

## INCIDENCIA DE HONGOS CON POTENCIAL TOXIGÉNICO PRESENTES EN CAFÉ DE LA PROVINCIA DE RODRÍGUEZ DE MENDOZA – PERÚ

GASLAC CULQUI, F.<sup>1</sup>; MANSILLA-CORDOVA, P.J.<sup>2,3</sup>; CAETANO, A.C.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias (UNTRM-A), Chachapoyas, Perú, <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agrarias (UNACH), Chota, Perú, <sup>3</sup>Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (UNTRM-A), Chachapoyas, Perú.

### RESUMEN

Durante la etapa de cultivo y proceso postcosecha, el café está expuesto a múltiples factores de deterioro. Estos factores son los responsables de la contaminación fúngica en los frutos y granos de café, siendo el género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* fuente productora de aflatoxinas (AFLA) y ocratoxina A (OTA) las cuales son toxinas carcinógenas, nefrotóxicas, teratogénicas, hepatotóxicas y puedan afectar negativamente a la salud humana; motivo por el cual se evaluó la microbiota de los granos de café procedentes de la provincia de Rodríguez de Mendoza - Amazonas (Perú) y la incidencia de hongos con potencial toxigénico. Hubo mayor porcentaje de contaminación por otros géneros diferentes a *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* en café convencional que en café orgánico. Los géneros *Penicillium* y *Fusarium* estuvieron presentes en mayor porcentaje en café orgánico que en café convencional. La infección por *Penicillium* en muestras de granos orgánicos secando y almacenados estuvieron en el rango de 26 a 34% y en muestras de café convencional durante el secado, al 7% por *Aspergillus*. Con base en las características macro y micromorfológicas por el momento se ha logrado identificar un aislado de *P. verrucosum* y otro de *A. westerdijkiae*. Estos mostraron fluorescencia en medio agar CAM bajo luz ultravioleta, lo que indica que son posibles productores de OTA.

**Palabras claves:** micotoxinas, *Penicillium*, *Aspergillus*, ocratoxina A

### INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos que comúnmente contaminan una amplia gama de cultivos como cereales, nueces, hierbas, especias, frutas o semillas oleaginosas. Algunas micotoxinas son altamente tóxicas o cancerígenas (Bessaire et al., 2019), siendo *Aspergillus* uno de los tres géneros de hongos más importantes en el deterioro de alimentos y responsable por la producción de micotoxinas, habiendo otras especies de hongos productores de micotoxinas como *Fusarium* y *Penicillium* (Taniwaki et al., 2018). Las micotoxinas se producen naturalmente (Paterson et al., 2014), pero la infección puede tener lugar antes de la cosecha o posteriormente, durante el secado y almacenamiento del café. Estos hongos tienen la capacidad de infectar las plantas durante el crecimiento sin dañar la planta misma la cual proporciona un mecanismo listo para infectar a los granos antes de la cosecha (Taniwaki et al., 2018).

Las especies de *Aspergillus* producen micotoxinas importantes, en particular las AFLA, producidas por *A. flavus* y la OTA producida por *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. niger* y *A. carbonarius* en café, siendo toxinas nefrotóxicas y mutagénicas (Castellanos-Onorio et al., 2011; Iamanaka et al., 2014; Joosten et al., 2001; Taniwaki et al., 2003). Estas moléculas son

estables, difícilmente son degradadas bajo condiciones de cocción, tostado y fermentación (Boudra et al., 1995).

Como ya se mencionó anteriormente, los granos de café pueden estar contaminados por microorganismos durante las diferentes etapas, en su cultivo, cosecha, procesamiento, transporte y almacenamiento (Noonim et al., 2008). Además, la producción de la OTA y AFLA en los granos de café depende de muchos factores como la temperatura, humedad y las condiciones de manipulación y almacenamiento (Yao et al., 2015).

El café es una de las bebidas más consumidas en el mundo y su contribución a la ingesta dietética individual de OTA podría ser relativamente alta (Castellanos-Onorio et al., 2011) por eso la legislación de la Unión Europea establece un nivel máximo de OTA en café tostado (5.0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) y café instantáneo (10.0  $\mu\text{g. kg}^{-1}$ ) (Comisión Europea, 2006). Entonces la finalidad del trabajo de investigación fue identificar la microbiota, con enfoque especial en los hongos con potencial de producción de micotoxinas en las diferentes etapas del procesamiento de los granos de café de la provincia de Rodríguez de Mendoza, Amazonas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1.1. Muestreo de los frutos/granos de café

La recolección de muestras de frutos/granos de café se realizó en la provincia de Rodríguez de Mendoza a través de la Cooperativa Agraria Rodríguez de Mendoza (COOPARM). Las muestras de frutos/granos de café orgánico se colectó del caserío de Cochamal y las muestras de frutos/granos de café convencional se colectó del caserío de Shucush. Se realizaron dos colectas: la primera colecta en mayo/2021 y la segunda colecta en noviembre/2021.

Se colectaron 4 muestras diferentes de café (aprox. 800 g por muestra) de 4 etapas de la cadena productiva del café utilizando el método aleatorio simple: (1) frutos verdes, (2) frutos maduros, (3) granos secado y (4) granos almacenados. Estas muestras se utilizaron para el aislamiento de los hongos, identificación y determinación de la producción de AFLA y OTA. Cada una de las muestras fueron dispuestas en bolsas con cierre hermético de polietileno (7×10 cm) y transportadas en una caja de poliestireno de 60×40×40 cm conteniendo geles congelados, para mantener las muestras frescas y evitar su deterioro hasta llegar al laboratorio. Se realizó el muestreo en laboratorio y las muestras fueron almacenadas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta su evaluación.

### 1.2. Plaqueamiento directo de las muestras

Las cerezas de café y pergamino con mucílago tienen un alto contenido de humedad y se contaminan fácilmente (Maman et al., 2021) por lo que se desinfectaron superficialmente por inmersión en solución de hipoclorito de sodio al 0.4% durante 1 min (2 min en caso de los frutos verdes y maduros).

Los frutos de café de cada muestra se colocaron en 2 placas de Petri de 150 mm de diámetro con 15 granos/placa. Los granos de café de cada muestra se sembraron en 1 placa de Petri con 30 granos/placa. El medio selectivo utilizado fue agar dicloran-glicerol al 18% y se incubaron a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 a 7 días. Las colonias se examinaron visualmente en un estereoscopio. Las partículas con presencia de colonias fueron contabilizadas y los resultados fueron expresados en porcentaje de granos infectados (Pitt & Hocking, 2009).

### 1.3. Aislamiento e identificación de las colonias fúngicas

Las colonias fúngicas se mantuvieron individualmente en microtubos conteniendo 250 µl de agar semilíquido. Cada colonia fúngica fue identificada a través de protocolos específicos para cada género establecidos por Pitt & Hocking (2009). Para ello, cada aislado fue sembrado en placas de Petri conteniendo medio CYA y MEA en tres puntos equidistantes. En medio G25N se sembró en 2 puntos equidistantes. Todas las placas fueron incubadas a 25°C durante 7 días. Adicionalmente, cada aislado se sembró en medio CYA en dos puntos equidistantes y se incubó a 5°C y 37°C durante 7 días. En este último caso, así como en las siembras en medio G25N, cada una de las placas de Petri sirvió para evaluar 2 aislados (Figura 1).

Las características macromorfológicas, tales como la tasa de crecimiento de las colonias, textura, grado de esporulación, color del micelio, esporulación, pigmentos solubles, exudados, reverso de la colonia, producción de esclerocios, clamidosporas y cleistotecios, fueron registrados. Además, el diámetro de cada una de las colonias fue medido diariamente con vernier, hasta antes que las colonias se sobrepongán.

Las características micromorfológicas, tales como forma de los conidios, color del estipe y dimensión, forma y textura del estipe, vesículas, métulas, fiálides, conidios, clamidosporas, cleistotecios, ascos y ascosporas fueron observadas y fotografiadas con la ayuda de un microscopio de luz (Samson et al., 2014).

Las evaluaciones de características macro y micromorfológicas se realizaron de las colonias incubadas a 25°C. Las otras dos temperaturas se usaron para la primera fase de caracterización y el uso de las claves dicotómicas de Pitt & Hocking (2009).

Adicionalmente se realizó la técnica del microcultivo descrito por Alfenas & Mafia (2016) para las colonias fúngicas que no era posible observar estructuras limpias, claras y completas en los montajes microscópicos realizados de forma directa.

### 1.4. Determinación de AFLA y OTA en medio agar coco (CAM)

Como una forma rápida para la determinación de producción de extrolitos, se seleccionaron aislados del género *Penicillium* y *Aspergillus* ya que estos han sido reportados como toxigénicos.

Las colonias fueron inoculadas en el centro de la placa con medio CAM e incubadas a 30 °C por 5 días, como descrito por Kuntawee & Akarapisan (2015) y Lin & Dianese (1976). Después de este período, las placas fueron observadas y fotografiadas bajo luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm. Las cepas que presentaron una emisión de color azul fluorescente como un halo alrededor de la colonia, fueron consideradas como productoras de AFLA u OTA.

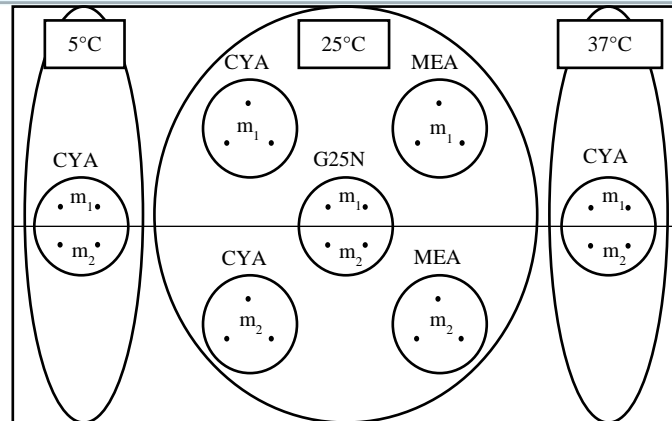


Figura 1. Diagrama adaptado de la metodología según Pitt & Hocking, (2009).  $m_1$  (microorganismo 1) y  $m_2$  (microorganismo 2)

## RESULTADOS

### 1.5. Contaminación fúngica de los frutos y granos de café

Todas las muestras de café estuvieron contaminadas por hongos filamentosos (Figura 2 y Figura 3). En la primera colecta, las cuatro etapas de café orgánico tuvieron 0%, 95%, 83% y 53% de infección por otros géneros diferentes de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. En los granos almacenados, fueron encontrados 26% de *Penicillium* sp. y 16% de *Fusarium* sp.. De manera similar, en las muestras de la segunda colecta de café orgánico también fue encontrado un mayor porcentaje de infección por *Penicillium* sp. (34%) y *Fusarium* sp. (34%) en las muestras de granos secando.

En las muestras de café convencional el mayor porcentaje de infección fue por otras colonias con porcentajes de 100%, 82%, 90% y 73%, respectivamente. En mínimas proporciones, *Aspergillus* sp. (7%) y *Fusarium* sp. (11%) en frutos maduros y *Penicillium* sp. (15%) en granos almacenados. De igual forma se obtuvo los resultados en la segunda colecta, con porcentajes elevados de infección por otras colonias y, en mínimas proporciones, en *Penicillium* sp. (12%) en frutos verdes y *Fusarium* sp. (17%) en frutos maduros.

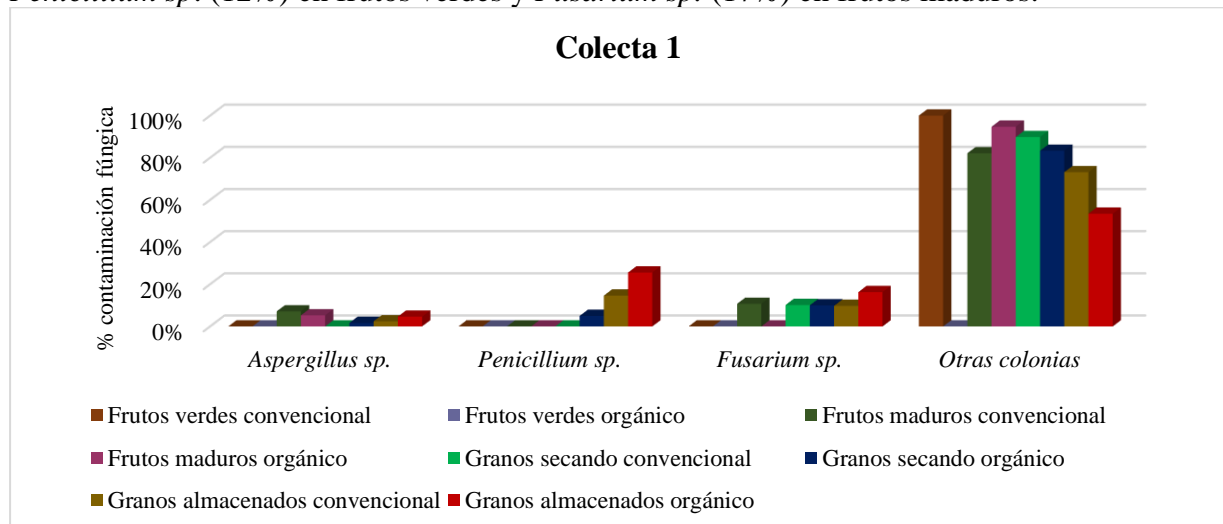


Figura 2. Porcentaje de contaminación fúngica de los frutos y granos de café de la provincia de Rodríguez de Mendoza en la primera colecta

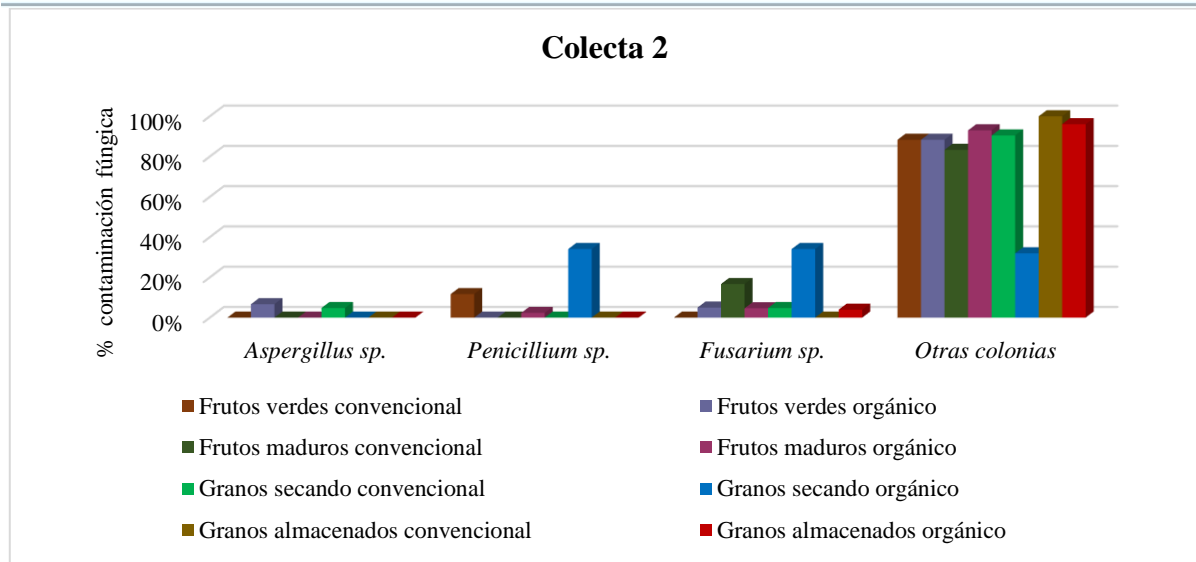


Figura 3. Porcentaje de contaminación fúngica de los frutos y granos de café de la provincia de Rodríguez de Mendoza en la segunda colecta

### 1.6. Morfología e identificación de las colonias

Todas las colonias aisladas se identificaron utilizando la clave dicotómica de Pitt & Hocking (2009), en base a sus características macro y microscópicas. Las características macroscópicas incluyen el color y diámetro de las colonias (Figura 4). Las colonias de *Aspergillus* sección *Circumdati* especie *A. westerdijkiae* por el anverso se muestran sulcadas, dorado en el centro con micelio amarillo claro en los bordes y granulosa con espirales, por el anverso de color amarillo mostaza con textura arrugada y en espiral (Figura 4-1) y el diámetro de la colonia a los 7 días en un rango de 48 a 54 mm. En las colonias de *P. verrucosum* (Figura 4-2) por el anverso se muestran sulcadas, aterciopeladas, verdiazules a verde grisáceo con micelios blancos en los bordes, densas y presenta exudado claro amarillo mostaza fuerte sulcadas a amarillo pálido opaco con diámetro promedio entre 21 a 27 mm. *Aspergillus sp.* (fig. 4-3) mostraron características amarillo pálidas, algodonosas con una capa de conidióforos negro azabache con diámetros de 63 a 65 mm; las colonias de *Penicillium sp.* presentaron características sulcadas, aterciopeladas, verdiazules con el reverso amarillo mostaza a amarillo verdoso con diámetros entre 17 y 36 mm (Figura 4-4). Las colonias de *Fusarium sp.* (Figura 4-5) fueron blanquesinas a melón, aterciopeladas con diámetro de 23 a 43 mm. Asimismo, se estudió las características microscópicas de las colonias como los estipes, fiálides, vesículas y conidios (Figura 5). Se observaron una vesícula globosa de 28-22  $\mu\text{m}$  de diámetro, estipe de 9  $\mu\text{m}$  (Figura 5-a); vesícula de 37 a 38  $\mu\text{m}$  de diámetro y estipes de 7  $\mu\text{m}$  (Figura 5-c); dimensiones de estipes con paredes lisas de  $21 \times 2 \mu\text{m}$ , fiálides biseriadas (Figura 5-b); estipes con paredes rugosas  $40 \times 4 \mu\text{m}$  (Figura 5-d) y microconidios de  $18 \times 9 \mu\text{m}$  (Figura 5-e).



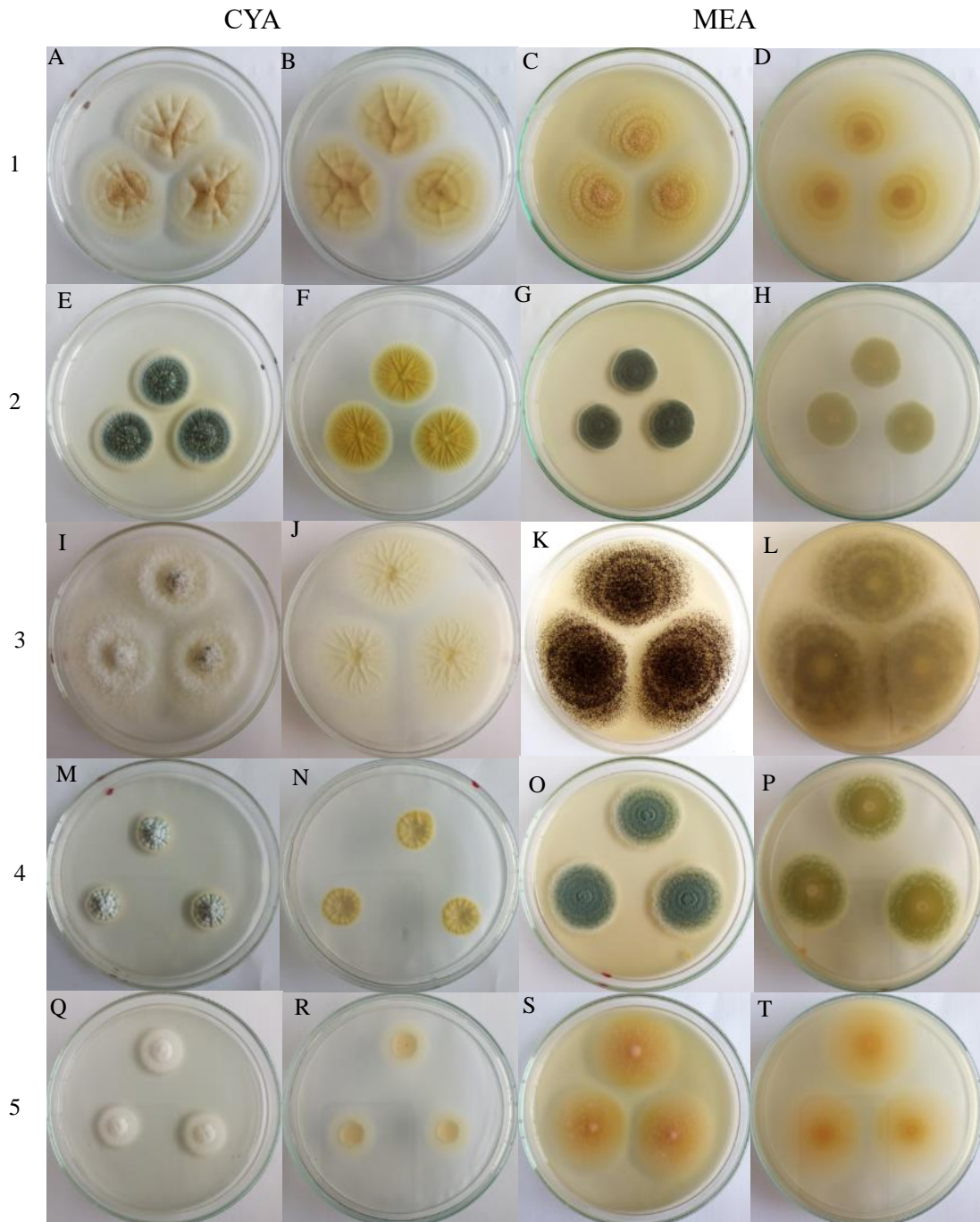


Figura 4. Características macroscópicas de microorganismos aislados de muestras de café en medios CYA y MEA. (1) *A. westerdijkiae*, (2) *P. verrucosum*, (3) *Aspergillus* sp., (4) *Penicillium* sp., (5) *Fusarium* sp.. Anverso (A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S) y reverso de las placas (B, D, F, H, J, L, N, P, R, T).



Figura 5. Características microscópicas hongos aislados de granos de café. (a) *A. westerdijkiae*, (b) *P. verrucosum*, (c) *Aspergillus sp.*, (d) *Penicillium sp.*, (e) *Fusarium sp.*, (a, c) cabeza conidial y conidióforos; (b, d) estipe, fiálides y conidios; (e) microconidios. Barras de escala: 10  $\mu\text{m}$ .

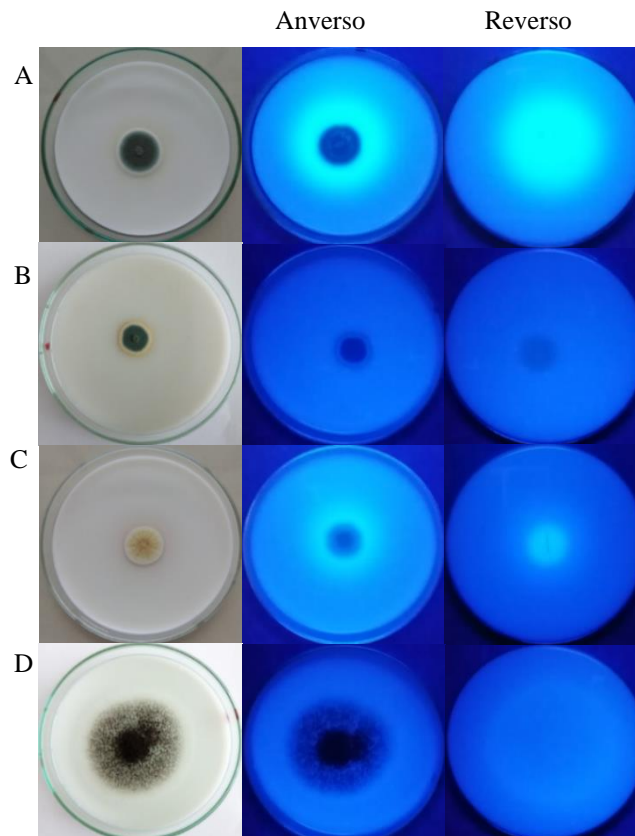


Figura 6. Producción de fluorescencia (A, C) y no producción de fluorescencia (B, D) de colonias en medio CAM examinado bajo luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm. (A) *P. verrucosum* (B) *Penicillium sp.* (C) *A. westerdijkiae* (D) *Aspergillus sp.*

## DISCUSIÓN

La humedad es un factor que contribuye a la contaminación por hongos en el café (Maman et al., 2021) y las condiciones meteorológicas intervienen en el aumento de la humedad si es que no se controla bien los parámetros de secado y almacenamiento. El contenido de humedad después del secado debe ser menor al 11% para que los problemas de contaminación sean mínimos (Maman et al., 2021).

En la investigación se trabajó con muestras de café orgánico y convencional de dos colectas diferentes. Se encontró mayor porcentaje de contaminación por otras colonias diferentes a *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* en café convencional que, en café orgánico; sin embargo, se encontró mayor porcentaje de infección de *Penicillium* y *Fusarium* en café orgánico que en café convencional.

En el estudio realizado solo se detectaron dos colonias productoras de OTA, *P. verrucosum* y *A. westerdijkiae*. La ocratoxina A (OTA; CAS303-47-9) es un sólido cristalino blanco con intensa fluorescencia ultravioleta (UV), verde en ácido y azul en condiciones alcalinas, debido a un anillo de lactona cerrado o abierto, respectivamente (Pitt, 2014). La OTA es producida por varias especies de *Aspergillus*, en particular *A. carbonarius*, *A. westerdijkiae* y *A. steynii*. Estas especies son responsables de la producción de OTA en climas más cálidos (Pitt & Hocking, 2009). La ocratoxina A produce enfermedades nefrotóxica crónica que afecta la función renal en todas las especies animales analizadas y daña una variedad de tejidos renales. La ocratoxina A también tiene efectos inmunosupresores, teratogénicos y genotóxicos en animales y posiblemente en humanos (Pitt & Hocking, 2009). Asimismo, Noonim et al. (2008) afirman que los hongos productores de OTA más potentes aislados del café arábica de Chiang Mai, Tailandia, pertenecían a la sección *Circumdati* de la especie *A. westerdijkiae*, *A. ocraceus*, *A. melleus*, y *A. steynii*. Ciegler et al., (1973) descubrieron *P. verrucosum* (en ese tiempo conocido como *P. viridicatum II*) como único productor de OTA en cereales de Canadá y USA; también, Lund F. & Frisvad J. (2003) encontraron *P. verrucosum* como fuente de producción de OTA en trigo y cebada de Europa. Estas informaciones confirman nuestro resultado positivo en el análisis de fluorescencia.

## CONCLUSIONES

Se encontró mayor porcentaje de contaminación por otras colonias diferentes a *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* en café convencional que, en café orgánico; sin embargo, hubo mayor porcentaje de infección de *Penicillium* y *Fusarium* en café orgánico que en café convencional. El mayor porcentaje de infección por hongos de todas las muestras fue por otros hongos diferentes a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*. Los mayores niveles de infección por *Penicillium* fueron encontrados en granos orgánicos, destacándose un 26% de incidencia en el proceso de secado en la primera colecta y 34% de incidencia en granos almacenados de la segunda colecta. En café convencional en proceso de secado se encontró 7% de infección por *Aspergillus* en la segunda colecta. Con la clave dicotómica y las características macro y micromorfológicas por el momento se logró identificar un aislado *P. verrucosum* y un *A. westerdijkiae*. Estos mostraron fluorescencia bajo luz ultravioleta por lo que se puede afirmar que son posibles productores de OTA.



## REFERENCIAS

- ALFENAS, A., & MAFIA, R. **Métodos em Fitopatologia**. In Métodos em Fitopatologia. (2, Ed.) Viçosa: UFV. 2016.
- BESSAIRE, T. P. Mycotoxins in green coffee: Occurrence and risk assessment. **Food Control**, 96(June 2018), 59-67, 2019.
- BOUDRA, H. L. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, 61(3), 1156–1158, 1995.
- CASTELLANOS-ONORIO, O. G.-R.-G.-Q. Effect of two different roasting techniques on the Ochratoxin A (OTA) reduction in coffee beans (*Coffea arabica*). **Food Control**, 22(8), 1184–1188, 2011.
- CIEGLER, A., FENNELL, D.I., SANSING, G.A., DETROY, R.W. AND BENNETT, G.A. Mycotoxin producing strains of *Penicillium viridicatum*: classification into subgroups. **Applied Microbiology** 26, 271–278, 1973
- COMISIÓN EUROPEA. **Reglamento (CE) N° 401/2006 de la Comisión**. Diario Oficial de La Unión Europea, 2006. 12–34.
- IAMANAKA, B. T. The mycobiota of coffee beans and its influence on the coffee beverage. **Food Research International**, 62, 353–358, 2014.
- JOOSTEN, H. M. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**, 65(1-2), 39–44, 2001.
- KUNTAWEE, S. Isolation and identification of *Aspergillus* species producing Ochratoxin A in Arabica coffee beans. **International Journal of Agricultural Technology**, 11(5), 1235–1242, 2015.
- KUNTAWEE, S., & AKARAPISAN, A. Isolation and Identification of *Aspergillus* Species Producing Ochratoxin a in Arabica Coffee Beans. **International Journal of Agricultural Technology**, 11(5), 1235-1242, 2015.
- LIN, M. T. A Coconut-Agar Medium for Rapid Detection of Aflatoxin Production by *Aspergillus* spp. **In Phytopathology**, 66(12), 1466, 1976.
- LUND F. & FRISVAD J. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. **Journal of Applied Microbiology**, 95(5), 1117–1123, 2003.
- MAMAN, M., SANGCHOTE, S., PIASAI, O., LEESUTTHIPHONCHAI, W., SUKORINI, H., & KHEWKHOM, N. Storage fungi and ochratoxin A associated with arabica coffee bean in postharvest processes in Northern Thailand. **Food Control**, 130, 108351, 2021.
- NOONIM, P. MAHAKARNCHANAKUL W.; KRISTIAN F. NIELSEN; JENS C. FRISVAD; ROBERT A. SAMSON. Isolation, identification, and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, 128(2), 197–202, 2008.
- PATERSON, R. R. Coffee, mycotoxins and climate change. **Food Research International**, 61, 1-15, 2014.

PITT, J. Mycotoxins: Ochratoxin A. **Elsevier**, 2014. 1-6.

PITT, J., & HOCKING, A. **Fungi and food spoilage**. Australia: Springer, 2009.

SAMSON, R. A., VISAGIE, C. M., HOUBRAKEN, J., HUBKA, V., PERRONE, G., SEIFERT, K. A., SUSCA, A., SZIGETI, G., YAGUCHI, T., FRISVAD, J. C., TANNEY, J. B., VARGA, J., & KOCSUB, S. Phylogeny, identification, and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, 141–173, 2014.

TANIWAKI, M. H. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, 82(2), 173–179, 2003.

Taniwaki, M. H. *Aspergillus* species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. **Current Opinion in Food Science**, 23, 38–43, 2018.

Yao, H. H. Developments in detection and determination of aflatoxins. **World Mycotoxin Journal**, 8(2), 181–191, 2015.