

DETECCIÓN DE HONGOS CON POTENCIAL TOXIGÉNICO EN GRANOS DE CAFÉ DE JAÉN, PERÚ

RIVERA-BUSTAMANTE, M.M.¹; MANSILLA-CORDOVA, P.J.^{2,3}; CAETANO, A.C.^{1,3}

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

RESUMEN

Muchas especies de hongos del género *Penicillium* y *Aspergillus* infestan los granos de café durante la postcosecha y el almacenamiento. Algunas de ellas pueden producir toxinas bastante estables. El objetivo de este estudio fue hacer una prospección de los hongos con potencial toxigénico, principalmente de Ocratoxina A, en la cadena de procesamiento de los granos de café de la provincia de Jaén – Cajamarca. Para eso, muestras de frutos y granos de café de las variedades Caturra y Catimor fueron recolectadas durante 5 etapas de procesamiento y sembradas en medio DG18. Se aislaron los hongos presentes y se estimó el porcentaje de infección de las muestras. Todas las colonias aisladas en la etapa de fermentación fueron del género *Penicillium*, tanto en la primera recolección como en la segunda. No fueron detectados hongos potencialmente productores de AFLA u OTA a través del medio agar coco. Sin embargo, no se puede descartar que otros metabolitos puedan haber estado presentes.

Palabras clave: incidencia, caracterización, postcosecha.

INTRODUCCIÓN

El café es una bebida muy consumida en todo el mundo, sobre todo de forma caliente, preparada a través de la infusión de los granos procesados. Durante el cultivo del café, las cerezas y los granos pueden contaminarse con hongos y bacterias. Estos microorganismos pueden ser eliminados durante las diferentes etapas de procesamiento. Sin embargo, algunos hongos pueden infectar los granos y producir toxinas que no son fácilmente degradadas (Galarce-Bustos et al., 2014).

Algunos estudios encontraron hongos filamentosos con alta frecuencia en las cerezas de café después de la cosecha y durante el secado, habiendo una mayor cantidad de estos microorganismos cuando los granos presentaban algún defecto (Iamanaka et al., 2014; Taniwaki et al., 2003).

En la Unión Europea se ha avanzado bastante con las orientaciones de control, habiendo recomendaciones de la Comisión para la prevención y reducción de toxinas de *Fusarium* en cereales y subproductos. En ella se destaca la importancia del abordaje integral, considerando no solamente las buenas prácticas agrícolas, que son la primera línea de defensa, sino también considerar el clima, por ejemplo. Las prácticas agrícolas que se enfatizan son la adecuada rotación del cultivo, el manejo del suelo, selección de la variedad o híbrido y el uso correcto de los fungicidas (Giraud et al., 2011; Nakajima et al., 2008).

Para los propósitos de la seguridad alimentaria, las especies de los hongos deben ser correctamente identificadas para tener conocimiento del perfil de micotoxinas que pueden producir, además de su fisiología (Frisvad et al., 2019). La contaminación de cultivos agrícolas por hongos asociados a la producción de micotoxinas es un serio problema en todo el mundo (Solhaug et al., 2016). El objetivo de este trabajo fue realizar una prospección de los hongos con potencial toxigénico, principalmente de Ocratoxina A (OTA), en la cadena de procesamiento de los granos de café de la provincia de Jaén.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.Recolección de muestras de café

Las muestras de café (*Coffea arabica* L.) de las variedades Caturra y Catimor fueron recolectadas de un campo de cultivo en Huabal - Provincia de Jaén, con 4 años, en conversión al sistema orgánico.

Se obtuvieron muestras de cinco etapas de producción: (1) frutos verdes, (2) frutos maduros, (3) granos en el proceso de fermentación, (4) granos en la etapa de secado y (5) granos durante el almacenamiento. Luego de la recolección, las muestras fueron empacadas en bolsas con cierre hermético y transportadas al Laboratorio de Sanidad Vegetal del INDES-CES / UNTRM. Las muestras fueron fraccionadas en partes iguales y congeladas para su posterior análisis.

2.2.Análisis de especies fúngicas

Las muestras de frutos y granos fueron desinfectadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 0.4% durante 2 y 1 min, respectivamente. Sesenta frutos / granos de café de cada muestra fueron distribuidos en 4 placas de Petri de 150 × 20 mm conteniendo DG18 con cloranfenicol. Las placas fueron incubadas a 25 °C entre 5 y 7 días. Después del periodo de incubación, las partículas infectadas fueron contabilizadas obteniendo el porcentaje de infección (Pitt & Hocking, 2009).

Cada una de las colonias fúngicas que crecieron fueron aisladas en tres medios diferentes CYA, MEA y G25N, e incubadas a 5°C, 25 °C y 37 °C, según lo descrito por Pitt & Hocking (2009).

2.3.Identificación de las especies fúngicas

Los aislados fueron sembrados en tres puntos en una sola placa (para los medios CYA y MEA), equidistantes del centro y el borde de la placa y entre sí. Fueron registradas las características macromorfológicas, tales como la tasa de crecimiento de las colonias, textura, color del micelio, esporulación, exudados, reverso de la colonia. El diámetro de cada una de las colonias se midió con vernier, hasta antes de que las colonias se superpongan. Las características micromorfológicas, tales como forma de los conidios, color del estipe y dimensión, forma y textura del estipe, vesículas, métulas, fiálides, conidios, clamidosporas, cleistotecio, ascos y ascosporas se observaron y fotografiaron en un microscopio de luz (Samson et al., 2014).

2.4.Evaluación del potencial toxigénico

Los aislados de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* fueron cultivados en medio agar coco (CAM) a 30 °C durante 5 días (Kuntawee & Akarapisan, 2015; Lin & Dianese, 1976). Las

colonias productoras de ocratoxina o aflatoxina fueron detectadas a través de la fluorescencia bajo luz ultravioleta.

RESULTADOS

1.1. Micobiota analizada de las muestras de café

Los resultados (Tabla 1) indican los porcentajes de infección encontrados en las muestras de la primera y segunda recolección de las cinco etapas de café de la variedad caturra y catimor.

Tabla 1. Porcentaje de infección de frutos y granos de café de las variedades Caturra y Catimor.

	Colecta 1		Colecta 2	
	Caturra	Catimor	Caturra	Catimor
Frutos verdes	82%	93%	85%	87%
Frutos maduros	45%	73%	77%	67%
Granos fermentados	72%	95%	-	95%
Granos en etapa de secado	50%	73%	60%	85%
Granos almacenados	47%	33%	-	22%

Dentro del porcentaje total de hongos encontrados, el principal género en la variedad Caturra fue *Penicillium* (Figura 1), presentando mayor incidencia en los granos fermentados de la primera colecta.

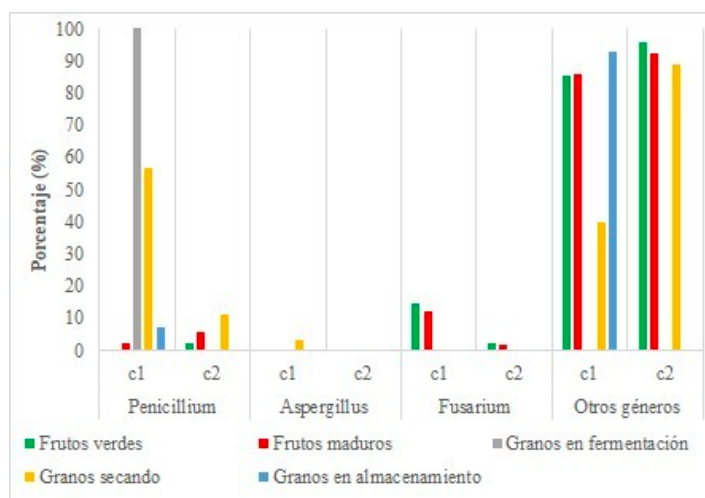


Figura 1. Incidencia fúngica en la primera (c1) y segunda colecta (c2) de los granos de café de la variedad Caturra en cinco etapas distintas

Este valor disminuyó en las etapas de secado y almacenado. En la segunda colecta, la incidencia de *Penicillium* fue un poco mayor en las etapas de frutos maduros y verdes comparado con la colecta 1. Sin embargo, las demás etapas presentaron menores porcentajes que en la primera colecta. *Fusarium* fue detectado en frutos verdes y maduros en ambas colectas con una incidencia mayor al 10% en la colecta 1.

En la variedad Catimor, el género *Penicillium* también fue lo que presentó mayor incidencia en la etapa de fermentado, seguido de la etapa de secado (Figura 2). *Aspergillus* presentó mayor incidencia en los frutos verdes y granos secando de la colecta 2. *Fusarium* presentó incidencia de 11% en frutos verdes y 14% en frutos maduros, con mayor incidencia en la colecta 1.

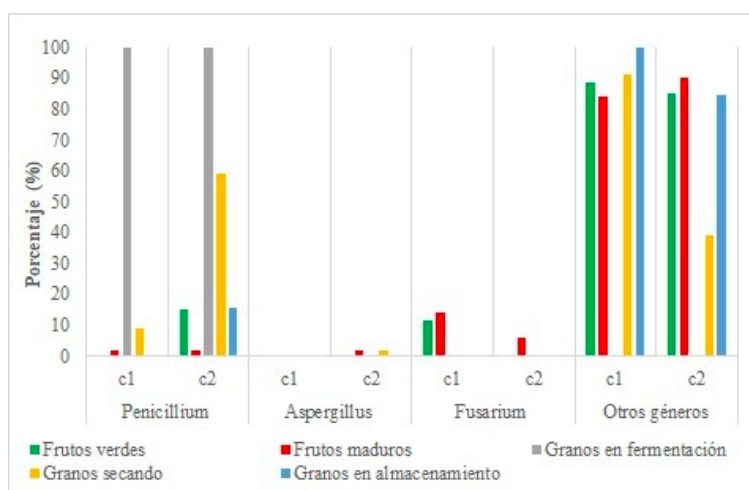


Figura 2. Incidencia fúngica en la primera (c1) y segunda colecta (c2) de los granos de café de variedad Catimor en cinco etapas distintas

1.2. Caracterización macroscópica de las colonias

Dentro de la diversidad de especies aisladas se priorizaron los géneros reportados como toxigénicos. Con base en Pitt & Hocking (2009), a continuación, se describen cuatro aislados presentes en la Figura 3. El primer aislado de *Penicillium* sp. presentó colonia de textura aterciopelada, verde claro, radialmente surcadas, exudado presente en el centro de amarillo claro a marrón; en el reverso varía de amarillo a naranja intenso; colonias planas en MEA con micelio blanco visible en el centro, con color semejante al presente en el medio CYA (Figura 3-1). El siguiente aislado de *Penicillium* sp. colonias planas y surcadas de superficie algodonosa, micelio blanco en los márgenes, verde opaco; reverso color amarillo pálido; en MEA colonias planas de color verde opaco con apariencia polvoriento; reverso pálido a marrón amarillento (Figura 3-2). El aislado de *Aspergillus* sp. es ligeramente surcado, algodonosa, micelio blanco a amarillo brillante; reverso opaco a amarillo brillante; en MEA aterciopeladas, producción de conidios moderada, marrón; reverso de MEA marrón opaco (Figura 3-3). El aislado de *Fusarium* sp. presentó micelio blanco a rosa algodonoso; reverso pálido a salmón pálido; en MEA colonias planas a moderadamente profundo con el centro de color salmón a salmón grisáceo; reverso salmón pálido (Figura 3-4).

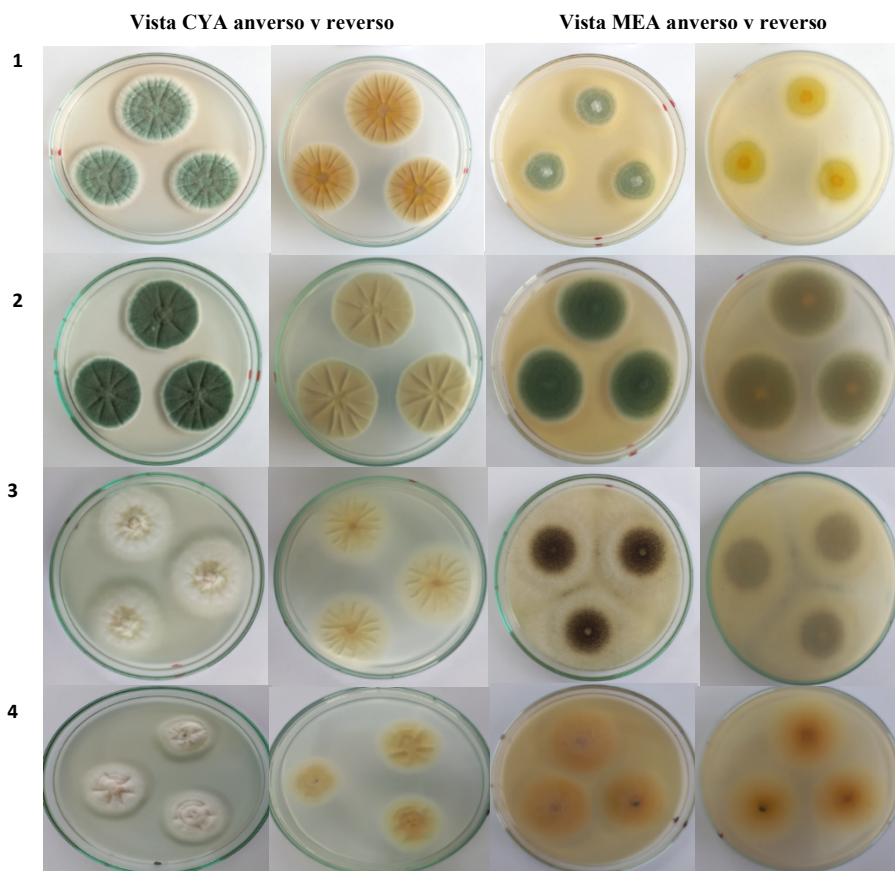


Figura 3. Apariencia de colonias en diferentes medios. Colonias de *Penicillium* sp. (línea 1 y 2), colonias de *Aspergillus* sp. (línea 3), colonias de *Fusarium* sp. (línea 4).

1.3. Características microscópicas de los aislados

Los hongos del género *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus* fueron reconocidos por las características microscópicas de sus cuerpos fructíferos, conidióforos y esporas. Algunas imágenes están condensadas en la figura 4.

1.4. Evaluación del potencial toxigénico

Para el ensayo se utilizaron los aislados de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. No se detectaron hongos productores de toxinas, específicamente aflatoxina u ocratoxina A (Figura 5).

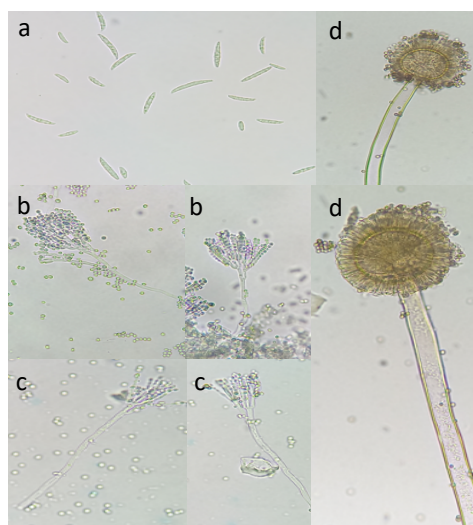


Figura 4. Micrografías tomadas con microscopio de luz. a) Macroconidios de *Fusarium* sp. ligeramente curvados con cuatro a cinco septos; b) Conidióforos de *Penicillium* sp., de estipe áspero y conidios lisos de color verde; c) Conidióforos de *Penicillium* sp., estipe liso y conidios esféricos. d) Estipes de *Aspergillus* sp. de paredes lisas, vesícula ovalada.

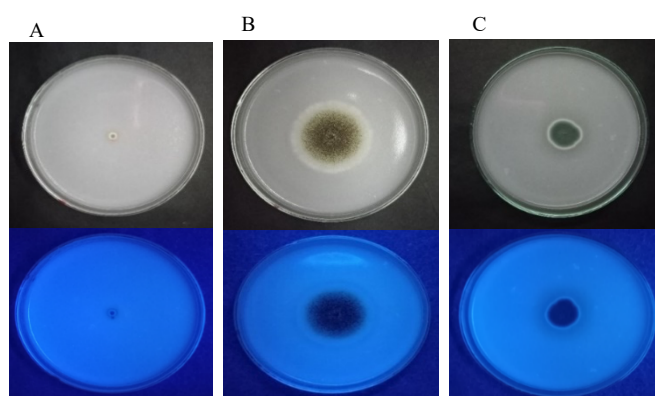


Figura 5. Prueba de fluorescencia en medio agar coco, examinado bajo luz ultravioleta a 366 nm. A) *Penicillium* sp. hallado en granos fermentados-catimor. B) *Aspergillus* sp. hallado en frutos verdes-catimor C) *Penicillium* sp. hallado en granos en la etapa de secado-caturra.

DISCUSIÓN

Una cantidad diversa de especies fúngicas ha sido descrita como contaminantes de los granos. Esta contaminación es influenciada por el tipo de manejo durante la fermentación, los periodos de secado, y el almacenamiento (Noonim et al., 2009). El café peruano suele ser procesado mediante la vía húmeda, por lo que se estima que debe presentar menor contaminación fúngica en comparación al proceso seco donde la cáscara y el mucílago no es separado del grano (Iamanaka et al., 2014; Nigam & Singh, 2014).

Los hongos aislados durante la fermentación fueron los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, los cuales son comúnmente encontrados en esta etapa (Silva et al., 2000, 2008).

El ambiente en el que son secados los granos de café influencia en el nivel de contaminación fúngica. Los granos en proceso de secado se obtuvieron de secadores solares y se considera que eso contribuyó a obtener menores porcentajes de granos infectados, en comparación a otras formas de secado, al sol y sobre mantas. Es importante destacar que se ha encontrado que los granos de café secados en invernaderos, que son distintos a los secadores solares, pueden presentar mayores niveles de contaminación que los secados en suelo de concreto o tablas de bambú (Maman et al., 2021). La incidencia de contaminación del 60% de hongos del género *Penicillium* en la etapa de secado, encontrada en Jaén, es próximo a lo reportado por Suárez Quiroz et al. (2004) para las condiciones de México.

Durante el almacenamiento, la contaminación fúngica de los granos de café verde se podría introducir debido a la humedad restante y el período de almacenamiento extendido (Maman et al., 2021). Las muestras recolectadas con dos semanas en almacenamiento mostraron un 15% de infección del género *Penicillium* en la segunda colecta de granos almacenados.

Considerando cada tipo de muestra de grano de café, en Caturra se reporta la aparición de *Aspergillus* spp. en dos muestras. Para los granos de café Catimor, estuvo presente en una muestra solamente. La menor abundancia de *Aspergillus* podría deberse a los efectos del biocontrol que ejercen las levaduras *Pichia* y *Hanseniaspora* que son comunes durante el fermentado (de Souza et al., 2017; Masoud & Kaltoft, 2006). Otro factor podría ser las condiciones ambientales que no fueron suficientemente cálidas y húmedas para las exigencias requeridas por este género ((Gil-Serna et al., 2014).

Es importante tener en cuenta que las especies de *Penicillium* que son reportadas como no toxigénicas, podrían no ser un peligro latente, suponiendo que no son patógenos, y, al contrario, podrían presentar algunos potenciales beneficios para las plantas, como mayor acceso a nutrientes, protección contra la desecación, protección contra insectos que se alimentan de la superficie, y protección contra hongos parásitos y otros microbios (White, 2000). Es importante destacar que hongos como *Penicillium* pueden tener otras funciones importantes en el ambiente, como la solubilización de fosfatos (Asea et al., 1988; Nahas, 1996; Whitelaw et al., 1999). Además, la presencia de mohos alojados en los granos de café puede influenciar en la calidad organoléptica de la bebida final. La presencia de estos microorganismos puede estar relacionada a las prácticas agrícolas, condiciones de cultivo, condiciones y temperatura de almacenamiento y transporte.

CONCLUSIÓN

Los frutos verdes, maduros, granos fermentados en proceso de secado y en almacenamiento, presentaron presencia de hongos, independiente de la variedad de café. Hubo variabilidad en la incidencia de hongos entre colectas y dependiendo de la variedad para las distintas etapas de muestreo. No se detectaron hongos potencialmente productores de AFLA u OTA. Eso no significa que estos no existan por lo que es necesario que los monitoreamientos de los campos de producción sean periódicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASEA, P. E. A., KUCEY, R. M. N., & STEWART, J. W. B. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(4), 459–464, 1988.
- DE SOUZA, M. L., PASSAMANI, F. R. F., ÁVILA, C. L. DA S., BATISTA, L. R., SCHWAN, R. F., & SILVA, C. F. Uso de leveduras selvagens como agente de biocontrole contra fungos toxigênicos e produção de OTA. *Acta Scientiarum - Agronomy*, 39(3), 349–358, 2017.
- FRISVAD, J. C., HUBKA, V., EZEKIEL, C. N., HONG, S. B., NOVÁKOVÁ, A., CHEN, A. J., ARZANLOU, M., LARSEN, T. O., SKLENÁŘ, F., MAHAKARNCHANAKUL, W., SAMSON, R. A., & HOUBRAKEN, J. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology*, 93, 1–63, 2019.
- GALARCE-BUSTOS, O., ALVARADO, M., VEGA, M., & ARANDA, M. Occurrence of ochratoxin A in roasted and instant coffees in Chilean market. *Food Control*, 46, 102–107, 2014.
- GIL-SERNA, J., VÁZQUEZ, C., GARCÍA SANDINO, F., MÁRQUEZ VALLE, A., GONZÁLEZ-JAÉN, M. T., & PATIÑO, B. Evaluation of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* in green-coffee based medium under different environmental conditions. *Food Research International*, 61, 127–131, 2014.
- GIRAUD, F., PASQUALI, M., EL JARROUDI, M., COCCO, M., DELFOSSE, P., HOFFMANN, L., & BOHN, T. Timely fungicide application: A strategy to minimize Fusarium head blight and associated mycotoxin production in winter wheats. *Journal of Plant Pathology*, 93(SUPPL. 1), 1–5, 2011.
- IAMANAKA, B. T., TEIXEIRA, A. A., TEIXEIRA, A. R. R., COPETTI, M. V., BRAGAGNOLO, N., & TANIWAKI, M. H. The mycobiota of coffee beans and its influence on the coffee beverage. *Food Research International*, 62, 353–358, 2014.
- KUNTAWE, 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., & DIANESE, J. C. A Coconut-Agar Medium for Rapid Detection of Aflatoxin Production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology* (Vol. 66, Issue 12, p. 1466), 1976.
- 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.
- MASOUD, W., & KALTOFT, C. H. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin a (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 229–234, 2006.
- NAHAS, E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(6), 567–572, 1996.

NAKAJIMA, T., YOSHIDA, M., & KAWADA, N. Fungicide application timing on fusarium head blight and mycotoxin accumulation in barley in Japan. **Cereal Research Communications**, 36(SUPPL. 6), 659–665, 2008.

NIGAM, P. S., & SINGH, A. Cocoa and Coffee Fermentations. In **Encyclopedia of Food Microbiology**: Second Edition (Second Edi, Vol. 1). Elsevier, 2014.

NOONIM, P., MAHAKARNCHANAKUL, W., NIELSEN, K. F., FRISVAD, J. C., AND SAMSON, R. A. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger* in Thai coffee beans. **Food. Addit. Contam. Part A**. 26: 94–100, 2009.

PITT, J. I., & HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. In Fungi and Food Spoilage, 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.

SILVA, C. F., BATISTA, L. R., ABREU, L. M., DIAS, E. S., & SCHWAN, R. F. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, 25(8), 951–957, 2008.

SILVA, C. F., SCHWAN, R. F., SOUSA DIAS, E., & WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, 60(2–3), 251–260, 2000.

SOLHAUG, A., KARLSØEN, L. M., HOLME, J. A., KRISTOFFERSEN, A. B., & ERIKSEN, G. S. Immunomodulatory effects of individual and combined mycotoxins in the THP-1 cell line. **Toxicology in Vitro**, 36, 120–132, 2016.

SUÁREZ QUIROZ, M., GONZÁLEZ, RIOS, O., BAREL, M., GUYOT, B., SCHORR-GALINDO, S., & GUIRAUD, J. P. Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. **International Journal of Food Science and Technology**, 39(5), 501–507, 2004.

TANIWAKI, M. H., PITT, J. I., TEIXEIRA, A. A., & IAMANAKA, B. T. 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.

WHITELAW, M. A., HARDEN, T. J., & HELYAR, K. R. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. **Soil Biology and Biochemistry**, 31(5), 655–665, 1999.