

Tesina de grado para optar por el título de Microbióloga

Estudio in situ del comportamiento de los niveles de zearalenona y sus metabolitos α - y β -zearalenol durante el proceso de ensilaje. Disminución de los niveles de zearalenona in vitro por *Saccharomyces cerevisiae* nativa de ensilaje



Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales
Universidad Nacional de Río Cuarto

Valentina Baralla

2013

El presente trabajo experimental fue realizado en la Cátedra de Micología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto y se presenta como requerimiento para optar al título de grado en Microbiología.

Título: Estudio *in situ* del comportamiento de los niveles de zearalenona y sus metabolitos α - y β -Zearalenol durante el proceso de ensilaje. Disminución de los niveles de Zearalenona *in vitro* por *Saccharomyces cerevisiae* nativa de ensilaje.

Tesista: Valentina Baralla

Directora: Dra. Lilia R. Cavaglieri

Co-Directora: Dra. María Laura González Pereyra

Jurados:

Dra. Cecilia Farnochi

Dra. Verónica Alonso

AGRADECIMIENTOS

En estas hojas quiero agradecerles con todo mi corazón a, mis padres, Adriana y Jorge, por traerme a este mundo, ser mis guías en esta vida, dándome siempre lo más importante, su amor y cuidado incondicional. Por haberme dado la posibilidad de vivir esta maravillosa etapa y cumplir este sueño, con su apoyo, esfuerzo, alentándome a lograrlo y enseñándome que querer es poder. A mi amado hermano, Gabriel, por lo mucho que aprendí de él en todos los momentos que vivimos juntos, por estar siempre ahí cuando necesite un consuelo y en los momentos de alegría. Gracias por ser mi hermano mayor, cuidarme y darme cariño.

Muchas gracias a mis hermosas abuelas que me dio la vida, coca y tuca, por ser cada una como una madre mayor para mí, por su amor y cariño eterno hacia mí y mis primos, por sus preocupaciones, cuidarme y estando siempre en mi vida.

Agradecerles por su cariño a mis tías y tíos. A mis primas y primos, Mechi, Tere, Juli, Dolo, Luli, Ivi, Cepu, Pancho, Santi, Tomi, Alfi, Cote y Lu, más que primos, hermanos del alma. Por los infinitos momentos compartidos y siempre aprendiendo uno del otro. En fin muchas gracias a toda mi FAMILIA por todo lo que me han dado a lo largo de la vida.

Gracias infinitas a mis AMIGOS de toda la vida, por aprender de ellos, por escucharme siempre y estar ahí para mí como sostén, darme ánimos y muchas alegrías.

Muchas gracias a mis adoradas AMIGAS que conocí en la universidad. Por hacer que todos los días hayan sido lindos, por tenerme paciencia, explicarme cuando lo necesité, por compartir hermosos momentos con ellas, por estar y haber hecho que esta etapa sea maravillosa junto a ellas, gracias a ustedes, grandes personas, que de seguro tendrán muchos frutos en su vida. También gracias a

aquellos amigos que conocí durante esta etapa, que alimentaron con alegrías estos años.

Agradecerle en especial a Laura, mi Co-directora, por su gran ayuda, paciencia y enseñanzas, por brindarme parte de su tiempo para que pudiera llevar a cabo este trabajo, siempre con buena predisposición y forma de ser. Muchas gracias de corazón por compartir conmigo y permitirme hacer este trabajo, sin vos no hubiese sido posible. Gracias infinitas, Laura González Pereyra y Lilia Cavaglieri, por ser mis guías en este paso final, brindarme su tiempo y sabiduría.

Muchas gracias a los integrantes del laboratorio de Micología por compartir su espacio de trabajo y poder realizar este trabajo. A todos los profesores a lo largo de la carrera por su tiempo dedicado a enseñarnos y formarnos y MUCHAS GRACIAS a la Universidad Nacional de Río Cuarto por estos años y permitirme realizar este sueño.

Trabajo final de grado: Tesis de Microbiología.

Título: Estudio *in situ* del comportamiento de los niveles de zearalenona y sus metabolitos α - y β - zearalenol durante el proceso de ensilaje. Disminución de los niveles de zearalenona *in vitro* por *Saccharomyces cerevisiae* nativas de ensilaje.

Palabras claves: α -zearalenol, β - zearalenol, ensilaje, *Saccharomyces cerevisiae*, zearalenona.

Autor: Valentina Baralla, valebarallaa@hotmail.com Tel: 0358-154405285

Director: Dra. Lilia R. Cavaglieri

Codirector: Dra. María L. González Pereyra

Lugar de trabajo: Laboratorio de Micología, Dpto. Microbiología e Inmunología, Facultad de Cs. Exactas, Físico-Química y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto.

Resumen

En Argentina el ensilaje es una técnica de preservación de forraje que se logra por medio de una fermentación láctica espontánea bajo condiciones anaeróbicas, siendo una fuente importante de alimento para el ganado. El ensilaje de maíz de planta completa frecuentemente puede contaminarse con hongos y micotoxinas que disminuyen su calidad y valor nutricional, produciendo pérdidas económicas. La zearalenona (ZEA) es una micotoxina estrogénica, nociva para humanos y animales, producida principalmente *Fusarium graminearum* y *F. culmorum*. La ZEA, puede metabolizarse formando varios derivados también estrogénicos, incluso más tóxicos que la ZEA original. Estas micotoxinas pueden contaminar el maíz antes de ser ensilado y causar problemas reproductivos en los animales. Los objetivos del presente estudio fueron: i) determinar los efectos del proceso de ensilaje sobre los niveles de zearalenona (ZEA), α -zearalenol (α -ZOL) y β -zearalenol (β -ZOL) en ensilaje de maíz contaminado artificialmente y ii) evaluar la capacidad de dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, aisladas de ensilaje de maíz, para adsorber o biotransformar ZEA *in vitro*. Se diseñó un modelo de mini-silos de laboratorio y se contaminó previamente el maíz picado con un núcleo de ZEA, obteniéndose una concentración de 750 μ g de ZEA/Kg de ensilaje. Estos silos fueron muestreados a los 7, 45, 90, 120 y 127 días del armado. Se midieron los parámetros físico-químicos del ensilaje en cada etapa y se cuantificaron los niveles de ZEA, α -ZOL y β -ZOL por LC-MS/MS. En otro ensayo, las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* RC008 y RC009,

se incubaron en soluciones de PBS adicionado con 299; 475,6 o 1251 ng/ml de ZEA durante 1 h a 25°C. Los niveles de ZEA, α -ZOL y β -ZOL se cuantificaron por LC-MS/MS. Los análisis químicos y físicos indican que el ensilaje mantuvo una buena calidad en todas las etapas. El pH se redujo favorablemente ($P < 0,05$) a 4,69-3,80 durante la etapa de conservación. La materia seca, %H y a_w no variaron desde el día 7 al 127. Los niveles de ZEA, α -ZOL y β -ZOL también se mantuvieron desde el día 7 hasta el día 127, indicando que no hubo una degradación significativa por el proceso de ensilado o por la microbiota nativa del ensilaje. Ambas cepas, RC008 y RC009 fueron capaces de reducir, *in vitro*, las concentraciones de ZEA en soluciones de PBS (hasta un 92,57% para RC008 y un 94,37% para RC009 en la solución de 1251 ng/ml). Dado que no se detectó α -ZOL ni β -ZOL, la reducción de ZEA se atribuyó a la adsorción. Este estudio sugiere que los niveles de ZEA permanecen invariables durante el proceso de ensilaje, así como los niveles de sus derivados. Además se demostró que *S. cerevisiae* RC008 y RC009 fueron capaces de adsorber y no biotransforman ZEA, mejorando su potencial uso como aditivos para ensilajes.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1. I. Generalidades	1
1. II. El Genero <i>Fusarium</i>	2
1. II. 1. <i>Fusarium graminearum</i> y <i>Gibberella zeae</i>	4
1. III. Micotoxinas	9
1. IV. Micotoxicosis	10
1. V. Zearalenona	11
1. V. 1. Estructura química y mecanismo de acción de la zearalenona	12
1. V. 2. Efectos biológicos de la zearalenona	14
1. VI. El ensilaje	17
1. VI. 1. El proceso del ensilaje	17
1. VI. 2. Características y ventajas del uso de ensilajes	19
1. VI. 3. El ensilaje como alimento	20
1. VI. 4. La microbiota del ensilaje	21
1. VII. Factores que predisponen a la contaminación del ensilaje con hongos y micotoxinas	22
1. VIII. Microorganismos capaces de detoxificar micotoxinas	24
2. HIPÓTESIS	27
3. OBJETIVOS	27
3. I. Objetivo general	27
3. II. Objetivos específicos	27

4. MATERIALES Y MÉTODOS	28
4. I. MATERIALES	28
4. I. 1. Microorganismos	28
4. I. 2. Medios de cultivo	28
4. I. 3. Soluciones	30
4. I. 4. Solventes	31
4. I. 5. Equipamiento de laboratorio	31
4. I. 6. Otros insumos de laboratorio	32
4. II. MÉTODOS	33
4. II. 1. Producción de zearalenona <i>in vitro</i> en cultivo de arroz	33
4. II.1.1. Cuantificación de zearalenona	34
4. II. 2. Modelo experimental de mini-silos	35
4. II.2.1. Contaminación del material vegetal	35
4. II.2.2. Armado de los mini-silos	35
4. II.2.3. Recolección y análisis de las muestras	37
4. II. 3. Estudio del mecanismo de reducción de zearalenona <i>in vitro</i> por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	39
4. II. 4. Estudios estadísticos	40
5. RESULTADOS	41
5. I. Producción de zearalenona en cultivo de arroz y contaminación de maíz	41
5. II. Análisis del ensilaje	41
5. II. 1. Análisis físico-químicos del ensilaje	41

5. II. 2. Determinación de las concentraciones de zearalenona, α-Zearalenol y β-Zearalenol en ensilaje	42
5. III. Ensayo <i>in vitro</i> de adsorción/biotransformación de zearalenona	43
6. DISCUSIÓN	45
7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	51
7. I. Conclusiones	51
7. II. Perspectivas futuras	52
8. BIBLIOGRAFÍA	53

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Fusarium graminearum</i> . A) Cultivo; B) Peritecio de <i>Gibberella zeae</i> con ascosporas; C) Fusariosis de la espiga de trigo; D) Esporodoquio; E) Cultivo de <i>F. graminearum</i> en agar papa glucosado; F) Macroconidios (barra de escala = 25 μ m).	8
Figura 2. Zearalenona y sus metabolitos.	12
Figura 3. Estructuras químicas de A) zearalenona y B) 17 β -estradiol	13
Figura 4. A) y B) Disminución del tamaño y mal formaciones porcinas; C) Vulvovaginitis porcina; D) Mortalidad de embriones y abortos.	15
Figura 5. Modelo experimental de mini-silos. A) Mini-silos armados en el laboratorio; B) Diagrama del diseño del modelo de mini-silos; C) Material picado para ensilar (planta entera de maíz); D) Silos bolsa armados en el campo.	36

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales especies de <i>Fusarium</i> y las micotoxinas que producen.	4
Tabla 2. Valores de porcentaje de humedad (%H), porcentaje de materia seca (%MS), actividad acuosa (a_w) y pH encontrados en el ensilaje de maíz durante un experimento <i>in situ</i> usando un modelo de silos de laboratorio.	42
Tabla 3. Niveles ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de zearalenona, α -zearalenol (α -ZOL) y β -zearalenol (β -ZOL) encontrados en ensilaje de maíz contaminado artificialmente durante un experimento <i>in situ</i> mediante un modelo de silos de laboratorio	43
Tabla 4. Ensayo <i>in vitro</i> del porcentaje de reducción de zearalenona por dos cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> aisladas de ensilaje de maíz	44

I. Generalidades

La contaminación de cereales y materias primas para alimentos con hongos es un problema a escala mundial, ya que disminuye su calidad y valor nutricional produciendo pérdidas económicas. Además, algunas especies, principalmente de los géneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Alternaria*, pueden producir micotoxinas nocivas para humanos y animales. Éstas pueden ser producidas por hongos fitopatógenos a campo, o bien durante el almacenamiento de los productos cosechados.

Las micotoxinas son compuestos orgánicos, biológicamente activos, que pueden causar intoxicaciones agudas, subagudas o crónicas con efectos carcinogénicos, teratogénicos, mutagénicos, neurotóxicos e inmunosupresores (Peraica y col., 1999; Richard, 2007). La zearalenona (ZEA) es un producto tóxico del metabolismo secundario y estrogénico producido por varias especies de *Fusarium* que incluyen a *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. equiseti* y *F. semitectum* (Betina, 1989; Bennett y col., 2003). Esta micotoxina, al ser metabolizada, puede producir varios metabolitos, algunos de los cuales, incluso más tóxicos que la ZEA original. Los derivados de ZEA, α -zearalenol (α -ZOL) y β -zearalenol (β -ZOL), pueden ser detectados en los tallos de maíz infectados a campo con *Fusarium* spp. (Mirocha y col., 1979; Bottalico y col., 1985).

El maíz es el cereal más ampliamente distribuido a nivel mundial, ocupa la tercera posición en producción, seguido por el trigo y el arroz (SIACON, 2007). En América Latina, Argentina es uno de los principales productores de maíz, con el 8,7 % de la producción latinoamericana (Galarza y col., 2004; Vega y col., 2004).

El ensilaje de maíz es una fuente de alimento importante para la ganadería bovina. En los últimos 10 años, su uso se ha extendido considerablemente en los campos argentinos, principalmente en los sistemas de cría intensivo (feedlots) y tambos. Este sistema permite la conservación del material vegetal durante largos períodos de tiempo, manteniendo su valor nutricional similar al de las pasturas frescas. Sin embargo, si el material ensilado fue contaminado con *Fusarium* spp. a

campo, ciertos niveles de estas toxinas ya estarán presentes antes de ensilar. El ensilaje posee una microbiota que varía en las diferentes etapas del proceso de ensilado, predominando las bacterias ácido lácticas (BAL) que producen los ácidos responsables de la conservación. Los niveles de ZEA, (α -ZOL) y (β -ZOL) podrían variar si la microbiota presente en el ensilaje o las condiciones propias del proceso causaran la degradación o biotransformación de éstas.

El aislamiento de microorganismos capaces de adsorber o biotransformar micotoxinas en productos menos tóxicos, es una herramienta importante para la formulación de aditivos alimentarios biológicos, más seguros que los aditivos inorgánicos.

II. El género *Fusarium*

El género *Fusarium* abarca un gran número de especies de amplia distribución y es endémico en zonas maiceras en todo el mundo (Mendoza y col., 2003). Estas especies se han identificado no solo como importantes patógenos en plantas, sino también como productores de toxinas, capaces de causar la muerte en animales e incluso en el hombre (Moss y col., 1984). Son hongos que presentan una gran variación en cuanto a sus características morfológicas, culturales y fisiológicas. Esta capacidad de variación explica en cierta medida el hecho de que las especies del género puedan colonizar nichos ecológicos muy diversos. (Nelson y col., 1994).

El género *Fusarium* se encuentra dentro del Reino Fungi, Phylum *Ascomycota*, Clase *Deuteromycete*, Orden *Hipocreales*, Familia *Hipocreaceae* e incluye 70 especies, de acuerdo al trabajo publicado por Leslie y Summerell (2006). Las especies de *Fusarium* son saprofitas en algunas de sus fases de crecimiento y pueden o no desarrollar una fase de reproducción sexual según la especie (Finch y col., 1983; Alexopoulos y col., 2000).

Especies de este género están ampliamente distribuidas en el suelo y en partes subterráneas y aéreas de las plantas, restos vegetales y otros sustratos

orgánicos (Wollenweber y col., 1935; Gordon, 1959; Booth, 1971; Burgess, 1981). Son comunes en regiones tropicales y templadas como también en zonas árticas y desérticas, donde prevalecen condiciones climáticas adversas. Las condiciones ambientales tienen un gran impacto en el crecimiento fúngico y juegan un rol crítico en la epidemiología de las micotoxicosis. La producción de micotoxinas está regulada genéticamente en respuesta a las condiciones ambientales, siendo la temperatura y el agua disponible, los principales factores ambientales que influyen en el crecimiento y producción de micotoxinas por diversas especies de *Fusarium* (Ramírez y col., 2006).

Las especies de *Fusarium* son a menudo consideradas como hongos del suelo a causa de su abundancia y su frecuente asociación con raíces de plantas, ya sea como parásitos o saprófitos. Sin embargo, son colonizadores comunes de las partes aéreas de la planta, donde pueden ocasionar enfermedades de una importancia económica considerable (Francis y col., 1975; Francis y col., 1977; Olkan y col., 1979; Burgess y col., 1988a, b). En maíz, pueden causar daño en todas las etapas del cultivo. En la Tabla 1 se muestran algunas de las principales especies de *Fusarium* micotoxicogénicas (Nelson y col., 1994).

Tabla 1. Principales especies de *Fusarium* y las micotoxinas que producen.

Especie de <i>Fusarium</i>	Micotoxinas producidas
<i>Fusarium acuminatum</i>	Toxina T-2, moniliformina
<i>Fusarium anthophilum</i>	Beauvericina
<i>Fusarium avenaceum</i>	Moniliformina, eniانتinas
<i>Fusarium tricinctum</i>	Toxina T-2
<i>Fusarium arthrosporoideas</i>	Moniliformina, eniانتinas
<i>Fusarium cerealis</i>	Fusarenona, nivalenol, zearalenona
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	Moniliformina
<i>Fusarium culmorum</i>	Deoxinivalenol, fusarenona, nivalenol, zearalenona
<i>Fusarium equiseti</i>	Bauvericina, zearalenona
<i>Fusarium graminearum</i>	Deoxinivalenol, fusarenona, nivalenol, zearalenona
<i>Fusarium nygamai</i>	Bauvericina, fumonisina B ₁ y B ₂
<i>Fusarium oxysporum</i>	Beauvericina, moniliformina
<i>Fusarium poae</i>	Diacetociscirpenol, fusarenona, nivalenol
<i>Fusarium proliferatum</i>	Bauvericina, fumonisina B ₁ y B ₂ , moniliformina
<i>Fusarium semitectum</i>	Zearalenona, beauvericina
<i>Fusarium verticillioides</i>	Fumonisina B ₁ , B ₂ y B ₃ , moniliformina
<i>Fusarium sporothrichioides</i>	Toxina T-2, HT-2
<i>Fusarium langsethiae</i>	Toxina T-2, HT-2

Tomado de (Nayara y col., 2011)

II.1. *Fusarium graminearum* y *Gibberella zeae*

Fusarium graminearum (Figura 1a) es un hongo cosmopolita, que afecta principalmente a los cultivos de maíz, trigo y cebada. Es un hongo homotálico y su estadio sexual (teleomorfo) es *Gibberella zeae* (Aoki y col., 1999). La mayoría de las cepas producen peritecios (Figura 1b) en agar zanahoria (AZ) o agar hojas de clavel

(AHC) en pocos días. Los peritecios abundan en la naturaleza y liberan esporas sexuales (ascosporas) que provocan enfermedades que afectan las partes aéreas de las plantas como la fusariosis de la espiga ("*head blight*") (Figura 1c) en trigo, cebada y avena, la podredumbre del tallo y la mazorca en el maíz, entre otras (Leslie y col., 2006).

Generalmente, *Fusarium graminearum* no se considera un patógeno que afecte de manera directa a los humanos. Sin embargo, algunos síntomas han sido descritos en casos de intoxicación en humanos por consumir granos con fusariosis ("*scabby grain intoxication*"). En animales domésticos, las manifestaciones más comunes incluyen hiperestrogenismo, rechazo del alimento y vómitos, principalmente en cerdos (Marasas y col., 1984). *Fusarium graminearum* es resistente a la mayoría de los antifúngicos de uso clínico, excepto a la anfotericina B que es la más efectiva (Pujol y col., 1998).

Fusarium graminearum puede producir tres importantes micotoxinas, las cuales son las principales responsables de su toxicidad: ZEA, nivalenol y deoxinivalenol. A su vez, también produce aurofusarina, culmorinas, fusarina C, fusarocromanona y esteroides (Gray y col., 1967; Marasas y col., 1984; Farber y col., 1986; Pathre y col., 1986; Burmeister y col., 1990; Pedersen y col., 1999). El ganado bovino es relativamente resistente a los efectos de la ZEA, aunque este compuesto puede ser transmitido a la leche si los niveles presentes en el alimento son altos (Mirocha y col., 1981).

Algunas cepas de *F. graminearum* pueden producir hasta 60 g/kg de ZEA en cultivo *in vitro* (Marasas y col., 1984) y se utilizan para producción comercial de esta toxina y de su derivado zeranol, utilizado en algunos países como promotor de crecimiento para el ganado (Hidy y col., 1977).

A continuación se detallan las características distintivas para la identificación de *F. graminearum* y su teleomorfo *G. zeae* según Leslie y Summerel (2006):

Características en AHC:

- Escasos esporodoquios, color naranja pálido, a menudo escondidos bajo el micelio (Figura 1d).
- Macroconidios relativamente delgados, curvados a casi rectos, de paredes gruesas, con cinco o seis septos, con la célula apical afinada y la célula basal en forma de pie (Figura 1e).
- Formación de clamidosporas variable, generalmente en los macroconidios.
- No forma microconidios.
- El estadio de teleomorfo, *G. zea*, se forma sobre las hojas de clavel. Como es un hongo homotálico, los peritecios se forman sin la necesidad de cruzar diferentes aislados.

Características en agar papa glucosado (APG):

- Colonias de crecimiento rápido y de micelio denso, de colores que varían desde blanco a naranja pálido a amatillo (Figura 1f).
- Aparición de esporodoquios marrón-rojizo o anaranjados luego de los 30 días de incubación.
- Formación de pigmentos rojos en el agar, sensibles al pH, que pueden cambiar a amarillo si el pH baja.

Macroconidios:

- En los esporodoquios son generalmente uniformes en forma y tamaño.
- Morfología general: delgados, de paredes gruesas y largo mediano. Moderadamente curvados a derechos con la superficie ventral recta y la dorsal levemente curvada.
- Morfología de la célula apical: afinada.
- Morfología de la célula basal: con forma de pie bien definida.
- Número de septos: cinco a seis, bien definidos.

- Abundancia: a comparación de otras especies, los macroconidios son raros de encontrar en *F. graminearum*, siendo más abundantes sólo en los esporodoquios.

Microconidios: ausentes

Clamidosporas:

- Abundancia / Velocidad de formación: variable, generalmente tardan en formarse. La ausencia de clamidosporas no es una característica diagnóstica.
- Locación: más comúnmente en los macroconidios, pero pueden formarse también en el micelio.
- Apariencia: solitarias, en grupos o cadenas. Generalmente son globosas con una fina rugosidad, pero no de apariencia verrucosa.

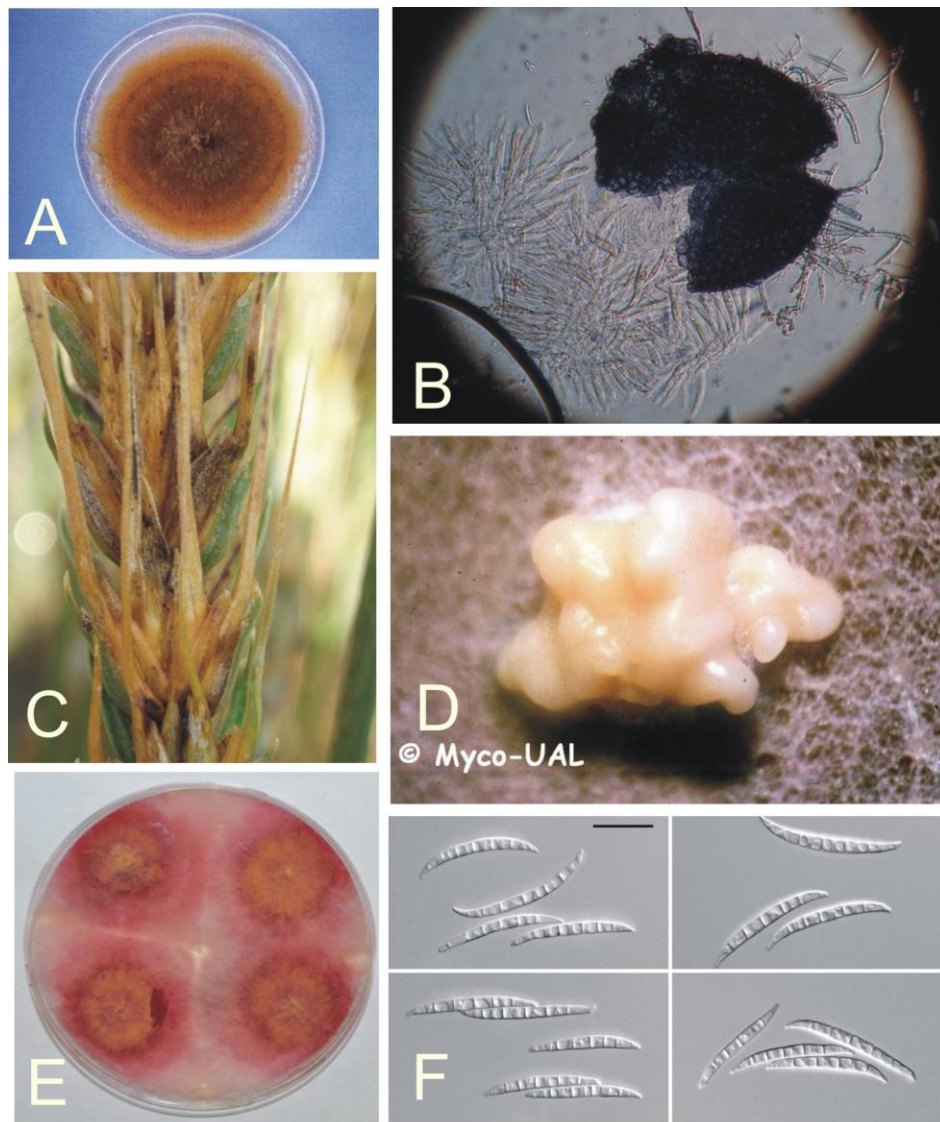


Figura 1. *Fusarium graminearum*. A) Cultivo; B) Peritecio de *Gibberella zeae* con ascosporas; C) Fusariosis de la espiga de trigo; D) Esporodoquio; E) Cultivo de *F. graminearum* en agar papa glucosado; F) Macroconidios (barra de escala = 25 µm). Tomado de www.google.com.ar, búsqueda: Imágenes/ *Fusarium graminearum*.

III. Micotoxinas

Las micotoxinas (del griego "mykes" = hongo y "toxicum" = veneno) son metabolitos tóxicos producidos por los hongos que pueden contaminar los cultivos, granos, cereales, forrajes y alimentos en todos los niveles de producción, ya sea a campo, durante su manejo, cosecha, procesamiento y almacenaje. Entran al sistema de producción animal a través del alimento (concentrado, ensilado o forraje) o por la vía del lecho. Las micotoxinas afectan negativamente el desempeño y la salud del animal, así como la calidad del producto. Por lo tanto, el control de micotoxinas es crucial para las economías de producción, el bienestar animal y por razones de seguridad alimentaria.

Químicamente, las micotoxinas son diferentes y representan una variedad de familias y rangos con pesos moleculares desde aproximadamente 200 a 500 kD. Actualmente se conocen más de 300 micotoxinas, pero son sólo algunas las que se han investigado extensamente debido a su importancia en la salud pública y agricultura (Denli y col., 2006). Las micotoxinas varían ampliamente en términos de su severidad y ejercen sus efectos a través de cuatro mecanismos primarios:

- Reducción del consumo o rechazo del alimento.
- Alteración en el contenido de nutrientes del alimento, en términos de absorción y metabolismo de nutrientes.
- Efectos sobre los sistemas endocrino y excretor.
- Supresión del sistema inmune.

Estos cambios suelen desencadenar síntomas no específicos, los cuales pueden ser producidos también por muchos otros factores, lo cual dificulta el diagnóstico apropiado de problemas por micotoxinas. Cuando se trata de niveles moderados de las mismas, se observan síntomas generales (menor desempeño, deterioro de la inmunidad) en tanto que los síntomas producidos por niveles de micotoxinas más altos suelen ser más específicos. Los diagnósticos de micotoxicosis pueden prestarse a mayores complicaciones por la presencia de síntomas secundarios resultantes de

enfermedades oportunistas relacionadas con la supresión del sistema inmune luego de la exposición a micotoxinas.

Es importante aclarar que la presencia de una especie fúngica micotoxigénica no indica necesariamente la presencia de micotoxinas, ya que no todas las cepas de la especie las pueden producir. No obstante, si la cepa del hongo produce micotoxinas y éstas quedan en el alimento, pueden persistir por un largo tiempo después de que el crecimiento vegetativo del hongo haya cesado, incluso si el hongo ha muerto (Wicklow y col., 1988).

Las micotoxinas suelen ser muy estables y permanecen durante el almacenaje ya que son independientes de las condiciones del mismo. Dado que en la actualidad no existen procedimientos de descontaminación eficientes, la mayoría de las micotoxinas presentes en el cultivo en el momento de la cosecha, llegarán a la dieta final del animal cuando se consuma el alimento.

IV. Micotoxicosis

La respuesta tóxica se produce cuando las micotoxinas son ingeridas por los animales y la expresión de la intoxicación varía dependiendo del órgano afectado, del tipo de toxina (diferente estructura química), del tiempo de exposición, de la dosis, del estado fisiológico y sanitario del animal y/o de la combinación de toxinas. Las intoxicaciones causadas por micotoxinas se denominan *micotoxicosis*, y pueden ser agudas, crónicas o subcrónicas, dependiendo de la cantidad de toxina ingerida y el tiempo de exposición. La ingestión de elevadas concentraciones en corto plazo, puede provocar lo que se denomina intoxicación aguda que se caracteriza por presentar en el animal, síntomas específicos y claros, que dependiendo de la toxina implicada se puede manifestar con diarreas, disturbios gastrointestinales, inflamación de las mucosas, irritación de la piel, abortos, convulsiones, ictericia, hepatitis, nefritis, necrosis de las mucosas y secuelas sanguíneas como anemia y leucopenia y hasta puede llegar a causar la muerte del animal. Por el contrario, concentraciones más bajas de toxina ingeridas a largo plazo, causan una intoxicación crónica,

generalmente con sintomatología más bien inespecífica, como malestar, apatía, rechazo del alimento, reducida tasa de crecimiento, aumento en el riesgo e incidencia de otras enfermedades por la disminución en la respuesta inmune, tumores y cáncer en diferentes órganos, con la consecuente pérdida en la producción (CAST, 2003; Galvano y col., 2005; Denli y col., 2006). A su vez, las micotoxicosis pueden ser primarias o secundarias. En el primer caso se da en un animal cuando éste ingiere un alimento contaminado, mientras que una micotoxicosis secundaria es producida en el hombre u otros animales cuando éstos consumen productos derivados de animales que consumieron un alimento contaminado con micotoxinas (carne, leche) (CAST, 2003).

V. Zearalenona

La ZEA es una micotoxina estrogénica no esteroidea producida por varias especies de *Fusarium*, principalmente por *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. roseum*, *F. verticillioides* y *F. tricinctum*, entre otros. Ha estado implicada en numerosas micotoxicosis en animales de producción, especialmente en cerdos. La contaminación por ZEA es frecuente en países de clima templado y cálido contaminando cultivos en todo el mundo (Bennett y col., 2003). En Argentina, se ha detectado la presencia de contaminación con ZEA en sustratos como maíz, ensilaje de maíz y alimento para pollos (Resnik y col., 1996; Dalcerio y col., 1997; González Pereyra y col., 2008).

La ZEA es un compuesto bastante estable y puede perdurar durante el proceso de la molienda y almacenamiento, así como durante la cocción y el procesado de los alimentos, ya que no se degrada a altas temperaturas, al igual que ocurre con las aflatoxinas y otras micotoxinas (Gajecki, 2002). Además la ZEA es soluble en soluciones alcalinas, éter, benceno, acetonitrilo, alcohol etílico, pero es prácticamente insoluble en agua (Gajecki y col., 2010).

Los derivados de ZEA, como el α -zearalenol (α -ZOL), β -zearalenol (β -ZOL), α -zearalanol (α -ZAL o zeranol), β -zearalanol (β -ZAL), zearalanona (ZAN) (Figura 2) pueden ser detectados en tallos de maíz infectados por *Fusarium* en el campo y en

los cultivos. Estos metabolitos tienen una distribución mundial y los principales sustratos afectados son maíz, trigo, sorgo, cebada y piensos (Zinedine y col., 2007).

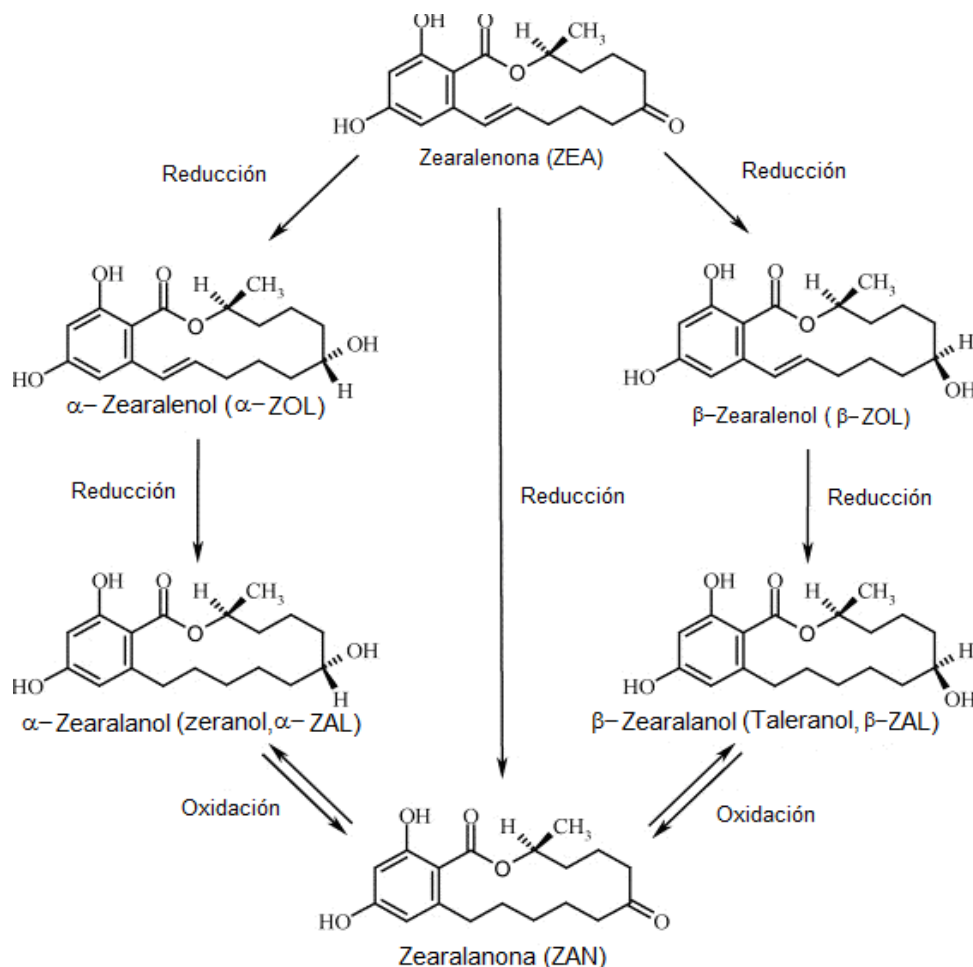


Figura 2. Zearalenona y sus metabolitos.

Tomado de www.google.com.ar, búsqueda: Imágenes/estructuras-quimicas-zearalenona- y sus metabolitos

V.1. Estructura química y mecanismo de acción de la zearalenona

La molécula de ZEA (Figura 3a) es una 3,4,5,6,9,10-hexahidro-14,16-dihidroxi-3-metil-2-benzoxacicotetradecin-1,7(8H)-diona. A pesar de que las

estructuras de ZEA y sus metabolitos no son esteroideas, poseen similitud con la estructura del 17β -estradiol (Figura 2b), la principal hormona sexual producida por varias especies de mamíferos, incluyendo los humanos. Debido a esta similitud, estas toxinas pueden unirse a los receptores estrogénicos de la membrana de células blanco activándolos, causando un síndrome hiperestrogénico y provocando alteraciones en el sistema reproductivo (Heffron, 1999; Riley y col., 2005).

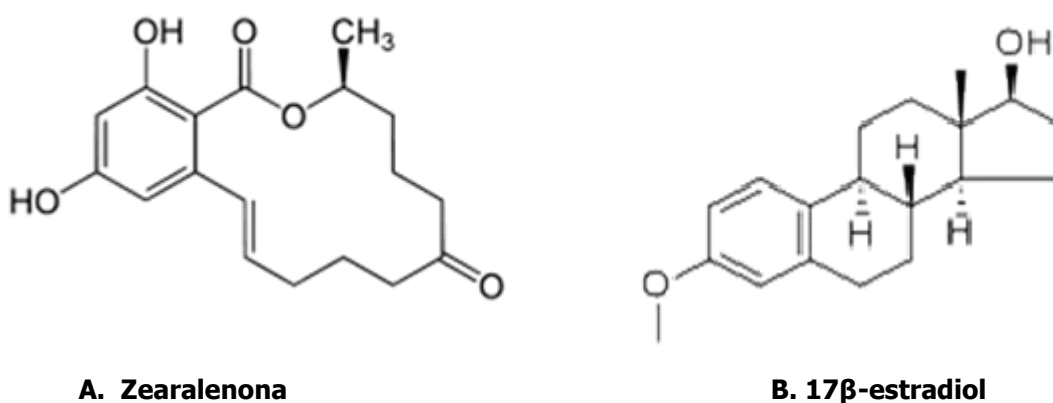


Figura 3. Estructuras químicas de A) zearalenona y B) 17β -estradiol.

Fuente: <http://www.chemicalbook.com>

La ZEA es metabolizada en el hígado de los animales. Cuando se encuentra en el citosol con otras organelas de los hepatocitos, la biotransformación ocurre por dos vías: la primera es por hidroxilación de la ZEA para producir α -ZOL y β -ZOL.

Se ha demostrado que la ZEA y sus metabolitos α -ZOL y β -ZOL tienen diferente grado de poder estrogénico. El α -ZOL es 3 ó 4 veces más activo que la ZEA o su isómero β -ZOL debido al parecido topológico con el estradiol y por competir con la unión al receptor estrogénico de células humanas, por lo que puede causar daños a los tejidos con alta tasa de expresión de ese receptor (Zhou y col., 2000). Éstos son catalizados por la enzima 3α - y la 3β -hidroxiesteroide dehidrogenasa respectivamente

y su actividad determina el grado de toxicidad que sufre la especie animal involucrada (Hussein y col., 2001; Malekinejad y col., 2005).

La segunda vía de biotransformación corresponde a la conjugación de la ZEA y sus metabolitos reducidos con ácido glucurónico y catalizados por la enzima uridina difosfato glucuronil transferasa (Olsen y col., 1983). La glucuronidación facilita la pre-eliminación sistémica de la toxina a la vez que prolonga la limpieza total del sistema por medio de la recirculación entero-hepática.

V.2. Efectos biológicos de la zearalenona

En el caso de ZEA y sus metabolitos, los principales efectos nocivos producidos en diferentes animales se deben a trastornos reproductivos. Los animales más afectados por esta toxina son cerdos, corderos, vacunos y equinos (Creppy, 2002). Las alteraciones reproductivas en los animales de producción pueden representar importantes pérdidas económicas debido a los siguientes factores descritos por Gajecki (2002):

- Disminución de la tasa de crecimiento.
- Efectos negativos sobre la reproducción.
- Reducción de la función inmunológica.

Los cerdos son la especie más sensible, especialmente en su etapa pre-púber. La exposición de las hembras a ZEA (>600 mg/kg) durante este período fisiológico, se ha relacionado con la aparición de signos de hiperestrogenismo manifestado por vulvovaginitis, tanto en primerizas como en cerdas gestantes y lactantes. El conjunto de efectos estrogénicos incluyen el descenso en la fertilidad, el incremento en la mortalidad de embriones, y la reducción del tamaño de las camadas y del peso fetal, provocando malformaciones, reabsorción fetal y abortos (Chang y col., 1979; Smith y col., 2005). En lechones lactantes provoca edema y enrojecimiento vulvar y lesiones congénitas de los genitales externos (Figura 4).

El efecto del consumo de ZEA puede afectar negativamente el comportamiento reproductivo, la fertilidad, la tasa de ovulación y generar descensos en la tasa de concepción en vacas de 87 a 62% (Weaver y col., 1986).

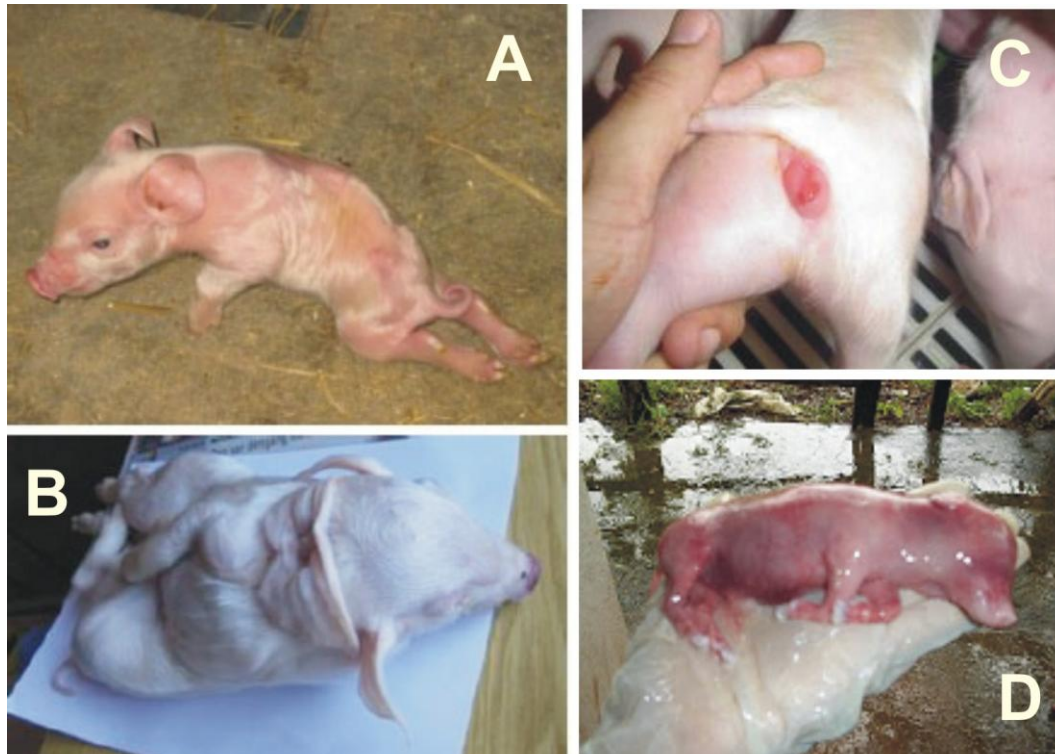


Figura 4. A) y B) Disminución del tamaño y mal formaciones porcinas; C) Vulvovaginitis porcina; D) Mortalidad de embriones y abortos.

Tomado de www.google.com.ar, búsqueda Imágenes/ vulvovaginitis porcina- disminución del tamaño-y-malformaciones porcinas- abortos en porcinos por ZEA.

A nivel celular, algunos estudios han informado que la ZEA es potencialmente citotóxica y genotóxica en diferentes modelos biológicos (Bennett y col., 2003). En respuesta al daño del ADN, las células pueden someterse a una intrincada red de caminos diferentes, incluyendo la apoptosis. Por otro lado, la ZEA se ha relacionado

también al estrés oxidativo como un mecanismo de daño (Hassen, y col., 2007; Zourgi, y col., 2008). También se ha visto que la exposición a la ZEA reduce la viabilidad celular e inhibe la síntesis de proteínas y ADN, aumentando la formación de malondialdehído, un indicador común de daño en membranas (Abid y col., 2004).

Uno de los derivados de ZEA, el α -ZAL, también llamado "zeranol", provoca un mejor aprovechamiento proteico, incrementando la eficiencia de la utilización del nitrógeno proveniente de la dieta y generando una mayor masa muscular con una reducción de la deposición de grasa corporal. En definitiva, mejora la conversión alimenticia e incrementa la ganancia de peso y crecimiento del ganado destinado a consumo (Moore y col., 1989), por lo cual es utilizado como promotor del crecimiento en el ganado, aunque su uso se encuentra prohibido en algunos países. En la Unión Europea, el zeranol está prohibido desde 1985 (EU, 1998). En Estados Unidos, la dosis permitida es de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en músculo y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en hígado (FAO/WHO, 1995), aunque concentraciones de hasta 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en músculo y 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en grasa son consideradas "seguras" en ese país (Code of Federal Regulations, 1999). La peligrosidad del zeranol se debe a su alto poder estrogénico que puede causar estimulación de la proliferación del tejido mamario (Sheffield y col., 1985), inducción de lesiones testiculares (Veeramachaneni y col., 1988; Pérez-Martínez y col., 1996) e inducción de neoplasia hepática (Coe y col., 1992). Por esto, el zeranol presente en los productos cárnicos podría significar el mayor factor de exposición a estrógenos exógenos para los consumidores humanos en los países que lo utilizan, legal o ilegalmente.

Particularmente, en lo que respecta a la ZEA, se ha observado que ha sido principalmente estudiada con un enfoque estrogénico en animales, por lo que su toxicidad es un aspecto que necesita mayor atención, ya que la posibilidad de contaminación en alimentos representa un riesgo toxicológico real para la salud pública y animal. El establecimiento de programas de prevención y control es indispensable para minimizar la exposición a estos compuestos tóxicos y evitar las pérdidas económicas y los efectos nocivos sobre la salud humana y animal.

VI. El ensilaje

El ensilaje es una técnica de preservación de forraje que se logra por medio de una fermentación láctica espontánea bajo condiciones anaeróbicas (Miller, 2001). El forraje fresco de cultivos como maíz, gramíneas, leguminosas, trigo y alfalfa, puede ser conservado por medio del ensilaje en un estado físico parecido al que tenía en el momento de la recolección aunque una gran parte de su composición química se ve modificada por las fermentaciones que sufre. La finalidad de este proceso se logra por medio de una fermentación láctica espontánea bajo condiciones anaeróbicas. Las BAL epifíticas fermentan los carbohidratos hidrosolubles (CHS) del forraje produciendo ácido láctico y en menor cantidad, ácido acético. Al generarse estos ácidos, el pH del material ensilado baja a un nivel que inhibe la presencia de microorganismos que inducen la putrefacción (Weinberg y col., 1996; Merry y col., 1997; Oude Elferink y col., 1999).

El ensilaje de forrajes y granos es una de las alternativas existentes de más fácil elaboración, ya que no demanda una gran infraestructura. Los forrajes ensilados son muy apreciados como alimento animal a nivel mundial. En Argentina, el uso de ensilajes ha cobrado mayor importancia en los últimos 20 años. El incremento de las superficies destinadas a ensilajes de maíz se debe básicamente a tres factores que son el crecimiento del sector lechero, el aumento de las explotaciones que practican el engorde a corral y el proceso de agriculturización que se está ampliando hacia las zonas de cría (www.sagpya.mecon.gov.ar).

VI.1 El proceso del ensilaje

El forraje que se desea ensilar es cosechado por máquinas especialmente diseñadas que cortan y pican el forraje, que luego se transporta y acumula sobre el terreno, o construcciones especiales, según el tipo de silo que se desea construir. Una vez que el material fresco ha sido almacenado, compactado y cubierto para excluir el aire, pronto comienzan a producirse una serie de transformaciones

bioquímicas que al cabo de cuatro o cinco semanas concluyen dando como resultado el producto que se conoce como ensilaje.

El proceso de producción de ensilaje se divide básicamente en cuatro etapas: cosecha, transporte al silo, picado y compactación del material vegetal y sellado hermético. El proceso de transformación del forraje en ensilaje también se divide en diferentes etapas o fases según las transformaciones que van modificando el sustrato, las cuales se detallan a continuación (Weinberg y col., 1996; Merry y col., 1997).

Fase 1 - Fase aeróbica. En esta fase -que dura sólo pocas horas- el oxígeno atmosférico presente en la masa vegetal disminuye rápidamente debido a la respiración de los materiales vegetales y a los microorganismos aeróbicos y aeróbicos facultativos como las levaduras y las enterobacterias. Además hay una actividad importante de varias enzimas vegetales, como las proteasas y las carbohidrasas, siempre que el pH se mantenga en el rango normal para el jugo del forraje fresco (pH 6,5-6,0).

Fase 2 - Fase de fermentación. Esta fase comienza al producirse un ambiente anaeróbico. Dura de varios días hasta varias semanas, dependiendo de las características del material ensilado y de las condiciones en el momento del ensilaje. Si la fermentación se desarrolla con éxito, la actividad BAL proliferará y se convertirá en la población predominante. A causa de la producción de ácido láctico y otros ácidos, el pH bajará a valores entre 3,8 a 5,0.

Fase 3 - Fase estable. Mientras se mantenga el ambiente sin aire, ocurren pocos cambios. La mayoría de los microorganismos de la Fase 2 lentamente reducen su presencia. Algunos microorganismos acidófilos sobreviven este período en estado inactivo; otros, como clostridios y bacilos, sobreviven como esporas. Sólo algunas proteasas y carbohidrasas, y microorganismos especializados continúan activos pero a menor ritmo.

Fase 4 - Fase de deterioro aeróbico. Esta fase comienza con la apertura del silo y la exposición del ensilaje al aire. Esto es inevitable cuando se requiere extraer y

distribuir el ensilaje, pero puede ocurrir antes de iniciar la explotación por daño de la cobertura del silo (p. ej. roedores o pájaros). El período de deterioro puede dividirse en dos etapas. La primera se debe al inicio de la degradación de los ácidos orgánicos que conservan el ensilaje, por acción de levaduras y ocasionalmente por bacterias que producen ácido acético. Esto induce un aumento del pH, lo que permite el inicio de la segunda etapa de deterioro; en ella se constata un aumento de la temperatura y la actividad de microorganismos que deterioran el ensilaje, como algunos bacilos. La última etapa también incluye la actividad de otros microorganismos aeróbicos y facultativos como hongos y enterobacterias. El deterioro aeróbico ocurre en casi todos los ensilajes al ser abiertos y expuestos al aire. Sin embargo, la tasa de deterioro depende de la concentración y de la actividad de los organismos deteriorantes presentes en el ensilaje (Honig y col., 1980; Oude Elferink y col., 1999).

VI.2. Características y ventajas del uso de ensilajes

Un ensilaje de buena calidad debe tener las siguientes características:

- Forraje cosechado en estado de desarrollo apropiado
- pH de 4,2 o menos
- Contenido de ácido láctico entre 5 y 9% en base seca
- Libre de hongos y malos olores como amoníaco, ácido butírico y pudrición
- Ausencia de olor a caramelo o tabaco
- Color verde
- Textura firme

Dentro de las ventajas del uso de los ensilajes se pueden mencionar:

- Suministra forraje succulento de calidad uniforme durante todo el año, principalmente en verano.
- Aumenta la capacidad de carga por hectárea en la finca.
- Es el método más práctico para conservar el valor nutritivo de un forraje.
- Conserva el buen sabor del forraje durante el tiempo de almacenamiento.

- Disminuye la utilización de alimentos concentrados.
- Permite utilizar variedad de equipo y maquinaria para su elaboración.
- Reduce las pérdidas de forraje en las acciones de recolección y manipuleo.

VI.3. El ensilaje como alimento

La importancia del ensilaje como alimento depende de su composición química, digestibilidad y cantidad consumida por el animal. El contenido de elementos nutritivos está dado por la naturaleza del forraje ensilado. La digestibilidad de la materia seca puede ser un poco menor que la del material o forraje verde usado, mientras que la proteína puede disminuir especialmente cuando ocurre sobrecalentamiento en el silo. Por lo demás, los ácidos producidos por las bacterias a expensas de los carbohidratos no producen cambios notables en el contenido total de los elementos nutritivos (Cedeño y col., 1970a, b). El contenido de humedad del forraje es importante para obtener un buen ensilaje; cuando se ensila con mucha humedad, se aumentan las pérdidas por escurrimiento; además, el ensilaje resulta menos palatable y habrá menos consumo. Para la mayoría de los forrajes la humedad óptima para ensilar es de 70 - 73 %.

La utilización de ensilajes posee ventajas que han hecho que sea una práctica de alta aceptación y elección por parte de los ganaderos ya que posee una alta concentración energética, produce un elevado volumen de materia seca por hectárea y genera un menor porcentaje de pérdidas en comparación con otros sistemas de conservación de forrajes. (<http://www.cronicarural.com.ar>).

El ensilaje de maíz cumple un importante rol en los sistemas de engorde intensivo de bovinos y tambos. También se lo utiliza como complemento junto con granos y suplementos proteicos para aumentar la ganancia de peso de los animales en terminación para la venta (Vaz Martins y col., 2006).

VI.4. La microbiota del ensilaje

La microbiota del ensilaje juega un papel clave para el éxito del proceso de conservación. Puede ser dividida en dos grupos principales: los microorganismos benéficos y los microorganismos indeseables. Los microorganismos benéficos son principalmente las BAL. Los indeseables son aquellos organismos que causan el deterioro anaeróbico (por ej. clostridios y enterobacterias) o deterioro aeróbico (levaduras consumidoras de ácido láctico, bacilos *Bacillus* spp., *Listeria* spp. y hongos). Muchos de estos organismos indeseables no sólo reducen el valor nutritivo del ensilaje sino que pueden además afectar la salud de los animales, alterar la calidad de la leche o ambas.

Dentro de las BAL se encuentran aquellas que son homofermentativas, que convierten la glucosa y fructuosa en ácido láctico disminuyendo los valores de pH entre 4 y 5 del forraje y las heterofermentativas, quienes convierten los azúcares en otros productos, de los cuales no todos intervienen para bajar el pH (Hammes y col., 1992; Schleifer y col., 1995).

Las levaduras pueden tener efectos tanto positivos como negativos en los productos fermentados consumidos por los seres humanos y los animales. En la alimentación de los rumiantes, las levaduras son vistas como organismos de descomposición (Jonsson y col., 1984; Woolford y col., 1984; Middelhoven y col., 1988), excepto cuando se utilizan como probióticos (Dawson, 1990; Williams y col., 1990; Williams y col., 1991). Las levaduras entran en el ensilaje como microflora epífita durante la cosecha, y aunque tienden a crecer aeróbicamente mejor, muchas levaduras son fermentadores eficientes de azúcares y no son inhibidas por condiciones de bajo pH. Por lo tanto, pueden prosperar en un ambiente anaeróbico mediante la fermentación de azúcares a alcohol, acetato, y dióxido de carbono. Aunque estos productos pueden contribuir a la preservación en cierta medida del ensilaje (Jonsson y col., 1990), la tasa de disminución en el pH es más lenta que en el caso en que las bacterias del ácido láctico producen la fermentación. Además algunas levaduras parecen jugar un papel significativo en el proceso de deterioro de

ciertos tipos de ensilado hecho de una variedad de cultivos de forraje (Woolford, 1990).

A pesar de que las levaduras se han considerado siempre como microorganismos deteriorantes indeseables en los ensilajes, no todas las especies son capaces de degradar el ácido láctico e inducir el deterioro del forraje. Por el contrario, algunas levaduras no consumidoras de láctico, como ciertas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, incluso pueden producir una proteína que elimina a otras levaduras indeseables y son llamadas "killer yeasts" (levaduras "asesinas") (Kitamoto y col., 1993). Se han utilizado cepas de *S. cerevisiae* con esta propiedad para la conservación de sake y vino (Ouchi y col., 1976; Hara y col., 1981).

VII. Factores que predisponen a la contaminación del ensilaje con hongos y micotoxinas

Las condiciones a campo pueden hacer que la cubierta del silo se rompa (por pájaros, insectos, animales sueltos), entre aire y agua de lluvia, interrumpiendo el proceso de conservación y llevando al desarrollo de microorganismos indeseables (González Pereyra y col., 2008, 2011).

Entre dichos microorganismos se pueden encontrar levaduras que, bajo condiciones anaeróbicas, fermentan azúcares produciendo etanol y CO₂, disminuyendo los niveles de azúcar para la producción de ácido láctico (Schlegel, 1987; McDonald y col., 1991). Bajo condiciones aeróbicas, muchas especies de levaduras degradan el ácido láctico en CO₂ y H₂O, elevando el valor del pH del ensilaje y permitiendo el desarrollo de otros organismos indeseables (McDonald y col., 1991). Entre ellos podemos encontrar además microorganismos anaeróbicos facultativos como las Enterobacterias. Su desarrollo en el ensilaje es perjudicial porque compiten con las BAL por los azúcares disponibles y además pueden degradar proteínas reduciendo el valor nutritivo del ensilaje y produciendo compuestos tóxicos, tales como aminas biogénicas y ácidos grasos de cadena múltiple que tienen un

efecto negativo sobre la palatabilidad del ensilaje (Woolford, 1984; McDonald y col., 1991; Van Os y col., 1996).

En este trabajo nos enfocamos en el desarrollo de hongos contaminantes, centrándonos en *Fusarium* spp. Los hongos son organismos eucarióticos heterótrofos y aeróbicos. Es fácil identificar un ensilaje infestado por hongos, debido a los filamentos de diversos colores y de gran tamaño que producen muchas especies. Los hongos se desarrollan en cualquier sitio del ensilaje donde encuentren oxígeno, inclusive solo trazas. En un buen ensilaje eso ocurre sólo al inicio del almacenamiento y se restringe a la capa exterior de la masa ensilada, pero durante el deterioro aeróbico (Fase 4) todo el ensilaje puede ser invadido por hongos. Las especies que se han identificado más frecuentemente en el ensilaje pertenecen a los géneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Byssochlamys*, *Absidia*, *Arthrinium*, *Geotrichum*, *Monascus*, *Scopulariopsis* y *Trichoderma* (Pelhate, 1977; Woolford, 1984; Frevel y col., 1985; Jonsson y col., 1990; Nout y col., 1993). Los hongos no sólo disminuyen el valor nutritivo y la palatabilidad del ensilaje sino que también constituyen un riesgo para la salud de los animales y las personas. Sus esporas pueden asociarse a afecciones pulmonares y reacciones alérgicas (May, 1993). Otros problemas de salud asociados con los hongos se relacionan con las micotoxinas (Oldenburg, 1991; Auerbach, 1996). Dependiendo del tipo y la cantidad de toxina presente en el ensilaje, los problemas de salud pueden variar desde ligeras molestias digestivas, pequeños problemas de fertilidad y una disminución de las defensas naturales, hasta daños serios al hígado o a los riñones y abortos (Scudamore y col., 1998). Las especies de hongos que producen micotoxinas se encuentran principalmente dentro de los géneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Alternaria* (Pittet, 1998; Osweiler, 2000).

El desarrollo de hongos también puede ocurrir en el forraje mediante la producción de largos filamentos (hifas), responsables de su supervivencia y propagación. La red de hifas forma grumos en el material ensilado. Los hongos de los cereales también producen esporas (conidios) que son capaces de dispersarse por el aire y dentro de los silos donde se almacena el grano. Generalmente, son las masas

de estas esporas las que le dan al hongo un color característico. Las esporas pueden estar latentes durante meses o años, hasta que se presentan las condiciones adecuadas para el desarrollo fúngico (www.knowmycotoxins.com).

Debido a que los niveles de temperatura y humedad son factores claves para el crecimiento de los hongos y la subsiguiente producción de micotoxinas, el clima juega un papel clave en el desarrollo éstas. Los estudios de cosechas muestran grandes variaciones en los niveles de contaminación entre un año y el siguiente, debido a la variación de las condiciones climáticas. Sin embargo, además de las condiciones climáticas, las prácticas agronómicas también tienen un efecto pronunciado sobre la formación de micotoxinas porque afectan la presencia de esporas fúngicas en el campo, así como el crecimiento de los hongos. Se ha demostrado que hay tres factores agronómicos que afectan de manera significativa la presencia y la concentración de las micotoxinas:

- **Presencia y rotación de cultivos:** El monocultivo o la siembra de cultivos muy similares, uno tras otro, aumenta el riesgo de formación de micotoxinas, pues las esporas se transfieren al siguiente cultivo y permiten que se establezca el desarrollo de hongos en forma rápida y fuerte.
- **Cultivo del suelo:** El arar los residuos de la cosecha reduce la contaminación por esporas de la siembra siguiente y, por lo tanto, reduce la infestación fúngica y la formación de micotoxinas. Los sistemas cero labranza aumentan el riesgo.
- **Cultivo y variedad de cultivos:** Las variedades de cultivos que son más resistentes a enfermedades foliares por hongos reducen la infección fúngica y por ende la formación de micotoxinas del cultivo (www.vet.unicen.edu.ar).

VIII. Microorganismos capaces de detoxificar micotoxinas

La detoxificación de las micotoxinas se refiere al conjunto de tratamientos posteriores a la cosecha dirigidos a eliminar o reducir los efectos tóxicos de las

mismas sobre los animales. Según la FAO (1977), el proceso de detoxificación debe cumplir varias condiciones:

- Destruir, inactivar o eliminar la toxina.
- No producir o dejar residuos tóxicos, carcinogénicos ni mutagénicos en los productos finales o en los productos alimentarios obtenidos de animales alimentados con piensos descontaminados.
- Mantener el valor nutritivo y la aceptabilidad del producto.
- No alterar significativamente las propiedades tecnológicas importantes.
- Destruir las esporas fúngicas y micelios para evitar la proliferación y formación nuevas toxinas.

Las estrategias destinadas a destruir, modificar o adsorber las micotoxinas y por ende eliminar o disminuir sus efectos tóxicos pueden dividirse en tres tipos: físicas, químicas y microbiológicas. Los métodos físicos y químicos, tales como el tratamiento con amoníaco o la adición de adsorbentes inorgánicos (Scott, 1998; Huwig y col., 2001), son generalmente caros, drásticos, no específicos o simplemente no adaptados al tratamiento de maíz destinado para el ganado.

La descontaminación biológica mediante la utilización de microorganismos es otra de las estrategias. Utiliza algunas bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus*, *Propionibacterium* y *Bifidobacteria* (El-Nezami y col., 1998, 2000; Gratz y col., 2007), o levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) utilizadas ampliamente en la fermentación de los alimentos (Shetty y col., 2006).

La descontaminación se puede lograr por diferentes mecanismos. Uno es por adsorción o unión microbiana con la toxina, que es posible debido a que las levaduras poseen estructuras en la pared con capacidad para adherir micotoxinas (Stanley y col., 1993; Yoon y col., 1999; Celik y col., 2003). Otro mecanismo es la biotransformación de las micotoxinas en compuestos menos tóxicos, al ser metabolizados por el microorganismo decontaminante (Styriak y col., 2002). Varios trabajos documentan la biotransformación de toxinas de *Fusarium* por los microorganismos del rumen y la microflora intestinal (Kiessling y col., 1984; Kollarczik y col., 1994; Caloni y col., 2000). Por otro lado, también se ha informado la unión de

DON y ZEA a la pared celular de cepas de microorganismos probióticos *in vitro* (El-Nezami y col., 2002a, 2002b). Esta propiedad puede disminuir la biodisponibilidad de estos compuestos mediante la reducción de la absorción y limitar sus efectos tóxicos (El-Nezami y col., 1999).

La degradación biológica de ZEA por diferentes microorganismos ha sido descrita en varios trabajos (Erber, 1996; Megharaj y col., 1997; Duvick y col., 1998; Karlovsky y col., 1999; Kakeya y col., 2002; Takahashi-Ando y col., 2002; Altalhi y col., 2007, 2009; Tinyiro y col., 2011). Sin embargo, la información sobre las diferentes cepas de bacterias y levaduras capaces de detoxificar ZEA es aún escasa, en especial la referida a la degradación de dicha toxina, por lo que se pueden plantear futuros objetivos de investigación con el propósito de desarrollar productos que aporten beneficios sobre la producción y salud animal.

HIPÓTESIS

- Los metabolitos α -ZOL y β -ZOL, al igual que la ZEA, cuando se encuentran contaminando el ensilaje, resisten las condiciones ambientales del proceso de ensilado (pH, anaerobiosis, acción de la microbiota).
- En el ensilaje existen levaduras con capacidad para biotransformar o adsorber ZEA.

OBJETIVOS

I. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la evolución de los niveles de ZEA y sus metabolitos α -ZOL y β -ZOL en silos experimentales, en presencia de microbiota autóctona del ensilaje de maíz en las condiciones ambientales de ensilado en sus diferentes etapas.

II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Producir ZEA *in vitro* a partir de una cepa de *Gibberella zeae* (anamorfo *Fusarium graminearum*), productora de esta toxina.
- Diseñar un modelo experimental de mini-silos bolsa a escala de laboratorio que reproduzca las condiciones de los silos a campo.
- Determinar el porcentaje de materia seca (%MS), porcentaje de humedad (%H), actividad acuosa (a_w), pH, T° y características organolépticas del material ensilado antes y durante la experiencia.
- Contaminar el ensilaje con ZEA previo al armado de los silos y monitorear los niveles de esta toxina durante el período de duración del proceso de ensilado, así como también los niveles de sus metabolitos α -ZOL y β -ZOL por HPLC-MS/MS.
- Realizar un ensayo *in vitro* para determinar si cepas de *S. cerevisiae* nativas aisladas de ensilaje son capaces de biotransformar (degradar) o adsorber ZEA.
- Analizar y evaluar los resultados estadísticamente.

I. MATERIALES

I.1. Microorganismos

- Se trabajó con las cepas de referencia *Fusarium graminearum* Z3636 y *Fusarium graminearum* Z3639 (*Teleomorfo Gibberella zeae*) productoras de zearalenona, depositada en la colección de cepas fúngicas de la Cátedra de Micología de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC).
- Se emplearon dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas a partir de ensilaje de maíz, depositada en la colección cepas fúngicas de la Cátedra de Micología de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC) bajo la denominación RC008 y RC009. Las mismas fueron identificadas morfológicamente según las claves de Kurtzman y Fell (1999) y Pitt y Hocking (1997). La identificación morfológica fue confirmada por métodos moleculares llevados a cabo en el laboratorio del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) EEA de Luján de Cuyo, Mendoza. Las cepas fueron conservadas a -20°C en una suspensión de glicerol al 30%.

I.2. Medios de cultivo

- Caldo extracto de levadura, peptona, glucosa (LPG):

peptona	5 g
extracto de levadura	5 g
glucosa (dextrosa)	40 g
agua destilada	1000 ml

- Medio extracto de malta (EM):

peptona	1 g
extracto de malta	20 g
glucosa (dextrosa)	20 g
agar	20 g
agua destilada	1000 ml

- Medio agar extracto de levadura, peptona, glucosa (LPG):

peptona	5 g
extracto de levadura	5 g
glucosa (dextrosa)	40 g
agar	10 g
agua destilada	1000 ml

A dichos medios se les ajusto el pH a un valor de $6,8 \pm 0,2$ a 25°C y se los esterilizó en autoclave.

I.3. Soluciones

- Solución de extracción y limpieza:

cloruro de sodio (NaCl)	2 g
hexano	80 ml
Metanol:agua (Me:OH) (80:60)	125 ml

- Solución de resuspensión:

benceno:aceto nitrilo (AcN) (98:2)	
------------------------------------	--

- Solución estándar de ZEA: 50 µg/ml

- Solución de corrida en cuba:

Cloroformo:acetona (9:1)	
--------------------------	--

- Solvente de extracción:

acetonitrilo:agua:ácido acético (79:20:1)	
---	--
- Solvente de dilución:

acetonitrilo:agua:ácido acético (20:79:1)	
---	--

- Eluyente A:

acetonitrilo:agua:ácido acético (10:89:1)	
---	--

- Eluyente B:

acetonitrilo:agua:ácido acético (97:2:1)	
--	--

- Solución PBS

cloruro de sodio (NaCl)	8 g
cloruro de potasio (KCl)	0,2 g
fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0,27 g
fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	1,8 g
agua destilada	1000 ml

El pH se ajustó a un valor de 7,4 a 25°C.

- Soluciones de ZEA:
 - 299,00 ng de ZEA en 1 ml de PBS
 - 475,60 ng de ZEA en 1 ml de PBS
 - 1251,00 ng de ZEA en 1 ml de PBS

I.4. Solventes

- Acetona
- Acetonitrilo
- Acido acético
- Benceno
- Cloroformo
- Metanol

I.5. Equipamiento de laboratorio

- Agitador orbital
- Agitador rotatorio GFL 3017
- Ampolla de decantación

- Aspiradora
- Autoclave
- Batea de plástico
- Centrífuga GS-6
- Cuba
- Dispositivo CX2 AQUALAB (Decálogo, Devices, Inc. EE.UU.),
- Estufa a 30°C
- Estufa de aire forzado a 60°C
- Evaporador rotatorio
- Frascos Erlenmeyer de 150 ml y 500 ml
- Hemocitómetro (cámara de Neubauer)
- Lámpara de luz UV
- LC-MS/MS QTrap 4000 (Applied Biosystems, Foster City, CA)
- Microjeringa Hamilton
- Micropipetas
- Molinillo
- Peachímetro
- Pipetas Pasteur
- Tubos de ensayo
- Tubos de centrifuga de 15 ml
- Vaso de precipitado
- Agitador de tubos (Vortex)

I.6. Otros insumos de laboratorio

- Barbijos
- Bolsas de arena
- Bolsas de polietileno de 0,5 mm de espesor de 60 x 90 cm
- Guantes

- Lona
- Papel de filtro Whatman N°2
- Placas de sílica gel sin indicador de fluorescencia
- Precintos
- Tips
- Tubos eppendorf

II. MÉTODOS

II. 1. Producción de zearalenona *in vitro* en cultivo de arroz

La producción de ZEA *in vitro* se realizó según la técnica descrita por Ezekiel y col. (2008) con algunas modificaciones. Se colocaron 50 g de arroz en 18 frascos Erlenmeyer de 500 ml con 20 ml de agua destilada. Se ajustó la a_w a 0,95 y se esterilizaron los frascos en autoclave durante 15 min a 1 atm de presión. Luego de dejarlos enfriar toda la noche, se inocularon 9 frascos con tacos de 5 mm de un cultivo de 7 días de la cepa patrón de *Fusarium graminearum* Z3639 (teleomorfo *Giberella zae*) productora de ZEA y otros 9 frascos con la cepa patrón de *F. graminearum* Z3636 (teleomorfo *Giberella zae*), ambas productoras de ZEA. Se incubaron durante 21 días a 30°C, agitando diariamente los frascos durante los primeros 3 días. Luego de la incubación, se autoclavaron los cultivos y el material inactivado se secó en estufa de aire forzada a 60°C. La toxina, al ser termoestable, no se vio afectada por el calor pero si se inactivó el hongo. Luego del secado del material se molió bajo campana para la posterior cuantificación de los niveles de micotoxina de ambas cepas utilizadas. EL cultivo de la cepa productora de ZEA en arroz es lo que se llamó "núcleo" de ZEA.

II.1.1. Cuantificación de zearalenona

Para medir los niveles de micotoxina de los núcleos logrados se llevo a cabo la técnica de detección y cuantificación de aflatoxinas y ZEA en maíz por TLC descrita en la AOAC (AOAC, 1995, sec. 972-22) con algunas modificaciones. El protocolo se aplicó para los núcleos logrados con ambas cepas productoras *F. graminearum* Z3636 y Z3639, por separado. Para la extracción y limpieza, se tomaron 25 g de muestra y se colocaron en frascos Erlenmeyer de 500 ml junto a 125 ml de una solución de MeOH:H₂O (80:60), 80 ml de hexano y 2 g de cloruro de sodio (NaCl). Las mezclas se agitaron durante 30 minutos en un agitador orbital y se filtraron a través de papel Whatman Nº 2, extrayendo 25 ml de la fase MeOH:H₂O con 25 ml y luego 15 ml de cloroformo, en ampolla de decantación. Los extractos clorofórmicos se juntaron y evaporaron a sequedad en evaporador rotatorio. Al extracto se lo resuspendió en 600 µl de benceno:acetonitrilo (AcN) (98:2), se lo agitó en vórtex y se pasó del balón a un vial y se secó con N₂. Se volvió a re suspender en 200 µl de benceno:acetonitrilo (AcN) (98:2). Los extractos se sembraron practicando spots de 2, 5 y 10 µl en placas de sílica gel sin indicador de fluorescencia. Junto con éstos se sembraron spots de 2, 5, 8 y 10 µl de una solución estándar de ZEA de concentración conocida (50 µg/ml). La corrida se realizó en una cuba con cloroformo:acetona (9:1), se dejó secar y se reveló el cromatograma bajo luz UV a 360 nm y 254 nm. La ZEA se observó como una mancha de color verde con el mismo valor de R_f (marco de referencia) que el estándar de la toxina. La concentración de ZEA presente en los núcleos se calculó de acuerdo a la intensidad de las manchas y en comparación con los estándares. De esta manera se determinó cuál era la cepa que producía más micotoxina.

II.2. Modelo experimental de mini-silos

II.2.1. Contaminación del material vegetal

Se utilizó material para ensilar (planta entera de maíz picada) de un campo local en la zona rural aledaña a la ciudad de Río Cuarto, Córdoba, en la localidad de Chucul. El material se tomó directamente al salir de la máquina picadora, siendo de la misma calidad y origen del utilizado por el productor para la confección de un silo bolsa en el establecimiento ganadero. El material fue llevado al laboratorio y con todos los efectos de protección personal debidamente colocados (guantes, barbijo, cofia, protección ocular) se fraccionó en 8 secciones de 2 Kg cada una. Cada sección se colocó en una batea y se contaminó homogéneamente con 11,22 g de núcleo de ZEA producido por la cepa de *F. graminearum* Z3639 (seleccionada por producir mayor cantidad de toxina). Se homogeneizó mezclando a mano durante 10 min. Se tomaron 3 muestras de 25 g de material vegetal sin contaminar para determinar la existencia de contaminación inicial con ZEA y/o sus derivados.

II.2.2. Armado de los mini-silos

Se confeccionaron 8 mini-silos de 2 kg de material contaminado cada uno. Se los colocó en bolsas de polietileno de 0,5 mm de espesor de 60 x 90 cm y se las compactó sacando la mayor cantidad de aire posible. Se extrajo el aire con una aspiradora y se cerraron inmediatamente las bolsas sin abrirlas, enroscando el extremo y colocando los precintos bien ajustados lo más cerca posible del cuerpo del silo. Con lo que sobraba de bolsa en la punta se la dio vuelta para que la cubierta quedara doble y se cerró el extremo con un nuevo precinto. A continuación, se rotularon los mini-silo de la siguiente manera:

- D7 S1: día 7, silo 1.
- D7 S2: día 7, silo 2.

- D45 S1: día 45, silo 1.
- D45 S2: día 45, silo 2.
- D90 S1: día 90, silo 1.
- D90 S2: día 90, silo 2.
- D120 S1: día 120, silo 1.
- D120 S2: día 120, silo 2.
- D127 S1: día 127, silo 1.
- D127 S2: día 127, silo 2.

Finalmente se colocaron los silos en un lugar fresco, techado y sin humedad, sobre una mesa o tablón separado al menos a 40 cm del suelo, se cubrió con una lona y se les colocaron pesos encima (bolsas de arena) para mantener la compactación (Figura 5). La apertura de los mini-silos se efectuó a los 7, 45, 90, 120 y 127 días de la confección.

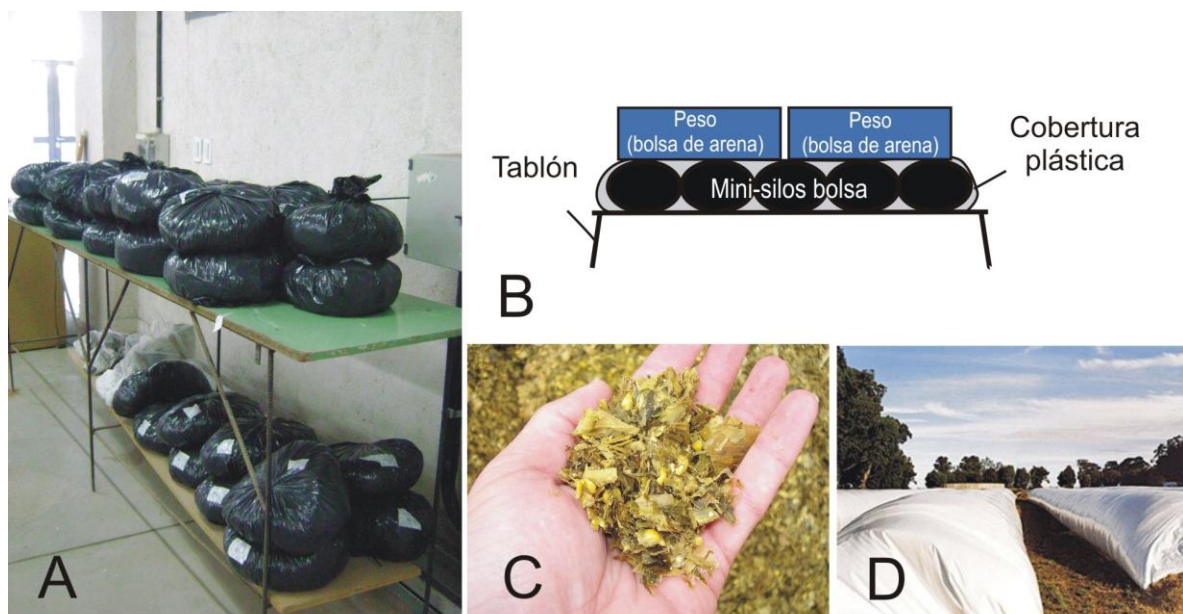


Figura 5. Modelo experimental de mini-silos. A) Mini-silos armados en el laboratorio; B) Diagrama del diseño del modelo de mini-silos; C) Material picado para ensilar (planta entera de maíz); D) Silos bolsa armados en el campo.

II.2.3. Recolección y análisis de las muestras

Los muestreos se planificaron de manera tal que se tomaran muestras representativas de cada una de las diferentes etapas o fases del proceso de ensilaje. Las muestras tomadas en el día 7 representaron el comienzo de la fase de fermentación, las muestras tomadas en los días 45 y 90 representaron la fase estable y las tomadas en los días 120 y 127 representaron la fase de uso del silo para la alimentación de los animales.

Se tomaron 2 muestras de 250 g por cada bolsa, en los días respectivos a cada muestro. Se recolectaron 5 submuestras de distintos puntos (superior, inferior, central) para lograr cada muestra de 250 g. Se abrieron 2 silos por cada día de muestro, se tomaron las muestras y el resto se desechó, excepto en el día 120 donde las bolsas se volvieron a cerrar para tomar las muestras del día 127. Cuando se recolectaron las muestras del día 90, además se abrieron, por un determinado tiempo, los 2 silos restantes para que entre aire y de comienzo al deterioro aerobio. A las muestras tomadas se le determinó la actividad acuosa (a_w) usando un dispositivo CX2 AQUALAB (Decágono, Devices, Inc. EE.UU.), el pH se midió con un peachímetro según Ohyama y col. (1975) y se calculó la diferencia entre peso húmedo y peso seco luego de secar las muestras en estufa de aire forzado a 60°C en bandejas de papel, para determinar su peso seco (% MS) y contenido de humedad (% H). Luego, las muestras se molieron y se pesaron 25 g de cada muestra molida para cuantificar los niveles de ZEA, α -ZOL y β -ZOL por LC-MS/MS según Sulyok y col. (2007). Este análisis se realizó en el Departamento de Agrobiotecnología (Interuniversitäre Department für Agrarbiotechnologie, IFA-Tulln), de la Universidad de Recursos Naturales y Ciencias Naturales de Viena (Universität für Bodenkultur Wien, BOKU), en Tulln, Austria. Para ello se tomaron 2 g de cada muestra y se mezclaron con 2 ml del solvente de extracción compuesto por acetonitrilo:agua:ácido acético (79:20:1 v/v/v). Las mezclas se agitaron durante 90 min en un agitador rotatorio modelo GFL 3017 (GFL, Burgwedel, Germany) y luego se centrifugaron por 2 min a 3000 rpm en una

centrífuga GS-6 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA) de 15 cm de radio. Los extractos se transfirieron a viales de vidrio con pipetas Pasteur y se tomaron alícuotas de 350 μ l que se diluyeron 1:1 con 350 μ l de solvente de dilución compuesto por acetonitrilo:agua:ácido acético (20:79:1 v/v/v). Luego de homogeneizar, se inyectaron 5 μ l de cada extracto diluido en el sistema LC-MS/MS sin tratamiento previo. La detección y cuantificación de las micotoxinas se realizó en un sistema QTrap 4000 LC-MS/MS (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipado con una fuente de iones por electro-spray (ESI) TurboIonSpray y un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) 1100 (Agilent, Waldbronn, Germany). La separación cromatográfica se realizó a 25°C, en una columna Gemini® de C18 (150×4,6-mm i.d., tamaño de partícula 5- μ m,) equipada con un cartucho guarda columna de C18 (diámetro interno 4×3 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, US). Para la fase móvil, se utilizaron 2 eluyentes que contenían 5 mM de acetato de amonio. El eluyente A estuvo compuesto por metanol:agua:ácido acético (10:89:1 v/v/v) y el eluyente B por metanol:agua:ácido acético (97:2:1 v/v/v). Durante la corrida, luego de un tiempo inicial de 2 min a 100% del eluyente A, la proporción del eluyente B se incrementó linealmente a 100% de B en 12 minutos, se mantuvo a esta concentración durante 3 min y luego se reequilibró la columna a 100% de A en 4 minutos. El flujo de la fase móvil fue de 1 ml/min. La ionización ESI-MS/MS se realizó en el modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM) en polaridad positiva y negativa en 2 corridas diferentes por muestra, escaneando 2 reacciones de fragmentación por analito con las siguientes características: fuente de temperatura a 550°C, gas cortina a 10 psi (69 kPa de máxima, 99.5% de nitrógeno), gas fuente de iones 1 (gas de impulsión) a 50 psi (345 kPa de nitrógeno), gas fuente de iones 2 (gas de secado) a 50 psi (345 kPa de nitrógeno), voltaje de spray de iones -4,000 V y +4000 V respectivamente, gas de colisión (nitrógeno) alto. La optimización de los parámetros MS/MS dependientes del analito se realizó mediante la infusión directa de estándares de las micotoxinas (diluidos en una mezcla 1:1 de los eluyentes A y B) en el espectrómetro de masa utilizando una bomba jeringa 11 Plus (Harvard Apparatus,

Holliston, MA, US) a un flujo de 10 µl/min. Los límites de detección (LD) fueron de 0,4 mg/kg para ZEA, 3 mg/kg para α-ZEA y 4 mg/kg para β-ZEA.

II.3. Estudio de la adsorción/biotransformación de ZEA *in vitro* por *Saccharomyces cerevisiae*

Se ensayaron 2 cepas de *S. cerevisiae*, RC008 y RC009, aisladas de ensilado de maíz por su capacidad de adsorber/biotransformar ZEA *in vitro*. Se inocularon 2 frascos Erlenmeyer de 150 ml con *S. cerevisiae* RC008 y RC009 respectivamente en 50 ml de caldo de levadura-peptona-dextrosa (LPD) y se incubaron en agitación durante 48 horas a 25 °C. Se realizó el recuento de la cantidad de células/ml en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y se ajustó la concentración a 10⁸ células/ml. Estos cultivos se trasvasaron a 6 tubos de centrífuga (de 15 ml), 3 tubos para la cepa RC008 y los 3 restantes para la cepa RC009. Se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 min y se lavó 2 veces cada tubo con PBS. Se eliminó el sobrenadante de los tubos y a los pellets obtenidos, se los resuspendió en 1 ml de i) 1251,00 ng/ml de ZEA en PBS, ii) 475,60 ng/ml de ZEA en PBS y iii) 299,00 ng/ml de ZEA en PBS, para cada cepa de levadura. También se hicieron soluciones de ZEA en PBS de las mismas concentraciones y 1 ml de PBS limpio que se utilizó como blanco. Dichas suspensiones celulares se incubaron en agitación durante 1 h a 25 °C y luego se centrifugaron a 8000 rpm durante 20 min. La ZEA libre presente en los sobrenadantes se cuantificó por LC-MS/MS por la metodología de Sulyok et al. (2007), previamente descrita. Como las muestras fueron líquidas, se diluyeron directamente 1:7 (v/v) con una mezcla 1:1 de solvente de extracción y solvente de dilución y se inyectaron en el sistema LC-MS/MS. Se evaluó la presencia de α-ZEA y β-ZEA. Finalmente se calculó la cantidad de ZEA adsorbido/biotransformado por la levadura.

II.4. Estudios estadísticos

Los datos fueron analizados por el modelo general lineal y mixto (MGLM) utilizando el software InfoStat (versión 2012). Los datos obtenidos en los análisis físico-químicos y de micotoxinas se analizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y las medias fueron comparadas por el test de LSD de Fisher ($P < 0,05$).

I. Producción de zearalenona en cultivo de arroz y contaminación de maíz

El cultivo de *F. graminearum* Z3639 en arroz produjo 133,70 µg/g (ppm) de ZEA, mientras que *F. graminearum* Z3636 produjo 0,364 µg/g. Por esto, al ser mayor la concentración de ZEA producida por la cepa Z3639, ésta fue la elegida para la contaminación de los mini-silos. Se contaminaron 2 Kg de maíz picado con 11,22 g del cultivo de arroz contaminado por dicha cepa (que contenía 1500 µg de ZEA) obteniéndose una concentración de aproximadamente 750 µg de ZEA/Kg de ensilaje.

II. Análisis del ensilaje

II 1. Análisis físico-químicos del ensilaje

El aspecto del material ensilado al momento de la apertura de las bolsas seguía manteniendo un color verdoso, textura firme y no se percibió olor a pudrición en los muestreos del día 7 al 90. A pesar de que los 2 últimos silos fueron abiertos en el día 90, por poco tiempo y vueltos a cerrar, cuando se tomaron las muestras los días 120 y 127 estas características no se vieron modificadas. Además, los análisis químicos y físicos de maíz ensilado indicaron que el modelo de mini-silo de laboratorio fue apropiado y que el proceso de ensilaje fue exitoso, dado que los silos mantuvieron una buena calidad en todas las etapas. El pH se redujo favorablemente ($P < 0,05$) de 4,69 a 3,80 durante la fase estable, manteniéndose en los niveles adecuados también durante las fases de fermentación y de alimentación. Con respecto al % de materia seca la variación no fue significativa desde el día 7 al 127, encontrándose los valores entre 24,09 y 26,35 % MS. Lo mismo ocurrió para la a_w y el % H, cuyos valores se mantuvieron relativamente constantes. En el caso de a_w los valores fueron entre 0,97 y 0,98 y para el %H entre 73,65 y 75,90 %, indicando que no hubo una pérdida significativa de materia seca, humedad o agua (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de porcentaje de humedad (%H), porcentaje de materia seca (%MS), actividad acuosa (a_w) y pH encontrados en el ensilaje de maíz durante un experimento *in situ* usando un modelo de silos de laboratorio.

Muestreo	Silo	%H	LSD	%MS	LSD	a_w	LSD	pH	LSD
Día 7	S1	74,04	a	25,95	a	0,98	a	4,19	b
	S2	73,65		26,35		0,98		4,17	
Día 45	S1	73,98	a	26,02	a	0,98	a	4,15	c
	S2	75,90		24,09		0,98		4,11	
Día 90	S1	74,29	a	25,71	a	0,98	a	4,09	c
	S2	75,83		24,16		0,98		4,11	
Día 120	S1	74,98	a	25,01	a	0,97	a	3,83	d
	S2	75,14		24,85		0,98		3,80	
Día 127	S1	75,10	a	24,89	a	0,98	a	4,69	a
	S2	75,10		24,89		0,98		4,69	

Test LSD: Las letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas.

II.2 Determinación de las concentraciones de zearalenona, α -zearalenol y β -zearalenol en ensilaje

La ZEA, α -ZOL y β -ZOL fueron producidos por *F. graminearum* Z3639 en el cultivo de arroz que se utilizó para contaminar el maíz. El seguimiento de los niveles de ZEA y sus derivados por LC-MS/MS a través del experimento, mostró que los niveles de las 3 micotoxinas, con el paso del tiempo, se mantuvieron constantes desde el día 7 hasta el día 127. También se observó que la concentración de ZEA fue mayor que la de sus derivados, y entre ellos 2 la producción de β -ZOL fue mayor que la de α -ZOL. En el día 7 la concentración de ZEA fue de 567,41 $\mu\text{g}/\text{kg}$, menor al resto de los resultados, pero esto puede deberse a una contaminación no homogénea durante su preparación o a un posible error en el muestreo, ya que en el resto de los días de muestreo la diferencia entre ellos fue mínima, indicando que no hay una degradación de ZEA por la microbiota o por las condiciones propias del proceso de ensilaje. También se ve que el ensilaje, antes de ser contaminado, contenía una

concentración mínima, casi despreciable de ZEA debido a contaminación natural. Sin embargo, no se encontraron niveles detectables de sus derivados α -ZOL y β -ZOL (Tabla 3).

Tabla 3. Niveles ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de zearalenona (ZEA), α -zearalenol (α -ZOL) y β -zearalenol (β -ZOL) encontrados en ensilaje de maíz contaminado artificialmente durante un experimento *in situ* mediante un modelo de silos de laboratorio.

Muestreo	ZEA			α -ZOL			β -ZOL		
	Media ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	ES	LDE	Media ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ES	LDE	Media ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ES	LDE
<i>Contaminación natural</i>	2,04	0	a	< LD	0	a	< LD	0	a
<i>Día 7</i>	567,41	124,62	b	28,93	11,50	ab	35,71	3,23	b
<i>Día 45</i>	773,90	162,91	b	18,49	4,40	ab	43,67	7,20	b
<i>Día 90</i>	765,70	72,37	b	15,99	1,08	b	55,32	8,55	b
<i>Día 120</i>	735,20	75,55	b	22,13	4,14	b	52,06	7,48	b
<i>Día 127</i>	737,30	47,48	b	23,56	2,97	b	52,14	2,20	b

ES: Error Standard

Test LDE: Las letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas.

LD: Limite de detección ZEA 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$; α -ZOL 3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; β -ZOL 4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

III. Ensayo *in vitro* de adsorción/biotransformación de zearalenona

El porcentaje de ZEA libre se calculó considerando el control de cada solución de ZEA en PBS como el 100 %, la diferencia entre el 100 % y el porcentaje de ZEA libre fue el porcentaje de adsorción o transformación. Se observó una reducción de la ZEA libre en todos los casos, es decir, que tanto la cepa de *S. cerevisiae* RC008 como

la RC009 pudieron reducir la concentración de ZEA en las diferentes soluciones de PBS. Dado que no se detectaron niveles de α -ZOL ni β -ZOL, la reducción fue atribuida a la adsorción de ZEA a la pared celular de la levadura. La cepa RC008 tuvo mayor capacidad de adsorción de ZEA, hasta un 92,57 %, en la solución de 1251 ng/ml de ZEA. Comparando la capacidad de adsorción de la cepa RC009, en la concentración 1251 ng/ml, esta fue mayor que la obtenida por la cepa RC008, con un valor de 94,37%. La cepa RC009, presentó el mayor porcentaje de adsorción observado, 96,82%, en la solución de concentración intermedia (475,60 ng/ml) de ZEA en PBS, observándose porcentajes menores en las otras dos soluciones (Tabla 4).

Tabla 4. Ensayo *in vitro* del porcentaje de reducción de zearalenona (ZEA) por dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de ensilaje de maíz.

<i>Cepa de levadura</i>	1251 ng/ml de ZEA en PBS			475,60 ng/ml de ZEA en PBS			299,00 ng/ml de ZEA en PBS		
	ZEA libre (ng/ml)	ZEA libre (%)	Adsorción (%)	ZEA libre (ng/ml)	ZEA libre (%)	Adsorción (%)	ZEA libre (ng/ml)	ZEA libre (%)	Adsorción (%)
<i>S. cerevisiae</i> RC008	93,35	7,43	92,57	313,2	65,85	31,15	27,16	9,08	90,92
<i>S. cerevisiae</i> RC009	70,45	5,63	94,37	15,13	3,18	96,82	104,6	34,98	65,02

I. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó el efecto de las condiciones del proceso de ensilado (pH, anaerobiosis, acción de la microbiota) sobre los niveles de ZEA, α -ZOL y β -ZOL en ensilaje de maíz de planta completa, en un modelo de mini-silos bolsa de laboratorio. Se midieron los parámetros físico-químicos del material vegetal ensilado en sus diferentes etapas para corroborar que las condiciones se correspondieran con las del proceso de ensilaje en un silo real. Además, se probó la capacidad de 2 cepas de *S. cerevisiae* aisladas de ensilaje de maíz para adsorber o biotransformar ZEA *in vitro*.

Se diseñó un modelo de mini-silos de laboratorio, de manera tal que se pudieran estandarizar las variables externas, difíciles de controlar en experimentos a campo – tales como la temperatura, humedad, manipulación de las bolsas, integridad de la cubierta de plástico, presencia de animales e insectos - sin afectar las condiciones dentro de los silos. El modelo de mini-silos utilizado resultó muy efectivo para reproducir el proceso de ensilado ya que se lograron mantener las características típicas del ensilaje en las diferentes fases. El pH se redujo favorablemente a los niveles adecuados para un silo bolsa (valores alrededor de 4), permitiendo la conservación del ensilaje y manteniendo intactas las características organolépticas de color, aroma y consistencia durante la fase estable, la fase equivalente a la apertura del silo para su uso e incluso luego de la apertura y exposición al aire. De acuerdo con Hiriart (1998), el silo con un pH de 3,8 - 4,0 permanece estable hasta su apertura. En el presente trabajo, las condiciones favorables se mantuvieron hasta el último muestreo, a pesar de que los últimos dos mini-silos habían sido expuestos por un tiempo al aire, tal vez porque las condiciones en que se desarrolló la experiencia fueron más controladas que en un experimento realizado a campo. Los silos se encontraban en un lugar techado y no a la intemperie, además el tiempo de exposición fue corto y las muestras subsiguientes fueron tomadas a pocos días de la apertura de los silos. Además, el rango de deterioro

depende de la concentración y de la actividad de los organismos que causan deterioro en el ensilaje (Honig y Woolford, 1980; Oude Elferink y col., 1999). Los valores de a_w , % H y % MS se mantuvieron estables en el tiempo, indicando que no hubo pérdida de materia seca, humedad o agua, es decir, que la compactación para retirar el aire de los silos fue adecuada ya que al no quedar aire atrapado en el ensilaje no hubo un desarrollo de microorganismos aerobios que llevara a la pérdida de nutrientes, aumento de la temperatura y diesen comienzo a la descomposición del ensilaje. Los % H obtenidos concuerdan con los obtenidos por Reyes Velázquez y col. (2006) quienes observaron una humedad promedio de 76% en ensilaje de maíz en México. Hunt y col. (1989) establecen que durante los diferentes estadios de maduración del ensilaje de maíz la humedad oscila entre 54,6 – 68,34%. A diferencia de lo observado por Hargreaves y col. (1998), quienes obtuvieron una reducción de materia seca con respecto del material original en silos de laboratorio, en nuestro modelo el % MS se mantuvo indicando que no hubo pérdidas. Según el criterio de Hargreaves y col. (1998), podemos calificar a nuestro modelo de mini-silos como “muy bueno”, ya que también conservó el pH normal (4) además de mantener estables las demás condiciones y no permitir el desarrollo de microorganismos que provocasen descomposición. Trasladado este concepto a los silos a campo, realizar un correcto proceso de ensilado es eficaz para la conservación del ensilaje y prevenir posible desarrollo de mohos y sus toxinas.

Por otro lado, para evaluar que sucede con los niveles de las micotoxinas ZEA, α -ZOL y β -ZOL durante el proceso de ensilado en sus diferentes etapas, se llevó a cabo la contaminación del material vegetal, previo a su ensilado, con un cultivo de una cepa referente productora de ZEA - *F. graminearum* Z3639 – el cual fue esterilizado en autoclave de modo que la formación de toxinas no continuase en los silos. Se observó que esta cepa también produjo - además de ZEA - α -ZOL y β -ZOL en el cultivo y se detectaron niveles moderados de estas toxinas en el ensilaje desde el primer muestreo en el día 7, manteniéndose constantes a lo largo de la experiencia, hasta el último muestreo. De acuerdo a otros autores, tanto ZEA como α -ZOL y β -

ZOL, se pueden encontrar en los cultivos de maíz infectados con *Fusarium* spp., como así también en cultivos de arroz (Bottalico y col., 1985; Richardson y col., 1985). Así, podemos decir que hongos pertenecientes al género *Fusarium* son capaces de producir tanto ZEA como α -ZOL y β -ZOL.

También pudo observarse que las condiciones del proceso de ensilaje no afectaron los niveles de ZEA, indicando que no hay una degradación o biotransformación de ZEA, en α -ZOL y β -ZOL, por parte de la microbiota del ensilaje y/o por las condiciones propias de las diferentes etapas del proceso. La estabilidad de las micotoxinas en el ensilaje ha sido poco estudiada; algunos estudios coinciden con lo obtenido en este trabajo y han demostrado que los niveles de ZEA presentes en el ensilaje sobreviven el proceso de ensilado (Lepom, 1990). En contraste, otros estudios han informado de una disminución en su concentración (Damoglou y col., 1984). Otros trabajos más recientes han demostrado que los lactobacilos fermentativos son capaces de transformar algunas micotoxinas (Styriak y Conkova, 2002; Niderkorn y col., 2007). Como se informó en el trabajo realizado por Zhou y col. (2000), el derivado α -ZOL es 3 ó 4 veces más estrogénico que la ZEA. De acuerdo con esto, podemos afirmar que es una ventaja que la microbiota presente en el ensilaje de maíz no sea responsable de la biotransformación de ZEA y por lo tanto no ocasione un aumento de sus derivados, en especial α -ZOL, que puedan causar severos efectos estrogénicos en los animales alimentados con ensilaje, y pasar desapercibidos en un análisis de rutina, donde normalmente se buscaría sólo ZEA. Sin embargo, como ya vimos, estos derivados también son producidos por el hongo y sus niveles se mantienen en los cultivos como así también en el ensilaje, por lo tanto su detección y cuantificación es muy importante ya que proporcionan un efecto estrogénico adicional al de ZEA en el alimento y puede ser útil en el diagnóstico de trastornos reproductivos en los animales.

En la actualidad, en Argentina no hay límites regulatorios establecidos para la presencia de ZEA y sus derivados, en alimentos o piensos. Sin embargo, las normas internacionales establecidas por la Comisión Europea (CE) pueden ser utilizadas como

referencia para la orientación sobre los niveles aceptables (CE, 2007). Estos se basan en un estudio preparado para la 53^{ra} reunión del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA, 2000), que llegó a la conclusión de que la seguridad de ZEA podría evaluarse en función de la dosis que no tiene efectos hormonales en los cerdos, al ser ésta la especie más sensible. La JECFA estableció una ingesta diaria máxima tolerable provisional (IDMTP) para ZEA de 0,5 mg/kg de peso corporal. Para los alimentos, la CE estableció un límite de 2 mg/g de ZEA en cereales y alimentos hechos en base a cereales; 3 ng/g para los productos del maíz; 0,1 mg/g para alimentos para lechones; 0,25 mg/g para alimentos para las cerdas madres y cerdos de destete; y 0,5 mg/g para alimentos destinados al ganado vacuno, corderos, ovejas, cabras y alimentos complementarios.

Con respecto a la reducción de los niveles de ZEA se vio que las 2 cepas probadas de *S. cerevisiae* aisladas de ensilaje de maíz, fueron capaces de reducir más del 90% de la toxina en solución salina. Después de la incubación de estas 2 cepas de *S. cerevisiae* en diferentes soluciones de ZEA en PBS no se detectaron ninguno de los derivados de ZEA, por lo cual podemos deducir que ni la cepa RC008 ni RC009 fueron capaces de biotransformar esta micotoxina. Por lo tanto, la reducción de los niveles de ZEA observados se debió al fenómeno de adsorción. La capacidad de estas cepas de levadura para reducir los niveles de ZEA y ocratoxina A (OTA) (otra micotoxina, producida por especies del género *Aspergillus*) en una solución salina, ya fue informada por Armando y col. (2011). En este trabajo, se sugirió que el mecanismo por el cual esta reducción se llevó a cabo fue la adsorción debido a diferencias halladas en el grosor de la pared celular de las diferentes cepas encontrando una relación de a mayor grosor, mayor disminución de toxina en la solución. Sin embargo, hasta el presente, no se habían realizado estudios de degradación de ZEA por parte de estas levaduras. Mediante el presente estudio, pudimos confirmar que la disminución de la toxina no se debe a la degradación de la misma ya que ninguna de las 2 cepas logró biotransformarla. Al igual que lo informado por Armando y col. (2011), se observó que la cepa RC009 tuvo mayor

capacidad de adsorción que la cepa RC008, y su mayor porcentaje se observó en la concentración intermedia de ZEA (475,60 ng/ml), siendo un resultado esperado ya que a medida que va aumentando la concentración de ZEA los sitios de unión se saturan y ya no están disponibles para seguir adsorbiendo, quedando una mayor concentración de toxina libre en la solución aumentando así la proporción de ZEA libre en el sobrenadante, resultando en un menor porcentaje de adsorción en las soluciones de concentración muy elevada. La unión de las micotoxinas a la superficie de las levaduras se atribuye a la presencia de glucanos en la composición de su pared celular. La relación entre la proporción de β -D-glucanos en la pared celular y el porcentaje de adsorción de ZEA, aflatoxina B₁ (AFB₁), deoxynivalenol (DON), patulina (PAT) y OTA fue demostrado por Yiannikouris y col. (2004). La unión de ZEA y otras micotoxinas tales como aflatoxina y OTA a la superficie celular de las levaduras se ha informado anteriormente en varios estudios a nivel mundial (Raju y Devegowda, 2000; Bejaoui y col., 2004; Yiannikouris y col., 2004; Shetty y Jespersen, 2006; Bueno y col., 2007; Shetty y col., 2007; Armando y col., 2011, 2012, Dogi y col., 2011). Sin embargo, el estudio de cepas autóctonas de bacterias y levaduras como *S. cerevisiae* con capacidad de detoxificar ZEA, aisladas de los ecosistemas de nuestra región, es muy importante para el desarrollo de productos de industria nacional que sean aplicables al desarrollo y mejoramiento de la producción ganadera local y regional.

En conclusión, este estudio reveló que los niveles de ZEA, α -ZOL y β -ZOL, cuando se producen en el campo, se pueden mantener invariables en el material ensilado durante todo el proceso de ensilaje. La microbiota del ensilaje y las condiciones, como temperatura, a_w , bajo pH y la falta de oxígeno, no afectan positivamente o negativamente los niveles de estas micotoxinas en ninguna de las fases del ensilaje. Un buen proceso de ensilado puede impedir el crecimiento de hongos productores de micotoxinas. Sin embargo, si éstas ya están presentes en el material vegetal en niveles moderados a altos, tanto ZEA como sus derivados no se degradan en el silo.

Por otro lado, se demostró que existen cepas de *S. cerevisiae* nativas de ensilaje que son capaces de adsorber ZEA a su pared celular y que no biotransforman esta micotoxina a derivados igualmente o más estrogénicos. Esto podría constituir una ventaja en alimentos contaminados, ya que reduce la biodisponibilidad de la toxina disminuyendo la cantidad que es absorbida en el intestino de los animales. Es importante destacar que la capacidad de reducir niveles de micotoxinas de las cepas estudiadas, está relacionada a la adsorción y no a la biotransformación, ya que en el caso de ZEA si es biotransformada en sus derivados, especialmente α -ZOL, no se podría estar considerando como una detoxificación ya que éste es más estrogénico que la toxina original. Por este motivo, las cepas RC008 y RC009 de *S. cerevisiae* son posibles candidatos para la formulación de aditivos alimentarios de bajo costo, seguros y con bajo impacto sobre el medio ambiente, para la reducción de micotoxinas en los silos, especialmente en los países en desarrollo como el nuestro, donde la aplicación de otras estrategias de detoxificación es más costosa y menos probable.

I. Conclusiones

- El modelo de mini-silos de laboratorio fue eficaz para reproducir las condiciones del proceso de ensilado, conservando la buena calidad del ensilaje en todas las etapas, reduciendo el pH a valores entre 3 y 4, sin pérdidas de materia seca o humedad.
- Los niveles de ZEA, α -ZOL y β -ZOL se mantuvieron constantes en el material ensilado durante todo el proceso indicando que la microbiota del ensilaje y las condiciones del proceso de ensilado - temperatura, a_w , bajo pH y la falta de oxígeno - no afectan positivamente o negativamente los niveles de micotoxinas en ninguna de las fases del proceso.
- Por lo anterior, se deduce que un buen proceso de ensilado puede impedir el crecimiento de hongos productores de micotoxinas; sin embargo, si existen niveles moderados a altos de ZEA y sus derivados en el material vegetal previo al ensilado, éstos no se reducirían en el silo.
- Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* RC008 y RC009, aisladas de ensilaje de maíz, son capaces de adsorber ZEA a su pared celular *in vitro* y no biotransformar esta toxina a α -ZOL y β -ZOL. Esto podría ser una ventaja, ya que reduce la biodisponibilidad de la toxina para ser absorbida en el intestino de los animales, sin producir derivados estrogénicos.
- La cepa de *S. cerevisiae* RC009 posee mayor capacidad de adsorción que la cepa RC008, lo cual se condice con estudios previos que indican que posee una pared celular de mayor grosor.
- Las cepas de *S. cerevisiae* RC008 y RC009 poseen el potencial de ser utilizadas en la formulación de aditivos alimentarios microbianos destinados a los animales de producción, para reducir los niveles de ZEA en alimentos contaminados con bajos niveles.
- El desarrollo de aditivos basados en microorganismos beneficiosos, en vez de productos químicos para reducir los niveles de micotoxinas, es una opción más

segura, de bajo costo y mínimo impacto ambiental, para la reducción de micotoxinas en los silos, especialmente en los países en desarrollo como el nuestro, donde la aplicación de otras estrategias de detoxificación es menos probable.

II. Perspectivas futuras

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, dan pie a que se lleven a cabo nuevas experiencias apuntadas a estudiar la variación de los niveles de diferentes micotoxinas a lo largo del proceso de ensilado; el efecto que posee sobre ellas la microbiota nativa del material vegetal ensilado o microorganismos introducidos artificialmente como inoculantes para mejorar la fermentación y microorganismos utilizados como adsorbentes/degradadores de micotoxinas. Además, el hallazgo de microorganismos capaces de adsorber micotoxinas en el ensilaje nos alienta a buscar nuevos microorganismos capaces de decontaminar otras micotoxinas en diferentes tipos de sustratos y de ecosistemas, tales como el suelo, otros alimentos fermentados o plantas de tratamiento de efluentes. De esta forma, se lograría avanzar aun más en los estudios apuntados a formular un suplemento alimentario microbiano para ser aplicado en nuestra región y de esta manera, evitar pérdidas económicas a los productores agropecuarios, mejorando la rentabilidad y productividad del sector.

BIBLIOGRAFÍA

Abid, S., Ouanes, Z., Hassen, W., Baudrimont, I., Creppy, E. y Bacha, W., 2004. Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicology in vitro* 18: 467-474.

Altalhi, A.D. y El-Deeb, B., 2007. Localization of zearalenone detoxification gene(s) in pZEA-1 plasmid of *Pseudomonas putida* sp. strain ZEA-1 and expressed in *Escherichia coli*. *Malaysian Journal of Microbiology* 3(2): 29-36.

Altalhi, A.D. y El-Deeb, B., 2009. Localization of zearalenone detoxification gene(s) in pZEA-1 plasmid of *Pseudomonas putida* ZEA-1 and expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Hazardous Materials* 161(2-3): 1166-1172.

Alexopoulos, C.J. y Mims, W.C., 2000. *Introducción a la Micología*. Omega. Barcelona España. p. 240.

Aoki, T. y O'Donnell K., 1999. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. *Mycologia* 91: 597-609.

Armando, M.R., Dogi, C.A., Pizzolitto, R.P., Escobar, F., Peirano, M.S., Salvano, M.A., Sabini, L.I., Combina, M., Dalcerro A.M. y Cavaglieri L.R., 2011. *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environmental with aflatoxin B1 binding ability and antipathogenic bacteria influence in vitro. *World Mycotoxin Journal* 4: 59–68.

Armando, M.R., Pizzolitto, R.P., Dogi C.A., Cristofolini A., Merkis C., Poloni V., Dalcerro A.M. y Cavaglieri L.R., 2012. Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. *Journal of Applied Microbiology* 113(2): 256-264.

Auerbach, H., 1996. Verfahrensgrundlagen zur Senkung des Risikos eines Befalls von Silagen mit *Penicillium roqueforti* und einer Kontamination mit Mykotoxinen dieses Schimmelpilzes. *Landbauforschung Volkenrode, Sonderheft* 168: 1-167.

Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P. y Lebrihi, A., 2004. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology* 97: 1038–1044.

Bennett, J.W. y Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review* 16: 497-516.

Betina, V., 1989. Mycotoxins: chemical, biological and environmental aspects. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands, p. 437

Booth, C., 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycology Institute, Kew, Surrey, England p. 237.

Bottalico, A., Visconti, A., Logrieco, A., Solfrizzo, M. y Mirocha, C.J., 1985. Occurrence of zearalenols (diastereomeric mixture) in corn stalk rot and their production by associated *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 547–551.

Bueno, D.J., Casale, C.H., Pizzolitto, R.P., Salvano, M.A. y Oliver, G., 2007. Physical adsorption of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model. *Journal of Food Protection* 70(9):2148-54.

Burgess, L.W., Nelson, P.E., Toussoun, T.A. y Cook R.J., 1981. General ecology of the fusaria. *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy*. Pennsylvania State University Press, University Park p. 225-235.

Burgess, L.W., Liddell, C.M. y Summerell, B.A., 1988a. Laboratory Manual for *Fusarium* Research, 2nd Edition. Department of Plant Pathology and Agricultural Entomology, University of Sydney, Australia p. 156.

Burgess, L.W., Nelson, P.E., Toussoun, T.A. y Forbes, G.A., 1988b. Distribution of *Fusarium* species in sections Roseum, *Arthrosporiella*, *Gibbosum*, and *Discolor* recovered from grassland, pasture, and pine nursery soils of eastern Australia. *Mycologia* 80: 815-824.

Burmeister, H.R. y Vesonder, R.F., 1990. Production of a novel steroid sulfate metabolite 4,4,24-trimethyl-cholesta-8,14,24-28-trien-2- α -3- β -11- α -12- β -tetrol-12-acetate-3-sulfate by *Fusarium* species and its biological activity. Applied and Environmental Microbiology 56: 3209-3212.

Caloni, F., Spotti, M., Auerbach, H., Op den Camp, H., Gremmels, J.F. y Pompa, G., 2000. In vitro metabolism of fumonisin B1 by ruminal microflora. Veterinary Research Communications 24: 379–387.

Cedeño, G., 1970a. Silos y ensilajes. Instituto Colombiano Agropecuario, (ICA). Bogotá, Colombia p. 16.

Cedeño, G., Acosta, O., Rubio, R., Waugh, R., 1970b. Silos y ensilaje. En Ganado de Leche. Instituto Colombiano Agropecuario, (ICA). Bogotá, Colombia P. 47-70.

Celik, K., Denli, M. y Savas, T., 2003. Reduction of Toxic Effects of Aflatoxin B1 by Using Baker Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in Growing Broiler Chicks Diets Revista brasileira de Zootecnia 32: 615-619.

Chang, C.F., Huff, W.E. y Hamilton, P.B., 1979. A leucocytopenia induced in chickens by dietary ochratoxin A. Poultry Science 58: 555-558.

Code of Federal Regulations (CFR) USA (1999) Food and drugs, 21, ch. I, part 556.240. Government Printing Office, Washington DC, USA. http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_99/21cfrv6_99.html.

Coe, J.E., Ishak, K.G., Ward, J.M. y col., 1992. Tamoxifen prevents induction of hepatic neoplasia by zeranol, an oestrogenic food contaminant. Proceedings of the National Academy Sciences. USA 89: 1085–1089.

Council for Agricultural Science and Technology (CAST), 2003. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems, Task Force Report N°139, Ames, Iowa, USA.

Creppy, E.E., 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127: 19-28.

Crónica Rural. (<http://www.cronicarural.com.ar>).

Dalceró, A., Magnoli, C., Chiacchiera, S., Palacios, G. y Reynoso, M., 1997. Mycoflora and incidence of aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia* 137(3): 179-184.

Damoglou, A.P., Shannon, W., Downey, G.A., 1984. The interaction between *Fusaria* and their mycotoxins in grass silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 35: 279–284.

Dawson, K.A., Newman, K.E. y Boling, J.A., 1990. Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage fed ruminal microbial activities. *Journal of Animal Science* 68: 3392.

Denli, M. y Perez, J.F., 2006. Contaminación por micotoxinas en los piensos: efectos, tratamiento y prevención. En: XXII Curso de Especialización FEDNA (Fundación Española Para el Desarrollo De La Nutrición Animal). Barcelona, 16 y 17 Octubre de 2006.

Dogi, C.A., Armando, R., Ludueña, R., de Moreno de LeBlanc, A., Rosa C.A.R., Dalceró A. y Cavaglieri L., 2011. *Saccharomyces cerevisiae* strains retain their viability and aflatoxin B₁ binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation. *Food Additives and Contaminants Part A Chemistry, Analysis, Control Exposure and Risk Assessment* 28(12): 1705-11.

Duvick, J. y Rood, T.A., 1998. Zearalenone detoxification compositions and methods. US Patent 5,846,812. In: Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C. and Bryant M.C., 2006. Food Mycotoxins: An Update. *Journal of Food Science* 71 (5): 51-65.

El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S. y Ahokas, J., 1998. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology* 36: 321-326.

El-Nezami H., Mykkanen H., Kankaanpaa P., Salminen S. y Ahokas J., 1999. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B1, from the chicken duodenum. *Journal of Food Protection* 63:549–552.

El-Nezami, H., Mykkänen, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S. y Ahokas, J., 2000. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B1 from the chicken duodenum. *Journal of Food Protection* 63: 549-552.

El-Nezami H., Chrevatidis A., Auriola S., Salminen S. y Mykkanen H., 2002a. Removal of common *Fusarium* toxins in vitro by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Additives and Contaminants* 19: 680–686.

El-Nezami H., Polychronaki N., Salminen S. y Mykkanen H., 2002b. Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative alpha-zearalenol. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3545–3549.

Erber, E., 1996. Patent WO 96/12414 Erber Erich KG (Austria).

European Union (EU), 1998. Development, validation and harmonisation of screening and confirmatory tests to distinguish zearanol abuse from *Fusarium* toxin contamination in food animals. <http://ec.europa.eu/research/agro/fair/en/uk3443.html>. Último acceso: 05/08/2013.

Ezekiel, C.N., Odebode, A.C. y Fapohunda, S.O., 2008. Zearalenone Production by Naturally Occurring *Fusarium* Species on Maize, Wheat and Soybeans from Nigeria. *Journal of Biological and Environmental Science* 2(6): 77-82.

Facultad de Veterinaria – Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. (<http://www.vet.unicen.edu.ar>)

FAO-WHO. 1995. Codex Alimentarius Commission, ALINORM 95/21, part I. http://apps.fao.org/CodexSystem/vetdrugs/vetd_q-e.htm.

FAO-WHO-UNEP. 1977. Global perspective on mycotoxins. MYC Document of 4th Conference on Mycotoxins. Nairobi, Kenya, 19-27 September.

Farber, J.M. y Sanders., W.G., 1986. Production of fusarin C by *Fusarium spp.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 34: 963-966.

Finch, H.C. y Finch, A.N. 1983. Los Hongos Comunes que Atacan Cultivos en América Latina. Trillas. México p. 58.

Francis, R.G. y Burgess, L.W., 1975. Surveys of fusaria and other fungi associated with stalk rot of maize in eastern Australia. Australian Journal of Agricultural Research 26:801-807.

Francis, R.G. y Burgess, L.W., 1977. Characteristics of two populations of *Fusarium roseum* 'Graminearum' in eastern Australia. Transactions of the British Mycological Society 68:421-427.

Frevel, H.J., Engel, G. y Teuber, M., 1985. Schimmelpilze in Silage und Rohmilch. Milchwissenschaft 40: 129-132.

Gajecki, M., 2002. Zearalenone-undesirable substances in feed. Polish Journal of Veterinary Sciences 5(2): 117-122.

Gajecki, M., Gajecka, M., Jakimiuk, E., Zielonk, L. y Obremski, K. 2010. Zearalenone: Undesirable substance. En: Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons. Rai, M., Varma, A. (Editions). Springer-Verlag, Berlin, p. 131-144.

Galarza, M.J.M., Miramontes, P.U., Muñoz, P.D., Hernández, R.G., 2004. Situación Actual y Perspectiva del Maíz en México. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. México D. F. Pág. 102. Disponible en Internet. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>. Consulta: febrero 17. 2009

Galvano, F., Rietieni, A., Piva, G. y Pietri, G., 2005. Mycotoxins in human food chain. In: The Mycotoxin Blue Book (Díaz, D.E., edition). Nottingham University Press p. 187-224.

González Pereyra, M.L., Alonso, V.A., Sager, R., Morlaco, M.B., Magnoli, C.E., Astoreca, A.L., Rosa, C.A.R., Chiacchiera, S.M., Dalcero, A.M. y Cavaglieri, L.R., 2008. Fungi and selected mycotoxins from pre- and post- fermented corn silage. *Journal of Applied Microbiology* 104(4): 1034-1041.

Gordon, W.L., 1959. The occurrence of *Fusarium* species in Canada. VI. Taxonomy and geographic distribution of *Fusarium* species on plants, insects, and fungi. *Canadian Journal of Botany* 37: 257-290.

Gratz, S., Wu, Q.K., El-Nezami, H., Juvonen, R.O., Mykkänen, H. y Turner, P.C., 2007. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG reduces aflatoxin B1 transport, metabolism, and toxicity in caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 3958-3964.

Gray, J.S., Martin, G.C.J. y Rigby, W., 1967. Aurofusarin. *Journal of the Chemical Society* 1967(C): 2580-2587.

Hammes, W.P., Weiss, N., y Holzapfel, W., 1992. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*, in: Balows y col., 1992, p. 1535-1594.

Hara, S., Iimura, Y., Oyama, H., Kozeki, K., Kitano, K. y Otsuka, K., 1981. The breeding of cryophilic killer wine yeasts. *Agricultural and Biological Chemistry* 45: 1327-1334.

Hassen, W., Ayed, I., Azqueta, A., De Cerain, A. y Bacha, H., 2007. The role of oxidative stress in zearalenone- mediated toxicity in Hep G2 cells: Oxidative DNA damage, glutathione depletion and stress proteins induction. *Toxicology*, 232: 294-302.

Hargreaves A., Butendieck, N. y Hiriart, M., 1998. Comparison of two experimental silos for silage research.

Heffron, J., 1999. Endocrine disrupters. Are they an insidious risk to health. *Biochemistry* 199: 28-31.

Hidy, P.H., Baldwin, R.S., Greasham, R.L., Keith, C.L. y McMullen, J.R., 1977. Zearalenone and some derivatives: Production and biological activity. *Advances in Applied Microbiology* 22: 59-82.

Hiriart Le-Bert, M., 1998. Ensilados, procedimientos y calidad. Editorial Trillas. S.A de C.V. México DF. p. 5-95.

Honig, H., y Woolford, M. K., 1980. Changes in silage on exposure to air. in: Thomas C., (edition) Forage Conservation in the 80s. BGS Occasional Symposium, No.11. Hurley, UK: British Grassland Society. p. 76-87.

Hunt, C.W., Kezar, W. y Vinande, R., 1989. Yield, chemical composition and ruminal fermentability of corn whole plant, ear, and stover as affected by maturity. *Journal of Production Agriculture* 2: 357-361.

Hussein, H.S. y Brasel, J.M., 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167: 101-134.

Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O. y Dutler, H., 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters* 122:179–188.

JECFA (2000) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 53rd Report. Safety evaluation of certain food additives. WHO Food Additives Series 44.

Jonsson, A. y Pahlow, G., 1984. Systematic classification and biochemical characterization of yeasts growing in grass silage inoculated with *Lactobacillus* cultures. *Animal Research and Development* 20: 7-22.

Jonsson, A., Lindberg, H., Sundas, S., Lingvall, P., y Lindgren, S., 1990. Effect of additives on quality of big-bale silage. *Animal Feed Science and Technology* 31: 139-155.

Takeya, H., Takahashi-Ando, N., Kimura, M., Onose, R., Yamaguchi, I. y Osada, H., 2002. Biotransformation of the mycotoxin, zearalenone, to a non-estrogenic compound by Fungal strain of *Clonostachys* sp. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 66: 2723– 2726.

Karlovsky P., 1999. Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Natural Toxins* 7 (1):1-23.

Kiessling, K.H., Pettersson, H., Sandholm, K. y Olsen, M., 1984. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 47:1070–1073.

Kitamoto, H.K., Ohmomo, S. y Nakahara, T., 1993. Selection of killer yeasts (*Kluyveromyces lactis*) to prevent aerobic deterioration in silage making. *Journal of Dairy Science* 76: 803–811.

Know Mycotoxins. Diagnostico aves
(<http://www.knowmycotoxins.com/es/vpoultry6.htm>).

Kollarczik, B., Gareis, M. y Hanelt, M. 1994. In vitro transformation of the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone by the normal gut microflora of pigs. *Natural Toxins* 2: 105–110.

Kurtzman, C.P. y Fell, J.W., 1998. (Eds.) *The Yeast: A Taxonomic Study*, 4th edn, revised and enlarged. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publisher.

Lepom, P., 1990. Occurrence of Fusarium species and their mycotoxins in maize. 6. Formation of zearalenone and trichothecenes type A by indigeneous Fusarium isolates. *Archives of Animal Nutrition* 38: 799–806.

Leslie, J.F. y Summerell, B.A., 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Professional, Ames, Iowa. *Mycotoxin Research* 22: 73-74.

Malekinejad, H., Maas-Bakker, R.F., Fink-Gremmels, J., 2005. Bioactivation of zearalenona by porcine hepatic biotransfortmation. *Veterinary Research* 36(5-6): 799-810.

Marasas, W.F.O., Nelson, P.E., y Toussoun, T.A., 1984. *Toxigenic Fusarium Species: Identity and Mycotoxicology*. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.

May, J.J., 1993. Respiratory problems associated with work in silos. in: Proc. NRAES National Silage Production Conference. Syracuse, USA, 23-28 February 1993 p. 283-290.

McDonald, P., Henderson, A.R., y Heron, S.J.E., 1991. *The Biochemistry of Silage*. 2nd edition. Marlow, UK: Chalcombe Publications.

Megharaj, M., Garthwaite, I. y Thiele, J.H., 1997. Total biodegradation of the oestrogenic mycotoxin zearalenone by a bacterial culture. *Letters Applied Microbiology* 24: 329–333.

Mendoza, E.M., López, B.A.O., Oyervides, G.A., Martínez, Z.G., De León, C. y Moreno, M.E. 2003. Herencia genética y citoplásmica de la resistencia a la pudrición de la mazorca de maíz (*Zea mays* L.) causada por *Fusarium moniliforme* Sheld. Revista Mexicana de Fitopatología 21: 267-271.

Merry, R.J., Lowes, K.F. y Winters, A., 1997. Current and future approaches to biocontrol in silage. in: Jambor y col., 1997. p. 17-27.

Middelhoven, W.J. y Van Baalen, A.H.M., 1988. Development of the yeast flora on Whole-crop maize during ensiling and subsequent aerobiosis. Journal of the Science of Food and Agriculture 42: 199-207.

Miller, J.J., 2001. Impact of intensive livestock operations on water quality. Proc. Western Canadian. Dairy Seminar 13: 405-416.

Mirocha, C.J., Pathre, S.V. y Robison, T.S., 1981. Comparative metabolism of zearalenone in and transmission into bovine milk. Food Cosmetics and Toxicology 19: 25-30.

Mirocha, C.J., 1979. Trichotecene Toxins Produced by *Fusarium* in Conference on Mycotoxins in Animal Feeds Grains Related to Animal Health. W. Shimoda (Edition). PB-300 300. Food Drug Administration, Rockville, M.D., June 8, report FDA/BVM-79/139, p. 288-373.

Moore, C.P., y Lemieux, P.G., 1989. Influencing animal growth and carcass composition by using the zeranol implant. Beef Cattle Science Handbook 22: 388-395.

Moss, M.O. y Smith, J E., 1984. The Applied Mycology of *Fusarium*: Symposium of the British Mycological Society held at Queen Mary College London, September 1982-2011 p. 264.

Nayara, S.C., Wulff, E.G., Udayashankar, A.C., Nandini, B.P., Niranjana, S.R., Mortensen, C.N. y Prakash, H.S. 2011. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90: 1625-1639.

Nelson, P.E., Dignan, M.C. y Anaissie, E.J., 1994. Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews* 7: 479-504.

Niderkorn, V., Morgavi, D.P., Pujos, E., Tissandier, A. y Boudra, H., 2007. Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an in vitro simulated corn silage model. *Food Additives and Contaminants* 24: 406–415.

Nout, M.J.R., Bouwmeester, H.M., Haaksma, J., y Van Dijk, H., 1993. Fungal growth in silages of sugar beet press pulp and maize. *Journal of Agriculture Science* 121: 323-326.

Oldenburg, E., 1991. Mycotoxins in conserved forage. in: Forage conservation towards 2000. Proc. European Grassland Federation Conference. Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Volkenrode. Landbauforschung Volkenrode Sonderheft, No.123. p. 191-205.

olkan, H.A., Dianese J.C. y Cupertino, F.P., 1979. Pineapple flowers as principal infections sites for *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Plant Disease Reporter* 63: 655-657.

Olsen, M. y Kiessling, K.H., 1983. Species differences in zearalenone-reducing activity in subcellular fraction of liver from female domestic animals. *Acta of Pharmacology and toxicology* 52(4): 287-291.

Ouchi, K., Wickner, R.B., Toh-e, A. y Akiyama, H., 1976. Breeding oíkiller yeast forsake brewing by cytoduction. *Journal of Fermentation Technology* (57) 483-487.

Oude Elferink, S.J.W.H., Driehuis, F., Krooneman, J., Gottschal, J.C., & Spoelstra, S.F., 1999. *Lactobacillus buchneri* can improve the aerobic stability of silage via a novel fermentation pathway, the anaerobic degradation of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol. in: Pauly, 1999. p. 266-267.

Osweiler, G.D., 2000. Mycotoxins. contemporary issues of food animal health and productivity. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 16: 511–530.

Pathre, S.V., Gleason, W.B., Lee, Y.W. y Mirocha, C.J., 1986. The structure of fusarochromanone, a new mycotoxin from *Fusarium roseum graminearum*. *Canadian Journal of Chemistry* 64: 1308-1311.

Pedersen, P.B. y Miller, J.D., 1999. The fungal metabolite culmorin and related compounds. *Natural Toxins* 7: 305-309.

Pelhate, J., 1977. Maize silage: Incidence of moulds during conservation. *Folia Veterinaria Latina* 7: 1-16.

Peraica, M., Radic, B., Lucic, A. y Pavlovic, M., 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of World Health Organ* 77: 754-766.

Pérez-Martínez, C., García-Iglesias, M.J., Ferreras-Estrada, M.C. y col., 1996. Effects of in-utero exposure to zeranol or diethylstilboestrol on morphological development of the fetal testis in mice. *Journal of Comparative Pathology* 114: 407–418.

Pitt, J.I. y Hocking, A.D., 1997. *Fungi and Food Spoilage*, 2nd edn. London: Blackie Academic and Professional.

Pittet, A., 1998. Natural occurrence of mycotoxins in food and feeds. An updated Review. *Medicine and Veterinary* 49: 479–492.

Pujol, I., Guarro, J., Gene, J. y Sala, J., 1997. *In vitro* antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 39: 163-167.

Raju, M.V.L.N. y Devegowda, G., 2000. Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *British Poultry Science* 41 (2000): 640–650.

Ramirez, M.L., Chulze, S. y Magan, N., 2006. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. *International Journal of Food Microbiology* 106: 291–296.

Resnik, S., Neira, S., Pacin, A., Martinez, E., Apro, N. y Latreite, S., (1996). A survey of the natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in Argentine field maize: 1983-1994. *Food Additives and Contaminants* 13: 115-120.

Reyes Velázquez, W., Jiménez, P.C., Rojo, F., Figueroa Gómez, M., Hernández Góbora, J., Landeros Ramírez, P., López, L.Y., Isaías Espinosa, V., Palacios De Lucas, E. y Carlos Juárez, W., 2006. Evaluación de la calidad nutricional y contaminación por hongos y micotoxinas en el ensilado destinado al consumo animal. *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA* p. 813-818.

Richard, J.L., 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses an overview. *International Journal of Food Microbiology* 119: 3-10.

Richardson, K.E., Hagler, W.M. y Mirocha, C.J., 1985. Production of zearalenone a- and b-zearalenol and a- and b-zearalanol by *Fusarium* spp. in rice culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33: 862–866.

Riley, R. y Pestka, J., 2005. Mycotoxins: metabolism mechanisms and biochemical markers. In: *The mycotoxin Blue Book*. (Díaz, D.E., edition). Nottingham University Press p. 279-294.

Schlegel, H.G. 1987. General Microbiology. 6th edition, Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Schleifer, K.H., Ludwig, W., 1995. Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. In: B.J.B. Wood & W.H. Holzapel (editions) *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. London: Blackie Academic & Professional p. 7-18.

Scott, P.M., 1998. Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins. *Revue de Medecine Veterinaire* 149: 543–548.

Scudamore, K.A. y Livesey, C.T., 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77: 1-7.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Nación (SAGPyA). (www.sagpya.mecon.gov.ar).

Sheffield, L.G. y Welsch, C.W., 1985. Zeranol (beta-resorcylic acid lactone), a common residuous component of natural foodstuffs, stimulates developmental growth of the mouse mammary gland. *Cancer Letters* 28: 77–83.

Shetty, P.H. y Jespersen, L., 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science and Technology* 17: 48–55.

Shetty, P.H., Hald, B. y Jespersen, L., 2007. Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *International Journal of Food Microbiology* 113(1): 41-6. Epub 2006 Sep 22.

SIACON, 2007. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta. Anuario Estadístico de Producción Agrícola. SAGARPA. México D.F., México. p. 603.

Smith, T.K., Díaz, G. y Swamy, H.V., 2005. Current concepts in mycotoxicoses in swine. In: The mycotoxin Blue Book. (Díaz, D.E. edition). Nottingham University Press p. 235-248.

Stanley, V.G., Ojo, R., Woldesenbet, S., Hutchinson, D.H. y Kubena, L.F., 1993. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poultry Science* 72: 1867-1872.

Styriak, I. y Conkova, E., 2002. Microbial binding and biodegradation of mycotoxins. *Veterinary and Human Toxicology* 44: 358-361.

Takahashi-Ando, N., Kimura, M., Kakeya, H., Osada, H. y Yamaguchi, I., 2002. A novel lactonohydrolase responsible for detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning. *Biochemical Journal* 365: 1-6.

Tinyiro, S.E., Wokadala, C., Xu, D. y Yao, W., 2011. Adsorption and degradation of zearalenone by bacillus strains. *Folia Microbiol (Praha)* 56(4): 321-327.

Vaz Martins, D., Olivera, L. y Cozzolino, D. 2006. Ensilaje de maíz como componente de la dieta en la fase de terminación de novillos. *Revista INIA Producción Animal* 7: 5-8.

Van Os, M. y Dulphy, J.P., 1996. Voluntary intake and intake control of grass silage by ruminants. *Reproduction Nutrition Development* 36: 113-135.

Veeramachaneni, D.N., Sherman, G.B., Floyd, J.G. y col., 1988. Zeranol and oestradiol induce similar lesions in the testes and epididymides of the prepubertal beef bull. *Fundamental and Applied Toxicology* 10: 73-81.

Vega, V.D.D. y Ramírez, M.P., 2004. Situación y Perspectivas de Maíz en México. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Estado de México p. 56.

Weaver, G.A., Kurtz, H.J., Behrens, J.C., Robison, T.S., Seguin, B.E., Bates, F.Y. y Mirocha, C.J., 1986. Effect of zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers. *American Journal of Veterinary Research* 47: 1395-1397.

Weinberg, Z.G. y Muck, R.E., 1996. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews*, 19: 53-68.

Wicklow, D., Dowd, P., Tepaske, M.R. y Gloer, J., 1988. Sclerotial metabolites of *Aspergillus flavus* toxic to a detritivorous maize insect (*Carpophilus hemipterus*, Nitidulidae). *Transactions of the British Mycological Society* 91: 433-438.

Williams, P. y Newbold, C. 1990. The effects of novel microorganism on rumen fermentation and ruminant productivity. Presented at 24th. university of Nottingham Feed Manufacturers Conference. Sutton Bonington. Loughborough, England.

Williams, P., Thit, C., Innes, G. y Newbold, C., 1991. Effects of including yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and fermentation pattern's in the rumen of steers. *Journal of Animal Science* 69: 3016-3026.

Woolford, M.K., 1984. *The Silage Fermentation*. New York, NY, and Basle: Marcel Dekker. Microbiological Series, No.14.

Woolford M .K. 1990. The detrimental effect of air on silage. *Journal of Applied Bacteriology* 68:101-116.

Wollenweber, H.W. y Reinking, O.A., 1935. Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Paul Parey, Berlin p. 355.

Yiannikouris, A., Francois, J., Poughon, L., Dussap, C.G., Bertin, G., Jeminet, G. y Jouany, J.P., 2004. Alkali extraction of b-D-glucans from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and study of their adsorptive properties toward zearalenone. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52: 3666–3673.

Yoon, Y. y Baeck, Y.J., 1999. Aflatoxin binding and antimutagenic activities of *Bifidobacterium bifidum* HY strains and their genotypes. *Korean Journal of Dairy Science* 21: 291-298.

Zhou, H.R., Harkema, J.R., Hotchkiss, J.A., Yan, D., Roth, R.A. y Pestka, J.J., 2000. Lipopolysaccharide and the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol) synergistically induce apoptosis in murine lymphoid organs. *Toxicology Science* 53: 253-263.

Zinedine, A., Soriano, J.M., Molto, J.C. y Mañes, J., 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food Chemistry and Toxicology* 45: 1-18.

Zourgi, L., Golli, E., Bouaziz, C.H., Hassen, B. y Hassen, W., 2008. Cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes prevent oxidative damage induced by the mycotoxin zearalenone in Balb/C mice. *Food and Chemical Toxicology* 46: 1817- 1824.