

Aislamiento de cepas de *Aspergillus niger*, productoras de ocratoxina A, en café verde (*Coffea arabica*) almacenado

Mauricio Luna¹

Yasmín Lozada¹

Ángel Trigos^{1,2}

¹Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa; Calle Médicos 5, Unidad del Bosque, 91010, Xalapa, Veracruz, México. ²Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana; Av. Dos vistas s/n, Carretera Xalapa-Las Trancas, 91000. Xalapa, Veracruz, México

Isolation of strains of *Aspergillus niger* which produce ochratoxin A, isolated in stored green coffee (*Coffea arabica*)

Abstract. Strains of fungi which produce ochratoxins were isolated in green coffee (*Coffea arabica*) which was stored for seven months in three warehouses from a coffee-growing region of Mexico. The same time the OTA content was determined using the immunoaffinity method. The values found initially (after two months storage) fluctuated between 1.2 to 7.7 ppb and then did not vary significantly after the following five months. While these values have not increased to levels not permitted during storage due to natural conditions of humidity and temperature characteristics of the study region; 100% of strains of *Aspergillus niger* were found to potentially produce these mycotoxins under uncontrolled conditions of temperature and humidity. For this reason, this document presents the quantification ochratoxin A in green coffee with Ocratest[™], with an assessment of the ability of OTA production by native strains of *Aspergillus* in three coffee industries different in Mexico.

Key words: mycotoxins, green moulds, coffee beans.

Resumen. Se llevó a cabo el aislamiento de cepas productoras de ocratoxinas en café pergamino (*Coffea arabica*) almacenado durante siete meses en tres beneficios de una región productora en México. Paralelamente, se determinó el contenido de ocratoxina A (OTA) por el método de inmunoafinidad. Si bien, los valores iniciales (después de 2 meses de almacenamiento) fluctuaron entre 1.2 a 7.7 ppb, no aumentaron a niveles no permitidos después de 5 meses de almacenamiento, debido a que las condiciones naturales de humedad y temperatura, características de la región estudiada no favorecieron el desarrollo fúngico; no obstante, el 100% de las cepas de *Aspergillus niger* encontradas mostró posibilidades de producir dichas micotoxinas, si las condiciones de temperatura y humedad no se controlan. Por tal motivo, en el presente trabajo se presenta una metodología combinada de detección de OTA comercial (inmunoafinidad), con la valoración de la capacidad productora de OTA por cepas nativas de *Aspergillus* en tres almacenes de café de una región productora de México.

Palabras clave: micotoxinas, mohos verdes, granos de café.

Received 3 March 2010; accepted 27 October 2010.

Recibido 3 de marzo 2010; aceptado 27 de octubre 2010.

Las ocratoxinas son micotoxinas producidas por mohos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, de éstas, la ocratoxina A (OTA) es la más importante, dada su frecuencia y toxicidad

Autor para correspondencia: Ángel Trigos
atrigos@uv.mx

(Peraica *et al.*, 1999; Bayman y Baker, 2006). Se distribuye mundialmente, y es común que se encuentre contaminando los granos de café pergamino (verde) al igual que otros alimentos como cereales, vino, jugo de uva, cerveza y pan, así como en todo tipo de productos alimenticios de origen animal

(Levi *et al.*, 1974; Márquez y Trigos, 2007; Peraica *et al.*, 1999; Pohland, 1993; Romani, *et al.*, 2000; Tsubouchi *et al.*, 1987).

La susceptibilidad del café a la contaminación por estos hongos (Peraica *et al.*, 1999) es debida a que, por razones económicas, permanece almacenado durante largos periodos, generalmente sin control de la humedad y la temperatura; y debido a que se trata de un alimento de amplio consumo, la población tiene una elevada probabilidad a ser contaminada por esta toxina, ya que el tostado de café no es un proceso que asegure su total destrucción, por lo que una taza de café podría contener cantidades elevadas de ocratoxinas (Carrillo, 2003), las cuales, por presentar gran afinidad con las proteínas plasmáticas, aseguran su persistencia en el organismo (López de Ceraín, 2000).

Por todo lo anterior, se requiere que todos los involucrados con el beneficio, almacenamiento, acondicionamiento, venta y consumo, del producto, cuenten con herramientas de laboratorio para el control de las ocratoxinas y, en especial, de la OTA. Por tal motivo, el presente trabajo presenta una metodología combinada de detección de OTA comercial (inmunofinidad), con la valoración de la capacidad productora de OTA por cepas nativas de *Aspergillus* en tres almacenes de café de una región productora en México.

El muestreo se realizó en tres periodos: en el mes de mayo (poco después del término de la cosecha); en el mes de julio (etapa intermedia) y en el mes de octubre, antes de empezar la siguiente cosecha. Se utilizó una modificación de la técnica recomendada por la NOM-188-SSA1-2002 (Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal); para ello, cada almacén se dividió en 5 zonas (4 puntos periféricos y 1 central) y se tomó una muestra compuesta por cada una de ellas, formada por 10 puntos a diferentes profundidades y distancias. Lo anterior se efectuó con pala de plástico desinfectada, con capacidad de 100 g. Las muestras se depositaron en bolsas de poli-papel. Los tres almacenes estudiados se encuentran en el municipio de Coatepec, Veracruz, México.

Las condiciones de temperatura y humedad en cada almacén se midieron en cada una de sus cinco zonas, con un termómetro digital con higrómetro calibrado (marca GB).

La determinación de humedad del grano de café pergamino verde se realizó de acuerdo con la NOM-F-083-1986 (determinación de humedad en productos alimenticios), secando 2.5 g de granos de café pergamino triturados en un crisol a 100 °C por 20 min, repitiendo esta operación hasta obtener un peso constante.

Para observar qué medio favorecía el crecimiento fúngico de los hongos de interés, se colocaron granos de café

Tabla 1. Concentración de ocratoxina (ppb) al primer mes y a los seis meses de almacenamiento en tres beneficios de café en la región de Coatepec, Veracruz

Zona	Beneficio 1 (muestreo)		Beneficio 2 (muestreo)		Beneficio 3 (muestreo)	
	Mayo	Octubre	Mayo	Octubre	Mayo	Octubre
1	6.5	7.0	6.2	5.8	6.3	1.9
2	3.9	5.4	2.2	2.3	2.9	6.4
3	3.5	6.2	1.3	5.1	3.1	6.0
4	2.3	3.4	1.2	5.8	2.2	6.0
5	2.7	5.5	1.2	4.7	2.7	7.8
Promedio	3.78 ± 1.6	5.52 ± 1.3	2.42 ± 2.2	4.73 ± 1.4	3.44 ± 1.6	5.62 ± 2.2
Diferencia	+1.74		+2.31		+2.17	

* Muestreo mayo (1 mes de almacenamiento).

** Muestreo octubre (6 meses de almacenamiento).

en cajas petri con agar papa dextrosa (PDA), con agar Czapek y en cámara húmeda, en relación de 10 granos por caja, para posteriormente ser incubadas durante 2 a 7 días a 27 °C. Se realizaron las resiembras necesarias para obtener cultivos puros y proceder a su identificación por observación morfológica (NOM-111-SSA1-1994; Carrillo, 2003).

Para la identificación de las especies fúngicas se observaron características macroscópicas y microscópicas de los cultivos aislados. El estudio macroscópico se realizó a simple vista, observando color y forma de crecimiento de los micelios. Inmediatamente se procedió a realizar el estudio

microscópico, donde se observó la morfología de los conidióforos y las dimensiones de los conidios a partir de tejido micelial teñido con azul de lactofenol. Para la identificación de estructuras morfológicas se usaron referencias bibliográficas y fotografías (Abarca, 2000; Serra *et al.*, 2006; Antolín-Ayala, 2003).

Todos los aislamientos fúngicos caracterizados como *Aspergillus niger*, obtenidos de los tres muestreos de cada beneficio, se inocularon en medio Czapek (20 mL) y se incubaron durante 26 días a 27 ± 1 °C. Transcurrido este periodo, se determinó la concentración de ocratoxinas de un

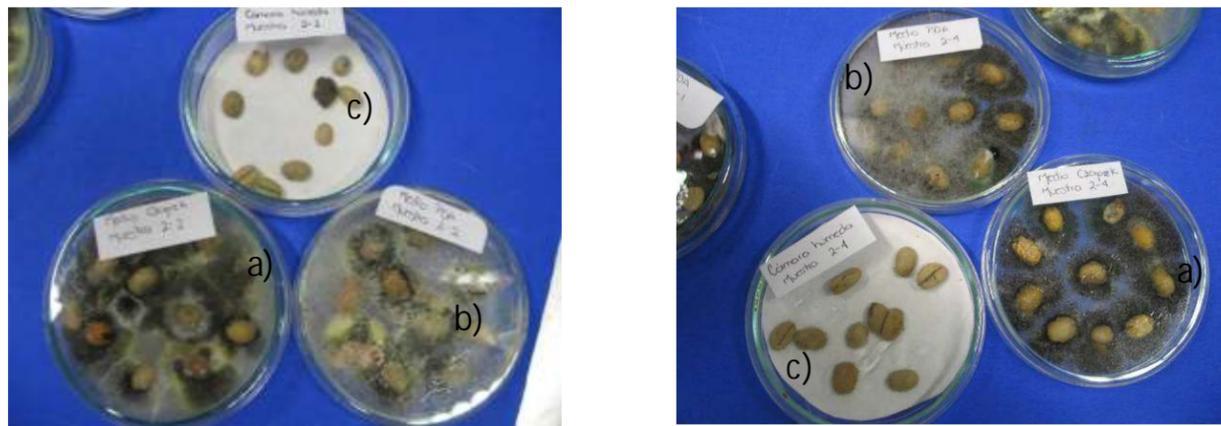


Figura 1. Desarrollo de colonias fúngicas a partir de granos de café inoculados en: a) medio Czapeck-dox, b) medio PDA y c) cámara húmeda.

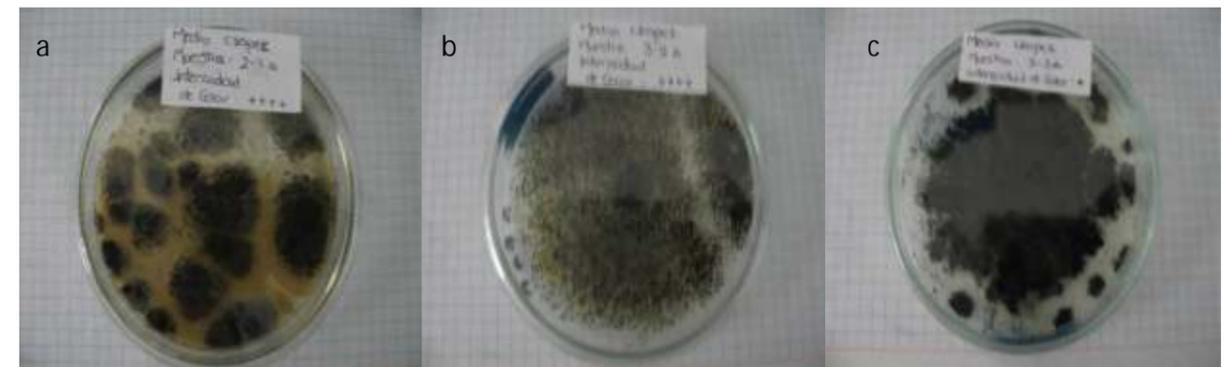


Figura 2. Diferencias macroscópicas de aislamientos de *A. niger*: a) micelio blanco con pigmento amarillo difundido en el medio, b) micelio amarillo sin pigmento, y c) micelio blanco sin pigmento.

homogenizando de 20 mL de agar y micelio siguiendo el procedimiento comercial de Vicam Ochratest™, (1999) que incluye el método de inmunofluorescencia y la posterior cuantificación por fluorescencia. Las muestras se evaluaron por triplicado y además se consideró un control con medio de cultivo sin inóculo.

Con referencia los resultados y acorde a lo reportado por Carrillo (2003), el medio Czapek-dox favoreció el desarrollo de cultivos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* a partir de granos de café, en contraste con el medio PDA y cámara húmeda, que favorecieron el desarrollo de *Mucor* y *Rhizopus* (Figura 1).

Aspergillus niger fue la especie encontrada con mayor frecuencia, ya que del total de los tres muestreos, el 86%, 87% y 88% de los granos, generaron cultivos de esta especie, corroborando lo reportado por Burdaspal y Legarda (1998) y Pardo *et al.* (2004). En tanto que *A. flavus*, *A. fumigatus* y *Penicillium sp.* fueron las especies más escasas.

Así, los aislamientos de *A. niger*, desarrollados en medio Czapek-dox, mostraron diferencias macroscópicas generales los cuales se clasificaron en tres grupos: micelio blanco con pigmento amarillo difundido en el medio, micelio amarillo sin pigmento y micelio blanco sin pigmento (Figura 2).

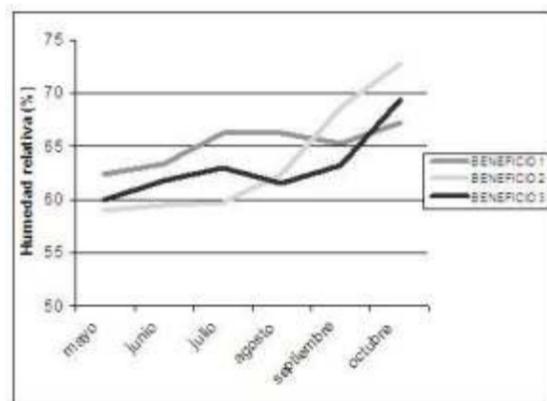


Figura 3. Porcentajes de humedad relativa registrados a lo largo de 6 meses de almacenamiento de café pergamino en tres beneficios. Nótese que en el beneficio 2 fue donde se reportaron inicialmente los valores menores y los más altos al final del experimento.

El 100 % de las muestras de café analizadas presentó contaminación con ocratoxinas A con valores que fluctuaron desde 1.2 a 7.8 ppb, para los dos muestreos (Tabla 1).

Como era de esperarse, en los tres beneficios se encontró un incremento en la concentración de OTA (Tabla 1), apoyando la hipótesis de que tanto la temperatura como la humedad son dos factores influyentes para la síntesis de ocratoxinas, lo cual coincide con los mayores incrementos de concentraciones de ocratoxinas, y con los valores más altos de humedad y temperatura del beneficio 2 (Figuras 3 y 4), durante el almacenamiento del café, coincidiendo con lo descrito por Denli y Pérez (2006). Dicho beneficio reportó los valores iniciales más bajos y los finales más altos de humedad relativa, así como el mayor rango de aumento de temperatura, en los meses de junio y julio, mientras que el beneficio 1, que fue el que presentó menor variación en los incrementos de humedad y temperatura, mostró el menor aumento en la concentración de ocratoxinas (1.74 ppm). No obstante, la humedad relativa siempre fue superior al 60 %.

Se encontró que la producción de OTA variaba de acuerdo con las diferencias morfológicas de los aislamientos desarrollados en medio Czapek-dox, de tal modo que, los cultivos que presentaron crecimiento fúngico con coloración amarilla difundida al medio produjeron cantidades bajas de

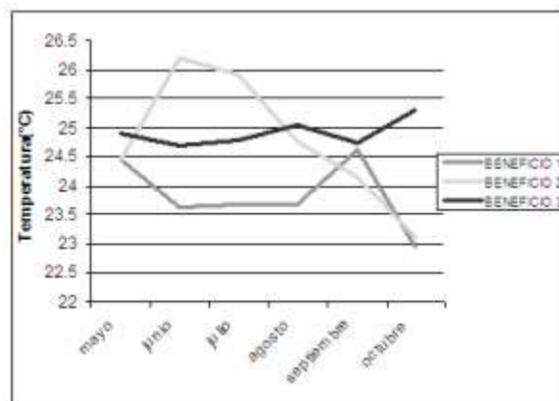


Figura 4. Promedio de porcentajes de temperatura en cada beneficio, a lo largo de los 7 meses de almacenamiento de café pergamino en donde se observan los valores más altos durante los meses de junio y julio en el beneficio 2.

Tabla 2. Producción de ocratoxinas (ppb) en 21 aislamientos de *A. niger* (A-U), según sus características macroscópicas observadas a partir de micelio desarrollado en medio de cultivo Czapek dox, incubado durante 26 días a $27 \pm 1^\circ\text{C}$

Cultivos	Tipo de Micelio		
	Amarillo sin pigmento	Blanco pigmento amarillo*	Blanco sin pigmento
A			56.5 ± 0.31
B			444.0 ± 1.20
C	71.5 ± 0.61		
D		6.6 ± 0.35	
E	124.0 ± 0.96		
F	19.4 ± 0.50		
G			2254.0 ± 7.73
H			9.9 ± 0.35
I	214.0 ± 0.46		
J			40.2 ± 0.35
K	18.1 ± 0.12		
L			19.5 ± 0.21
M		37.0 ± 0.10	
N			67.1 ± 0.31
O	50.9 ± 0.50		
P	55.9 ± 0.31		
Q			2.3 ± 0.30
R			118.0 ± 0.15
S			134.0 ± 0.12
T			122.0 ± 0.21
U			39.5 ± 0.29

* Pigmento difusible en el medio.

ocratoxinas (Tabla 2); sin embargo, es conveniente resaltar que sólo se encontraron dos aislamientos en todas las muestras que se analizaron en este trabajo. Lo anterior, concuerda con Márquez *et al.* (2007) al encontrar que una cepa de *A. nidulans* que tenía bloqueado el metabolismo de las micotoxinas, producía pigmento de color amarillo.

En contraste, los cultivos de micelio blanco sin pigmentación en el medio, produjeron concentraciones mayores de OTA y fueron además, los aislamientos más encontrados. Así, como se puede notar, el 100 % de los aislamientos fueron productores de ocratoxinas en medio de cultivo; no obstante, la potencialidad de cada uno de ellos varió, al obtenerse valores desde 6.6 ppb hasta 2254.0 ppb de ocratoxina A por aislamiento (Tabla 2).

En conclusión, el 100 % de las muestras analizadas

se encontraron contaminadas por hongos del género *Aspergillus*; de éstas, el 87 % correspondieron a *A. niger*. La presencia del género *Penicillium* fue minoritaria y sólo se presentó en el 9.3 % del total de la población; así mismo, el 100 % de las muestras de café analizadas presentaron concentraciones de OTA por debajo de los límites permitidos por la normatividad mexicana (1.2 a 7.7 ppb); no obstante, los aislamientos de *A. niger* encontrados fueron capaces de producir *in vitro* valores importantes de estas micotoxinas, en especial aquellos que presentaron micelio blanco sin pigmentación en el medio, de acuerdo con lo reportado por Márquez *et al.* (2007).

Los resultados obtenidos, muestran por un lado la importancia del control de las condiciones de temperatura y humedad relativa durante el almacenamiento de café

pergamino, así como de la cuantificación de ocratoxinas, directa en producto complementada con el aislamiento y la evaluación del potencial sintético de las cepas fúngicas en el control de café, ya que un café mal almacenado y monitoreado, potencialmente puede desarrollar el crecimiento de hongos capaces de producir micotoxinas muy por encima de límites superiores a las normas establecidas.

Literatura citada

- Abarca, L., 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología* 17: 79-84.
- Antolín-Ayala, M., 2003. Atlas de Micología. Servicio de Microbiología. Complejo Hospitalario de León. http://www.socalemi.org/atlas_hongos.htm#aspergillus.
- Bayman, P., J. L. Baker, 2006. Ochratoxins: a global perspective. *Mycopathologia* 162: 215-223.
- Burdaspal, P. A., T. M. Legarda, 1998. Ochratoxina A en muestras de café comercializado en España. *Alimentaria* 35: 31-35.
- Carrillo, L., 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Salta.
- Denli, M., J. F. Pérez, 2006. Contaminación por micotoxinas en los piensos: efectos, tratamiento y prevención, *Avances en Nutrición y Alimentación Animal*, XXII. Curso de Especialización FEDNA, Cilt I, 1-17, Barcelona.
- Levi, C. P., H. L. Trenk, H. K. Mohr, 1974. A study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 57: 866-870.
- López de Ceraín, A., A. M. Jiménez, O. Ezpeleta, O. Bello, 2000. Efectos tóxicos de la Ochratoxina. *Revista de Toxicología* 17: 61-69.
- Márquez, O., Á. Trigos, 2007. Un peligro silencioso: Los venenos del quinto reino. En: Ramón Zulueta, Dora Trejo y Ángel Trigos (Eds.). *El maravilloso mundo de los hongos*. Universidad Veracruzana, Xalapa. 141-150.
- Márquez, O., Á. Trigos, J. L. Ramos-Balderas, G. Viniegra-González, H. B. Deising, J. Aguirre, 2007. The phosphopantetheinyl transferase CfwA/NpgA is required for *Aspergillus nidulans* secondary metabolism and asexual development. *Eukaryotic Cell* 6: 710-720.
- Norma Mexicana NMX-F-083-1986. Alimentos. Determinación de humedad en productos alimenticios. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. 2 p.
- Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Diario Oficial. México. 4 p.
- Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002. Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. Muestreo. Diario Oficial. México. 27 p.
- Ochra Test™, 1999. Instruction Manual. Vicam L. P. Watertown, MA.
- Pardo, E., S. Marin, A. J. Ramos, V. Sanchos, 2004. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. *Food Science and Technology Internacional* 10: 45-49.
- Peraica, M., B. Radi, A. Luci, M. Pavlovi, 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization* 77: 754-766.
- Pohland, A. E., 1993. Mycotoxins in review. *Food Additives & Contaminants* 10: 17-28.
- Romani, S., G. Sacchetti, C. I. Chavez, G. Goetano, M. Dalla, 2000. Screening on the occurrence of ochratoxin A in coffee beans of different origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3616-3619.
- Serra, R., J. Cabañes, G. Perrone, G. Castellá, A. Venâncio, G. Mulé, Z. Kozakiewicz, 2006. *Aspergillus ibericus*: a new species of section Nigri isolated from grapes. *Mycologia* 98: 295-306.
- Tsubouchi, H., K. Yamamoto, K. Hisada, Y. Sakabo, S. Udagawa, 1987. Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. *Mycopathologia* 97: 111-115.