflatoxigénicos, en granos de maíz mediante termografía.
6. Conocer la incidencia y severidad de aflatoxinas mediante el uso de luz UV en granos inoculados con *A. flavus* y *A. parasiticus* solos y con la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* como control biológico.
7. Conocer la relación entre las técnicas no destructivas (termografía y UV).

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Incidencia de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* en granos de maíz naturalmente infectado.

4.1.1. Obtención de material fúngico.

Para la obtención de los hongos, se seleccionaron aquellas mazorcas infectadas de ensayos de la Red Andaluza de Experimentación Agraria (RAEA) cultivadas en el Centro IFAPA Las Torres, en Alcalá del Río (Sevilla), con granos posiblemente infectados con *Aspergillus* y que presentaban diferente sintomatología en el color, clasificándolo como verdes, rosas y oscuros (Fig. 1A, 1B y 1C). Conociendo esta clasificación se seleccionaron 12 granos de cada tipo. Se desinfectaron de forma superficial durante 1 minuto en lejía al 20%, posteriormente se enjuagaron en agua destilada estéril y se secaron depositándolos sobre papel secante. Una vez terminada la desinfección de los granos, se sembraron en potato dextrosa agar (PDA) y se dejaron en el incubador a 28°C durante una semana. Transcurrido este tiempo, se aislaron los distintos hongos crecidos y se volvieron a cultivar en nuevas placas con PDA a 28°C, para su aislamiento. Los cultivos puros de los distintos hongos fueron identificados morfológica y molecularmente.



Figura 1A. Granos de color rosa.



Figura 1B. Granos de color oscuro.



Figura 1C. Granos de color verde.

4.1.2. Incidencia y severidad de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* en granos de maíz con distinta sintomatología.

Se calculó la incidencia de *Aspergillus* sp. en los granos como porcentaje de granos en los que se había aislado estos hongos respecto al total de granos. La identificación de los hongos se realizó por sus características de crecimiento macroscópicas (color verdoso purulento claro en *A. flavus* y oscuro en *A. parasiticus* y crecimiento irregular en la placa); por la morfología de sus conidias al microscopio óptico (MO), conidias lisas de *A. flavus* y rugosas de *A. parasiticus* y por PCR a tiempo real con sondas FAM y VIC específica de *A. flavus* y *A. parasiticus* respectivamente.

La severidad se calculó como el número de cepas de estos hongos aisladas por cada grano y se valoró mediante una escala representada en la Tabla 1.

Tabla 1. Número de escala para la estimación de la severidad.

Nº escala	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nº cepas aisladas por grano	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

4.2. Detección de las distintas cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* procedentes de maíz naturalmente infectado procedente de parcelas de ensayo ubicadas en Alcalá del Río (Sevilla).

4.2.1. Identificación morfológica y al microscopio óptico de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*.

La primera identificación se realizó mediante la observación visual de los hongos en crecimiento en PDA, destacando que el color verde de las colonias de *A. flavus* es más claro que el de *A. parasiticus*. Posteriormente se realizó una identificación en el MO basada en la morfología de las conidias, ya que las de *A. flavus* tienen una pared lisa y las de *A. parasiticus* presenta rugosidad (Fig. 2, 3 y 4).



Figura 2. Imagen microscópica de las conidias de *A. flavus*.



Figura 3. Imagen microscópica de las conidias de *A. parasiticus*.

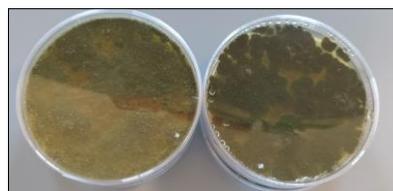


Figura 4. Imagen del crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* en medio PDA

4.2.2 Identificación molecular de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*.

Para la identificación molecular, se realizó previamente una extracción de ADN directa, mediante el raspado del micelio de cada una de las muestras, las cuales fueron introducidas en un tubo de 0,2 mL, se les añadió 20 µL de NaOH 25 mM y pH 12,7 y se calentó a 100°C durante 10 minutos y luego a 4°C durante 5 minutos. Una vez enfriadas las muestras, se le añadió 40 µL de HCl 40 mM y se llevaron a cabo diluciones 1:10 y 1:100, que se utilizarán como ADN molde en la PCR. Las soluciones de trabajo para la identificación de *A. flavus* y *A. parasiticus* se muestra en las Tabla 2 y 3 respectivamente.

Tabla 2. Solución de trabajo para la PCR a tiempo real para la identificación de *A. flavus*.
 Tabla 3. Solución de trabajo para la PCR a tiempo real para la identificación de *A. parasiticus*.

Reactivos	Concentración (µM)	Volumen (µL)
H ₂ O		1,5
Sensimix 2x	1x	10
Primer ASP-F 10µM	0,6	1,2
Primer ASP-R 10µM	0,6	1,2
Sonda FAM -Af-LNA-P 5µM	0,25	1
BSA (200x)	1X	0,1
Muestra		5
Total		20

Reactivos	Concentración (µM)	Cantidad (µL)
H ₂ O		1,5
Sensimix 2x	1x	10
Primer ASP-F 10µM	0,6	1,2
Primer ASP-R 10µM	0,6	1,2
Sonda VIC-Ap-LNA-P 5µM	0,25	1
BSA (200x)	1X	0,1
Muestra		5
Total		20

Además, se ha llevado a cabo el empleo de sondas específicas para el gen de la calmodulina llamadas FAM y VIC para la PCR a tiempo real, siendo FAM para *A. flavus* y VIC para *A. parasiticus*.

El termociclador a tiempo real es de la marca Bio Rad y el modelo es CFX Connect Real-Time System. Las condiciones de esta PCR a tiempo real son 95°C durante 5 minutos, seguido de 49 ciclos a 95°C durante 5 segundos y 60 °C durante 40 segundos.

4.3. Detección de las distintas cepas aflatoxigénicas y atoxigénicas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* procedentes de campo de maíz de parcelas de ensayo ubicadas en Alcalá del Río (Sevilla).

En este estudio se utilizó un medio de cultivo a base de leche de coco en polvo (10% CCMPA) según Gupta et al. en 2022 para determinar la capacidad de producción de aflatoxinas en cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Las cepas aflatoxigénicas producen fluorescencia en este medio, mientras que las atoxigénicas no lo hacen (19).

4.4. Efecto fungicida y/o fungiestático del uso de *Bacillus amyloliquefaciens* y la bacteria AA (procedente de cultivo de arándano) frente a *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*.

Para evaluar la actividad antifúngica de la bacteria, se realizó un ensayo in vitro en medio de cultivo Agar Triptona-Soja (TSA). Se inoculó un disco de micelio del hongo en el centro de la placa y cuatro gotas de 5 µL de bacteria en los extremos de la placa procedentes del crecimiento en medio líquido Tryptic Soy Broth (TSB) durante 24 horas a 28°C. Los hongos patógenos evaluados fueron *A. flavus* y *A. parasiticus*. Se prepararon 12 placas por cada hongo con la bacteria (3 repeticiones de 4 placas cada una) y 7 placas por cada hongo sin bacteria como control. Se incubaron durante 7 días a 28°C.

La actividad antifúngica y/o fungiestática se valoró como el porcentaje de inhibición de la bacteria y se calculó con la siguiente fórmula a los 7 días de crecimiento:

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \frac{D1 - D2}{D1} \times 100$$

D1: Diámetro colonia del patógeno en las placas control.

D2: Diámetro de las placas donde se enfrentaron las cepas bacterianas con los hongos.

4.5. Estudio de las variaciones de temperatura por la presencia de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* en granos de maíz mediante termografía.

4.5.1. Material vegetal y condiciones del cultivo.

El material vegetal empleado fue maíz (*Zea mays* L. híbrido MAS 68K). Los granos se desinfectaron siguiendo el protocolo de Aguado et al. 2019 (20).

El diseño experimental consistió en un total de 6 tratamientos y 4 repeticiones por tratamiento. Cada repetición consistió en 2 placas de Petri cuadradas con 40 granos cada una. Los granos se desinfectaron según el método descrito en el apartado 3.4.1 y se sometieron al tratamiento correspondiente.

4.5.2. Preparación del inóculo de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Para la preparación del inóculo bacteriano, se sembró la bacteria que se encontraba congelada en un tubo criogénico conservado en una solución de peptona (0,5%) y glicerol (15%) a -80°C, en placas con medio TSA y se incubó a 28°C. Se seleccionaron las colonias más desarrolladas y se inocularon en medio líquido TSB. Se incubó nuevamente a 28°C con agitación continua (180 rpm) durante 24 horas hasta alcanzar una concentración final de 10⁸ ufc/mL. Para la inoculación en material vegetal, se centrifugó el cultivo a 12000 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento bacteriano en 10 mL de tampón sulfato magnésico heptahidratado 0,03M.

4.5.3. Inoculación de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Con el inóculo bacteriano preparado, se inoculó una gota de 5 µL a los granos de maíz del ensayo descrito en el apartado 4.5.1. La inoculación bacteriana se realizó 24 h antes que la inoculación fúngica.

4.5.4. Preparación del inóculo de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*.

Después de 24 horas de la inoculación bacteriana en los granos, se preparó el inóculo fúngico. Se utilizaron las cepas aflatoxigénicas de *A. flavus* y *A. parasiticus* identificadas y seleccionadas según el apartado 4.3. Para igualar la concentración de conidias de ambos hongos, se procedió de la siguiente manera: se añadió 10 mL de agua destilada estéril a cada placa con los hongos en medio PDA y se raspó con un bisturí estéril. Se filtró la

suspensión por gasas en un matraz esterilizado y se contó el número de conidias con un hematocitómetro neubauer. Se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una concentración final de 10^6 conidias/mL en los dos hongos.

4.5.5. Inoculación de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*.

Con el inóculo fúngico preparado en el apartado 4.5.4., se procedió a inocular una gota en cada grano de 5 μ L al ensayo descrito en el apartado 4.5.1.

4.5.6. Medida de la termografía en el ensayo.

Se realizan fotos con la cámara termográfica de la marca FLIR y el modelo E5 WIFI. Se trata de una cámara de mano tipo pistola. Esta cámara permite medir la temperatura en cada píxel y tiene mayor precisión que los termómetros láser de infrarrojos. Se registraron imágenes termográficas todos los días posibles durante un mes para evaluar las variaciones de temperatura en los diferentes tratamientos.

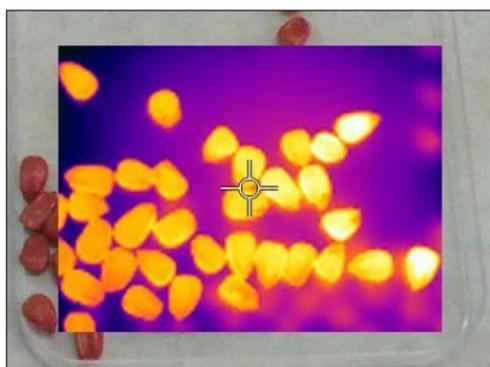


Figura 5. Imagen termográfica de los granos de maíz infectados.

4.6. Incidencia y severidad de aflatoxinas mediante el uso de luz UV a 365 nm en granos inoculados con *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* en presencia o en ausencia de la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens*.

Se determinó la presencia o ausencia de aflatoxinas en cada placa del ensayo mediante una lámpara de luz UV de la marca Lechnical. Paralelamente a la evaluación por termografía, se evaluó la incidencia y la severidad de fluorescencia en los granos de los distintos tratamientos durante un mes.

Se estudiaron dos variables, la incidencia y la severidad. La incidencia como el número de placas en las que hay emisión de fluorescencia y se cuantificó como un porcentaje del total de placas. La severidad es una estimación visual o cuantitativa del grado de afectación de los granos o el aumento de estos dentro de cada placa a lo largo del tiempo y se evaluó con una escala (Tabla 2).

Tabla 2. Número de escala por número de granos que emiten fluorescencia.

Nº escala	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nº granos que emiten fluorescencia	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

4.7. Análisis estadísticos.

Se realizó el análisis estadístico de los datos con el programa *Stadistix 8.1*. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para comparar los tratamientos y un test de la Mínima Diferencia Significativa (MSD) para evaluar las diferencias entre las medias. A los resultados en porcentaje se le aplicó antes de su análisis estadístico la transformación del $\arcsen(N/\sqrt{R})$. Donde N es el valor en % y R el número de repeticiones. Para conocer si hay una relación entre la termografía y la incidencia y severidad de la emisión de fluorescencia por la presencia de las aflatoxinas producidas por los hongos, se realizó un estudio del coeficiente de correlación de Pearson entre estos parámetros en los diferentes momentos de análisis.

5. RESULTADOS.

5.1. Incidencia y severidad de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* en granos de maíz naturalmente infectado.

Aunque la incidencia de *Aspergillus* sp. de crecimiento verde purulento en granos de maíz no mostró variaciones significativas según la sintomatología de los granos, se observa un gran aumento de cepas de este hongo en los granos verdes (Fig. 6).

En el estudio de la severidad sen los granos afectados si hay diferencias significativas, siendo los granos verdes los que presentan mayor número de cepas de *Aspergillus* sp. (Fig. 7).

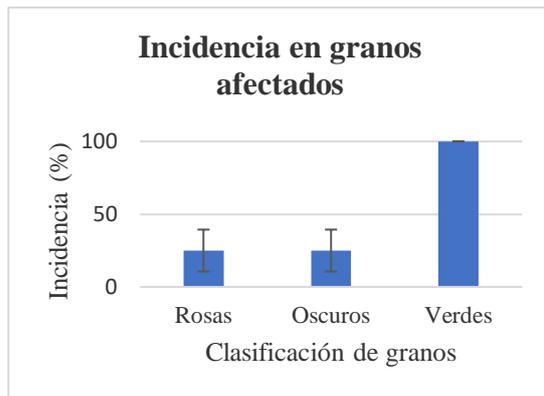


Figura 6. Incidencia de *Aspergillus* sp. en granos con distinta sintomatología de color (verdes, rosas y oscuros). Las barras indican el error típico de tipo distinto de grano.

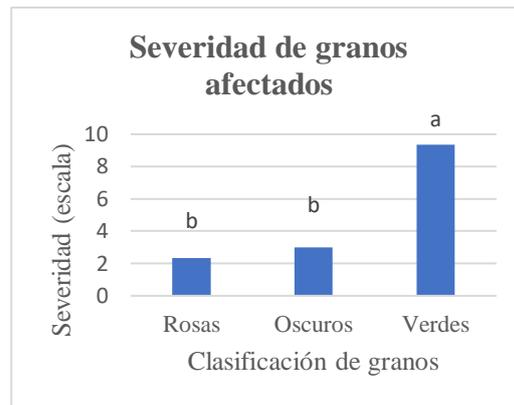


Figura 7. Severidad de *Aspergillus* sp. de granos con distinta sintomatología de color (verdes, rosas y oscuros). Las letras indican diferencia significativa con $P < 0,05$.

5.1.1. Identificación morfológica de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*.

En la identificación macroscópica se observó que la placa de *A. parasiticus* mostró un color verde más oscuros que la de *A. flavus* (Fig.4).

Al MO, *A. flavus* y *A. parasiticus* presentan diferencias morfológicas. Las conidias de *A. parasiticus* se caracterizan por tener una rugosidad en su pared y un color verde más oscuro. Las conidias de *A. flavus* no mostraron rugosidad (Fig. 2 y 3).

Los estudios morfológicos mediante la observación al MO de la estructura de las conidias, así como la identificación macroscópica de crecimiento en placa coincidieron en la identificación de las cepas obtenidas.

5.1.2. Identificación molecular de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*.

La PCR realizada con la sonda FAM solo amplifica el ADN procedente de las cepas identificadas previamente por su morfología como de *A. flavus* así como el ADN de *A. flavus* utilizado para la recta de calibración, no amplificando ni las cepas de *A. parasiticus* ni los ADN de este hongo utilizados en la recta de calibración (Fig. 8). El mismo resultado se obtuvo para *A. parasiticus* con la sonda VIC (Fig. 9), sugiriendo estos resultados una alta especificidad en la detección y diferenciación de estas dos especies de *Aspergillus*.

La sensibilidad de las sondas FAM y VIC es muy alta, ya que pueden detectar cantidades muy pequeñas de ADN de estas dos especies de *Aspergillus*. La sonda FAM puede detectar hasta 10^{-4} ng de ADN de *A. flavus* y la sonda VIC puede detectar 10^{-2} ng de ADN de *A. parasiticus*.

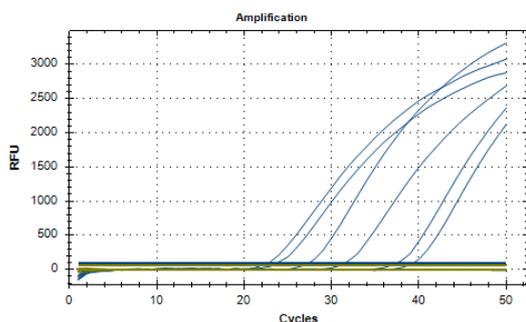


Figura 8. PCR a tiempo real de la sonda FAM empleada para determinar *A. flavus*.

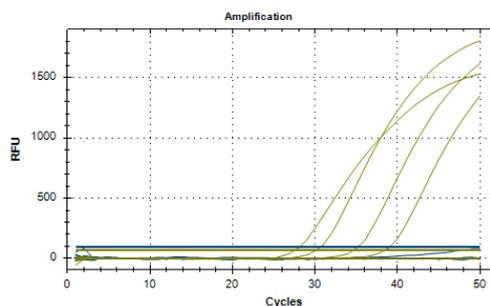


Figura 9. PCR a tiempo real de la sonda VIC empleada para determinar *A. parasiticus*.

En general, la identificación de las 31 cepas de *Aspergillus* sp. como *A. flavus* o *A. parasiticus* coincide en las tres técnicas, morfológica basada en el crecimiento en PDA, morfológica de las conidias al MO y molecular con las sondas específicas FAM y VIC. De las 31 muestras analizadas, sólo una cepa se identificó como *A. parasiticus*, mientras que el resto corresponden a *A. flavus*, indicando que solo el 3,22% de los hongos verdes purulentos aislados corresponde a *A. parasiticus* y que el 96,77% es *A. flavus*.

5.2. Detección de las distintas cepas aflatoxigénicas y atoxigénicas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* procedentes de campo de maíz de parcelas de ensayo ubicadas en Alcalá del Río (Sevilla).

El medio de coco utilizado en el estudio proporcionó información valiosa para la identificación de cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* como productoras de aflatoxinas o no. Esto permitió seleccionar para el estudio aquellas cepas que producen estas toxinas de las que no la producen.

La obtención de los resultados fue sencilla gracias al uso de luz UV, lo que permitió no solo identificar las cepas aflatoxigénicas, sino también observar la coloración emitida por las distintas micotoxinas. Se apreció que las cepas de *A. flavus* presentaban fluorescencia

azul debido a la producción de aflatoxinas B1 y B2, mientras que en *A. parasiticus* se observó fluorescencia verde debido a la producción de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2.

La cepa de *A. parasiticus* obtenida era aflatoxigénica observándose una fluorescencia amarillo verdoso.

De las 30 cepas de *A. flavus*, sólo 4 emitieron fluorescencia siendo aflatoxigénica un 13,3%. El 86,7% restante no mostraron fluorescencia considerándose como atoxigénicas con un potencial uso como control biológico.

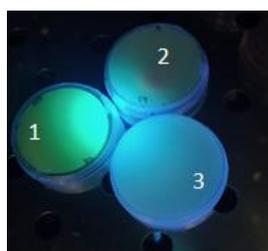


Figura 10A. Fluorescencia emitida por las cepas aflatoxigénicas de *A. parasiticus* (1) y *A. flavus* (2) con respecto al control (3).



Figura 10B. Fluorescencia emitida en mazorca de maíz mediante luz UV por presencia de aflatoxinas.

5.3. Efecto fungicida y/o fungiestático del uso de *Bacillus amyloliquefaciens* y la bacteria AA frente a *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*.

Un efecto fungicida es aquel que elimina a los hongos y sus esporas. Por otro lado, un efecto fungiestático es aquel que inhibe el crecimiento y desarrollo de los hongos o la germinación de sus esporas.

Por tanto, no se observa actividad fungicida, ya que los hongos tienen crecimiento, pero sí se detecta actividad fungiestática (Fig. 11A y 11B).

En el ANOVA se observa que hay diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de las dos bacterias en estudio frente a los dos hongos (*A. flavus* y *A. parasiticus*). También es significativa la interacción entre las bacterias y los hongos (Tabla 3), por ello se realizan ANOVAS independientes de cada una de las bacterias con los dos hongos. Las diferencias son significativas y están representadas en las figuras 11A y 11B.

Tabla 3. ANOVA del % inhibición de las bacterias *B. amyloliquefaciens* y AA frente a *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	P
Bacteria	1	6.03E-01	75,54	0,0001
Hongo	1	2.68E-01	33,64	0,0012
Réplica	2	5.84E-03	0,73	0,5194
Bacteria x hongo	1	1.58E-01	19,76	0,0044
Error	6	7.98E-03		
Total	11			

En el caso de *B. amyloliquefaciens*, en ambos enfrentamientos se observó un porcentaje de inhibición superior al 60%. El porcentaje de inhibición de la bacteria AA fue menor del 50% y por tanto menor que el de *B. amyloliquefaciens*. En ambos casos, es *A. parasiticus* el hongo más afectado por la presencia de ambas bacterias. Se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición de los distintos hongos (Figura 11A y 11B).

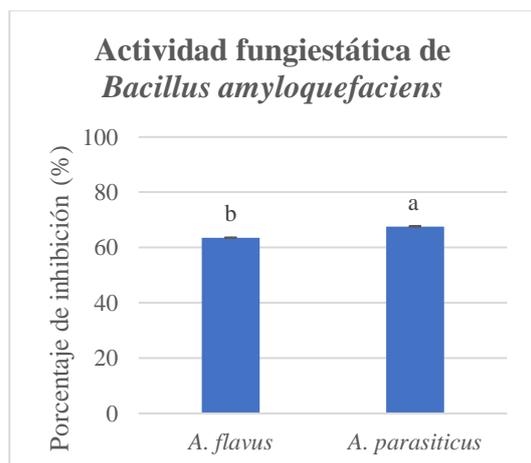


Figura 11A. Porcentaje de inhibición de *Bacillus amyloliquefaciens* sobre el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* tras 7 días de cultivo. Las distintas letras indican diferencia significativa con $P < 0.05$.

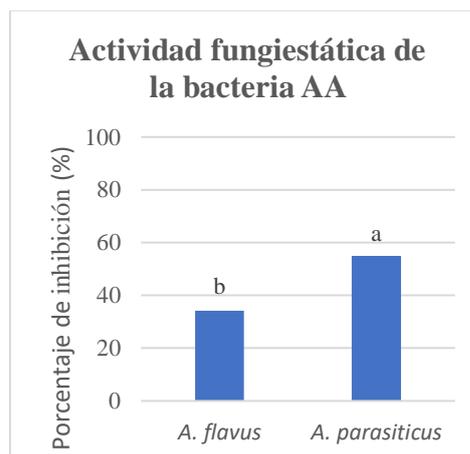


Figura 11B. Porcentaje de inhibición de la bacteria AA sobre el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* tras 7 días de cultivo. Las distintas letras indican diferencia significativa con $P < 0.05$.

5.4. Variaciones de temperatura por la presencia de *A. flavus* y *A. parasiticus* en granos de maíz mediante termografía.

La termografía es una técnica no destructiva que permite analizar la misma muestra a lo largo del tiempo.

En los resultados se observa a lo largo del tiempo cambios significativos de temperatura en los distintos tratamientos, aumentando la significación a partir del séptimo día después de la inoculación ($P < 0.0001$). Los tratamientos con la bacteria presentan temperaturas significativamente superiores al control. A partir del día 19 después de la inoculación (dpi), los tratamientos con bacteria siguen presentando una temperatura superior al control y los tratamientos con los hongos una temperatura significativamente inferior al mismo. Estos resultados indican que, para detectar la presencia de hongos o bacterias o bacterias con hongos, se podría realizar pruebas termográficas a partir de los 19 dpi (Fig. 12).

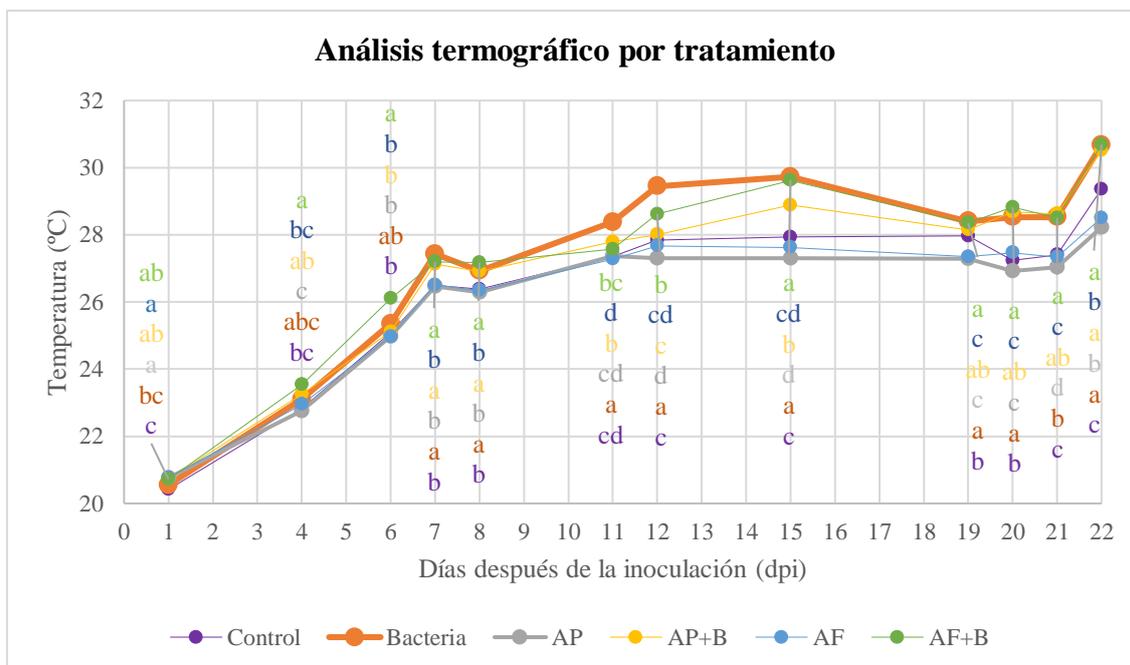


Figura 12. Análisis de la termografía por cada tratamiento a lo largo del ensayo. Las distintas letras indican diferencias significativas entre los tratamientos con $P < 0,05$.

Cada letra presenta el color del tratamiento en el gráfico representado.

5.5. Incidencia y severidad de aflatoxinas mediante el uso de luz UV en granos inoculados con *A. flavus* y *A. parasiticus* solos y con control biológico con *B. amyloliquefaciens*.

La técnica de luz UV también es no destructiva y permite identificar la presencia de aflatoxinas en los granos conservando la muestra.

Los resultados muestran la incidencia y la severidad de la fluorescencia mediante el uso de luz UV a lo largo del tiempo.

La emisión de fluorescencia se relaciona con la producción de aflatoxinas. Los resultados de incidencia muestran que los granos inoculados con los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus* presentan fluorescencia a partir del primer y sexto dpi respectivamente, observándose la precocidad de *A. flavus* respecto a *A. parasiticus* en este carácter (Fig. 13). Al igual que con la incidencia, a partir del octavo dpi, se observó que tratamientos infectados con los hongos presentaron una mayor severidad (Fig. 14).

La incidencia y la severidad de la fluorescencia aumentó en estos granos a lo largo del tiempo, siendo significativamente superior en *A. flavus* respecto a *A. parasiticus* hasta el día 15 dpi. A partir de ese momento no hubo diferencias significativas entre ellos. Esta fluorescencia llegó a detectarse en más del 60% de los granos inoculados con los hongos a los 22 dpi (Fig. 13 y 14).

Los granos control y los inoculados con la bacteria sola o con los hongos, nunca presentaron fluorescencia a lo largo del tiempo. Estos resultados sugieren que la bacteria puede inhibir la producción de aflatoxinas por parte de estos hongos (Fig. 13 y 14).

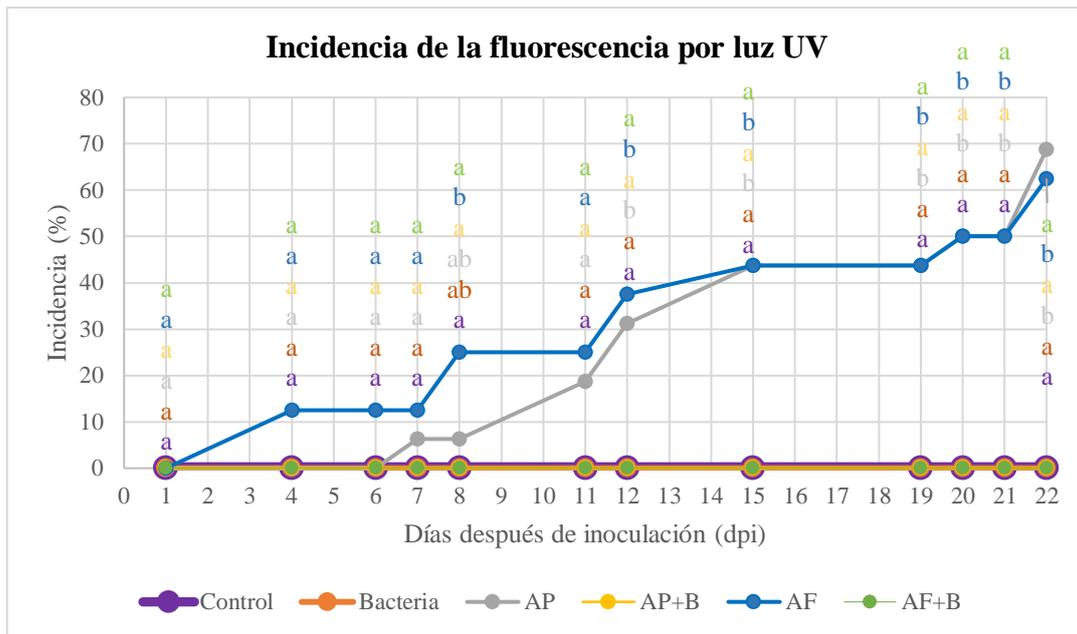


Figura 13. Incidencia de la presencia de aflatoxinas por la fluorescencia emitida por luz UV a lo largo del tiempo de los distintos tratamientos. Las distintas letras indican diferencias significativas entre los tratamientos con $P < 0,05$. Cada letra presenta el color del tratamiento en el gráfico representado.

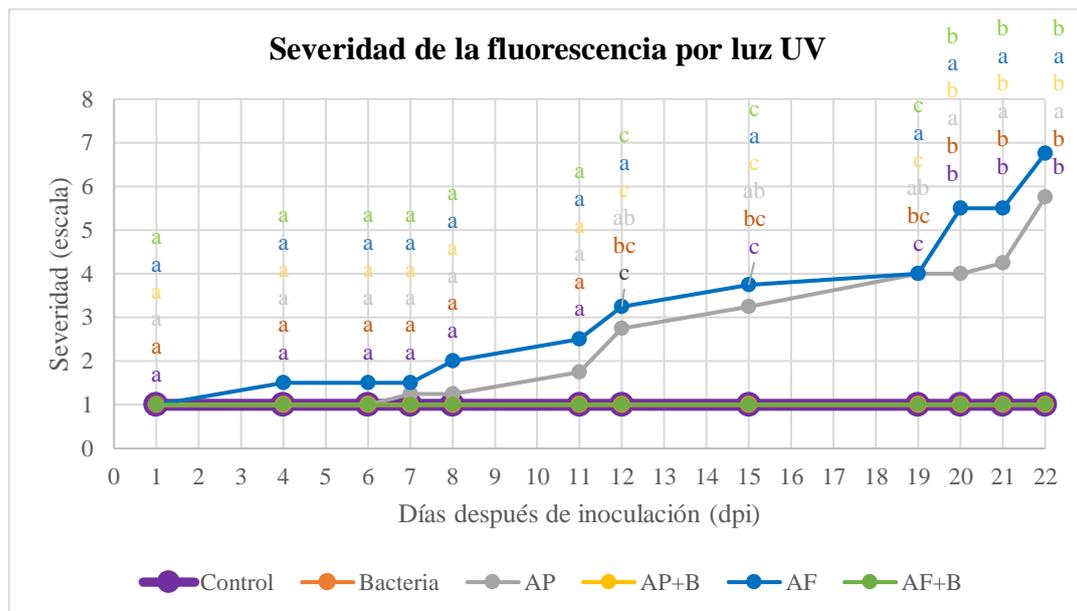


Figura 14. Severidad de la fluorescencia emitida por luz UV a lo largo del tiempo en los distintos tratamientos. Las distintas letras indican diferencias significativas entre los tratamientos con $P < 0,05$. Cada letra presenta el color del tratamiento en el gráfico representado.

5.6. Relación entre la termografía y la incidencia y severidad de la fluorescencia emitida en presencia de luz UV debido a la presencia de aflatoxinas.

Para conocer la relación o dependencia entre estos tres parámetros, se realizó un estudio de correlación de Pearson (Tabla 5).

Los resultados muestran que a medida que aumenta la incidencia de fluorescencia en los granos infectados también aumenta el número de estos o su severidad. También se observa que a partir de 11 dpi hay una significativa y negativa correlación entre la temperatura emitida por los granos y la incidencia y severidad de la fluorescencia, indicando que a medida que aumenta la incidencia y severidad de la fluorescencia y por tanto las aflatoxinas, va bajando la temperatura de los granos (Tabla 4).

Tabla 4. Coeficiente de correlación de Pearson entre la temperatura y la incidencia y severidad de fluorescencia emitida.

	4 dpi		7 dpi		8 dpi		10 dpi		11 dpi	
	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S
S	1.00		1.00		1.00		0.93		0.96	
<i>(P)</i>	****		****		****		****		****	
T	-0.034	-0.034	-0.35	-0.35	-0.33	-0.33	-0.36	-0.33	-0.53	-0.47
<i>(P)</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	***	***
	14 dpi		18 dpi		19 dpi		20 dpi		21 dpi	
	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S
S	0.96		1.00		0.88		0.89		0.93	
<i>(P)</i>	****		****		****		****		****	
T	-0.72	-0.71	-0.52	-0.52	-0.68	-0.54	-0.75	-0.65	-0.84	-0.81
<i>(P)</i>	****	****	***	***	***	***	****	****	****	****

S: Severidad; **I:** Incidencia; **T:** Temperatura; **(P):** Significación: **NS** no significativo, **** $P < 0.0000$, *** $P < 0.001$; **dpi:** días post inoculación.

6. DISCUSIÓN.

Las distintas sintomatologías de los granos (verdes, rosas y oscuros) no se asocia a la presencia de un solo hongo ya que la incidencia de *Aspergillus* sp. está en todos ellos. No obstante, la severidad revela que los granos verdes exhiben mayor número de cepas de *Aspergillus* sp. Estos resultados coinciden con un estudio de ambos hongos sobre maní en Córdoba (Argentina) realizado por Vaamonde et al. en 1995, en el que muestra que tanto *A. flavus* como *A. parasiticus* aparecen independientemente de la sintomatología y que pertenecen al grupo de los *Aspergillus* verde-amarillentos y además se caracterizan por el color verde de sus conidios (22).

La principal especie de *Aspergillus* contaminante en los granos de maíz ha sido *A. flavus* coincidiendo con los resultados obtenidos por Moradi et al. 2016, en un estudio de identificación de *A. flavus* y *A. parasiticus* mediante PCR a partir de alimentos para ganado, en el que concluía que las granjas lecheras estaban contaminadas principalmente por *A. flavus* (23). Estudios previos muestran una mayor relación de *A. parasiticus* al suelo, a cultivos como el cacahuete y a zonas más cálidas (24).

La identificación morfológica que diferencia a *A. flavus* de *A. parasiticus* coincide con las del trabajo realizado por Gourama y Bullerman en 1995 (24) y Vaamonde et al. en 1995 (22), en la que se observó que las conidias de *A. flavus* eran lisas o ligeramente rugosas y las de *A. parasiticus* eran rugosas, así como diferente crecimiento de cultivos, siendo de un color verde más oscuro el de *A. parasiticus*. Esto agiliza el trabajo de identificación o screening mediante la observación al MO de las cepas aisladas. La identificación molecular con sondas diseñadas en el gen calmodulina han permitido detectar niveles de concentración de ADN de estos hongos muy bajos, diferenciándolos perfectamente. Esta herramienta permitirá estudiar la evolución de granos infectados con ambos hongos sin que se aprecie la presencia de estos y podrá dar resultados de la evolución o crecimiento de estos dentro del grano cuando se estudian distintos tratamientos o estrategias de control (25).

La técnica del uso de la luz UV a 365 nm que permite detectar la presencia de aflatoxinas por la fluorescencia emitida, está muy relacionada con la detección de esta sustancia por HPLC según los estudios realizados por Abd El Aziz et al en 2021 (26). Siguiendo esta técnica se observa que la mayoría de las cepas analizadas son atoxigénicas, coincidiendo con los resultados obtenidos por Abd El Aziz et al en 2021. Sin embargo, en otros estudios

se observó una mayor proporción de cepas aflatoxigénicas frente a las atoxigénicas (27). Estos resultados justifican los obtenidos por Aguado A. (comunicación personal) durante las campañas de 2017 a 2021, en distintas localidades e híbridos de maíz en Andalucía, en los que la incidencia de *A. flavus* fue muy alta pero la incidencia de aflatoxinas fue baja sugiriendo que posiblemente la mayoría de las cepas aisladas eran atoxigénicas. Estas cepas no productoras de aflatoxinas pueden servir como una fuente de control biológico ya que tienen la capacidad tanto de desplazar a los hongos aflatoxigénicos como de utilizar las aflatoxinas como fuente de carbono pudiendo degradar el 80% de esta sustancia a los 21 días (28).

Numerosas especies del género *Bacillus* también poseen actividad antifúngica contra diversos hongos filamentosos. Este estudio confirma que la bacteria *B. amyloliquefaciens* y la bacteria AA puede retrasar el desarrollo de los patógenos analizados. Este microorganismo interfiere en el metabolismo y la estructura de patógenos del género *Aspergillus*, reduciendo significativamente su crecimiento y la producción de aflatoxinas al inhibir la expresión de genes involucrados en su síntesis (29). Los resultados obtenidos en este trabajo, aunque muestran una inhibición de los hongos de este género algo menor que la reportada en las referencias, son muy alentadores, ya que en ambas especies se consigue inhibir más del 60% en presencia de *B. amyloliquefaciens* y entre un 30 y una 60% en la bacteria AA del crecimiento de estos hongos, siendo el más afectado *A. parasiticus*. También se ha observado la ausencia de fluorescencia, y por tanto de la presencia de aflatoxinas en los granos inoculados con la bacteria *B. amyloliquefaciens* y con los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Los tratamientos con bacterias presentan un aumento significativo de 1°C de temperatura respecto al control. Sin embargo, los tratamientos con los hongos ocasionan descensos de temperatura de hasta más de 1,5°C coincidiendo con los resultados obtenidos por Barón et al. en 2016 en plantas de *Nicotiana benthamiana* (13). No se hacen comparaciones con estudios de termografía en maíz porque esta técnica sólo se ha utilizado para conocer los niveles de estrés hídrico en plantas y no en enfermedades en granos. También se ha puesto de manifiesto la relación entre la termografía y la incidencia y severidad de la emisión de fluorescencia o presencia de aflatoxinas en granos infectados con *A. flavus* y *A. parasiticus*, coincidiendo con el trabajo Chen et al. en el 2022 en el que se observa una bajada de temperatura por la inhibición de la síntesis de aflatoxinas debido a la bacteria *B. amyloliquefaciens*, confirmando así la correlación negativa y significativa de la

termografía y la incidencia y la severidad de la fluorescencia en este trabajo a partir del onceavo dpi (29). También hay que destacar que la severidad detectada por fluorescencia en *A. flavus* es superior a la de *A. parasiticus* coincidiendo estos resultados con los obtenidos en el trabajo de García Trejo en 2017 (30).

Estas técnicas no destructivas (termografía y emisión de fluorescencia por la luz UV) y la relación entre ellas, podrían permitir detectar los puntos críticos de sospecha de contaminación con aflatoxinas en zonas de almacenamiento de granos de maíz, ayudando a dirigir la toma de muestras para hacerla representativa del nivel de contaminación del total del grano almacenado, además de poder seleccionar y eliminar los granos afectados pudiéndose utilizar como biocombustible y no en alimentación.

7. CONCLUSIONES.

1. Las especies *A. flavus* y *A. parasiticus* están presentes en todas las sintomatologías de los granos de maíz.
2. *A. flavus* tiene mayor incidencia que *A. parasiticus* en las condiciones climatológicas del suroeste de Andalucía.
3. Las cepas atoxigénicas de *A. flavus* tienen una mayor incidencia que las aflatoxigénicas.
4. Las técnicas de identificación morfológica del crecimiento en PDA y observación al MO permiten un screening rápido de detección de *A. flavus* y *A. parasiticus*.
5. Las sondas de detección molecular diseñadas permiten conocer niveles muy bajos de estos hongos, así como la diferenciación entre ambos.
6. Los métodos morfológicos y moleculares coinciden en los resultados de identificación y detección de *A. flavus* y *A. parasiticus*.
7. Se propone el método de identificación molecular para el estudio de la evolución de estos hongos dentro de granos asintomáticos con o sin tratamientos para el control de los mismos.
8. El uso de la fluorescencia a 365 nm de luz UV y el medio de cultivo a base de coco permiten una rápida clasificación de cepas atoxigénicas y aflatoxigénicas.
9. La bacteria *B. amyloliquefaciens* reduce el crecimiento de los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus* e inhibe la producción de aflatoxinas.

10. La presencia de bacterias *B. amyloliquefaciens* y de los hongos (*A. flavus* y *A. parasiticus*) aumenta y reduce la temperatura de los granos de maíz respectivamente.
11. El uso de la termografía y luz UV para la detección de *A. flavus* y *A. parasiticus* y aflatoxinas son técnicas propuestas para el control de puntos críticos en el almacenamiento de granos de maíz.
12. La termografía y la emisión de fluorescencia por luz UV presenta una alta y significativamente negativa correlación entre ellas.

8. AGRADECIMIENTOS.

Se agradece a la Red Andaluza de Experimentación Agraria (RAEA) de Cultivos Herbáceos Extensivos (**PR.TRA.TRA2019.014**) por financiar este proyecto.

A Adan Abel Archidona por su colaboración en el laboratorio y a Iván Francisco García Tejero por su incondicional ayuda y apoyo.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- (1) Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2011). Cultivos herbáceos, Vol. I, Cereales.
- (2) Padrón, H., M, Delgado, S. H., Méndez, C. A. R., Carrillo, G. V. (2013). El género *Aspergillus* y sus micotoxinas en maíz en México: problemática y perspectivas. Revista mexicana de fitopatología. 31 (2), 126-146.
- (3) Parra, C.D., Quiroga, G., Giménez, A., Flores Quisbert, E. (2018). Aflatoxina B1 de *Aspergillus* spp generado en arroz, su detección y cuantificación por métodos fluorométricos y HPLC. Revista Boliviana de Química. 35 (5), 134-145.
- (4) Rodríguez, Y., Molto, J.C. (2016). Aflatoxinas: detección y control en alimentos. Revista de la Sociedad Química del Perú. 82 (2), 155-168.
- (5) Aguilar, M., Aguilar, M., Perea, F., Aguado, A. (2018). Aflatoxinas en Maíz Grano. Diagrama de Flujo y Sistema APPCC en Campo, en Recepción y Almacén. Servifapa.

- (6) Hesseltine, CW., Sorenson, WG., Smith, M. (1970). Taxonomic studies of the aflatoxin-producing strains in the *Aspergillus flavus* group. *Mycología*. 62 (1), 123-132.
- (7) Jimeno, M., Ruiz, N., Peña, N. (1980). Incidence of Aflatoxins in Animal Feedstuffs: A Decade's Scenario in India. *Journal of AOAC International*. 78 (3), 693 – 698.
- (8) Bogantes, P., Bogantes, Diego., Bogantes, Sixto. (2004). Aflatoxinas. *Acta Médica Costarricense*. 46 (4), 174-178.
- (9) Guédez, C., Castillo, C., Cañizales, L., y Olivar, R. (2008). Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Academia*. 7 (13), 50-74.
- (10) Villarreal, M. F., Villa, E.D., Cira, L. A., Estrada, M. I., Parra, F. I., Santos, S.D.L. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*. 36 (1), 95-130.
- (11) Tejera, B., Rojas, M. M., Heydrich, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. 42 (3), 131-138.
- (12) Pedraza, L.A., López, C.E., Uribe, D. (2020). Mechanisms of action of *Bacillus* spp. (Bacillaceae) against phytopathogenic microorganisms during their interaction with plants. *Acta Biológica Colombiana*. 25 (1), 112-125.
- (13) González, I., Hernández., J. M., García., C. (2017). Termografía infrarroja en el análisis de alimentos: una revisión. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. 18 (1), 13-28.
- (14) Barón, M., Pineda, M., Pérez, M.L. (2016). Representación de la infección por patógenos en las plantas. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 71 (9-10), 355-368.
- (15) Martínez, M. M., Vargas, L. M., Gómez, V. M. (2013). Aflatoxinas: Incidencia, impactos en la salud, control y prevención. *Biosalud*. 12 (2), 89–109.
- (16) Bolet, M., Socarrás, M. (2005). Mycotoxins and cancer. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 24 (1), 54-59.
- (17) Ruiz, J.R. (2016). Las micotoxinas y salud. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 82 (4), 387-388.
- (18) Forno, R., Velarde, A. (2005). Estudios sobre la detección de Aflatoxina en la castaña (*Bertholetia excelsa*) mediante fluorescencia bajo luz UV. *Revista Boliviana de Física*. 11, 1-8.

- (19) Gupta, A., Gopal, M. (2002). Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* isolates pathogenic to coconut insect pests. *World journal of microbiology and biotechnology*. 18, 329-335.
- (20) Aguado A., Savoie J.M., Chéreau S., Ducos C., Aguilar M., Ferrer N., Aguilar M., Pinso-Gadais, L., Richard-Forget F. (2019). Priming to Protect Maize from *Fusarium verticillioides* and its fumonisin accumulation. *Journal of the Science of Food Agriculture*. 99, 64–72.
- (21) Ibarra, D. C., Tapia, D. R., Vaca, E. P., Guamán, R. N., Ulloa, S. M., Villavicencio, Á. F. (2022). Evaluación de diferentes tipos de controles de roya (*Hemileia vastatrix* Berk. y Broome) y pestalotiopsis (*Pestalotia* sp.), en el cultivo de la fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum* ADC). *Siembra*. 9 (2).
- (22) Vaamonde, G., Degrossi, C., Comerio, R., y Fernández, P. V. (1995). *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* en maí cultivado en la provincia de Córdoba (Argentina): características diferenciales y capacidad aflatoxicogénica. *El Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 30, 191-198.
- (23) Moradi, S., Sabokbar, A., Hajikhani, R., Bakhtiari, A., Talebi, S. (2016). Isolation and identification of aflatoxin- producing *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by PCR method from cattle feed in Shahr Ghods – Shahrriar districts. *Medical Sciences*. 26 (3), 180-187.
- (24) Gourama, H., Bullerman, L.B. (1995). *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review. *Journal of Food protection*. 58 (12), 1395-1404.
- (25) Sebök, F., Dobolyi, C., Zágoni, D., Risa, A., Krifaton, C., Hartman, M., Cserháti. Mátyás., Szoboszlay, Sándor y Kriszt, B. (2016). Aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains in Hungarian maize fields. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 63 (4), 491-502.
- (26) Abd El-Aziz, A.R., Shehata, S.M., Hisham, S.M., Alobathani, A.A. (2021). Molecular profile of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* isolated from stored maize. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 28 (2), 1383-1391.
- (27) Rangel, E.J., Valdivia, A.G., Moreno, O., Hernández, S., Cruz, C., Luna, M.C.D., Quezada, T., Ortiz, R., Máyek, N. (2020). Caracterización de *Aspergillus flavus* y

cuantificación de aflatoxinas en pienso y leche cruda de vacas en Aguascalientes, México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*. 11 (2), 435-454.

(28) Maxwell, L.A., Callicott, K.A., Bandyopadhyay, R., Mehl, H.L., Orbach, M.J., Cotty, P.J. (2021). Degradation of aflatoxins B1 by atoxigenic *Aspergillus flavus* biocontrol agents. *Plant Disease*. 105 (9), 2343-2350.

(29) Chen, G., Fang, Q., Liao, Z., Xu, C., Liang, Z., Liu, T., Zhong, Q., Wang, L., Fang, X., Wang, J. (2022). Detoxification of Aflatoxin B1 by a Potential Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* WF2020. *Frontiers in Microbiology*. 13, 891091.

(30) García, A. (2017). UV-C en el control de aflatoxinas en granos de maíz palomero (*Zea Mays* Everta) bajo un enfoque sistémico. Tesis doctoral. 5-7.