



EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

Subdirección Académica

División de Estudios de Posgrado e Investigación

"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

OFICIO: ITV/DEPI/No.097/2020

A QUIEN CORRESPONDA PRESENTE

Por medio de la presente el que suscribe Dr. Benigno Ortiz Muñiz, Jefe de la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Veracruz me permito hacer **CONSTAR** que, de acuerdo a los archivos de esta División de Estudios, el (la) **Dr. Oscar González Ríos** fungió como **Co-Director(a)** de la Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica titulada: **"Estudio de cepas de Aspergillus sección Nigri productoras de ocratoxina A (OTA) asociadas a la producción de café (Coffea arabica L.)"** desarrollada por el (la) **C. Jorge Niño Rodríguez**, número de control **M15020026**.

Se extiende la presente a la Ciudad de Veracruz, Veracruz a los cinco días del mes de marzo del año dos mil veinte.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica
Antorcha y Luz de Fuego Permanente



SEP
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

BENIGNO ORTIZ MUÑIZ

JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.c. Archivo



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar
C.P. 91897, Veracruz, Ver. Tel. (229) 934 1500

www.veracruz.tecnm.mx



SEP

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ

078

ACTA DE EXAMEN DE GRADO DE MAESTRÍA

En la H. Veracruz, Veracruz a los 31 días del mes de enero de 2018, siendo las 16:00 horas., se reunieron en el Aula Magna del Instituto Tecnológico de Veracruz, clave 30DIT0002U, el jurado integrado por:

Presidente(a): Doctor en Ciencias de los Alimentos
Mirna Leonor Suárez Quiroz

Secretario(a): Doctor en Ciencias de los Alimentos
Oscar González Ríos

Vocal: Doctor en Ciencias de Alimentos
Victor José Robles Olvera

Y de acuerdo con las disposiciones reglamentarias en vigor, se procedió a efectuar el examen de Grado de Maestría a el (la) C. Jorge Niño Rodríguez

número de control M15020026 aspirante al Grado de Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Tomando en cuenta el contenido de la tesis cuyo título es: "Estudio de cepas de Aspergillus sección Nigri productoras de Ocratoxina A (OTA) asociadas a la producción de café (Coffee arabica)"

que fue dirigida por Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz, Dr. Oscar González Ríos una vez concluido el examen oral, dictaminó que fuera APROBADO

El (la) Presidente(a) del jurado le hizo saber a él (la) sustentante el resultado obtenido, el Código de Ética Profesional y le tomó la Protesta de Ley. Dándose por terminado el Acto a las 18:00 horas, y una vez escrita, leída y aprobada, fue firmada para constancia por las personas que en el acto intervinieron, para los efectos legales a que haya lugar se asienta la presente.

PRESIDENTE (A)

[Signature]

Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz
Cédula de Grado: 5691003



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES Y ESTUDIANTILES

SECRETARIO (A)

[Signature]

Dr. Oscar González Ríos
Cédula de Grado: 5691004

VOCAL

[Signature]

Dr. Victor José Robles Olvera
Cédula de Grado: 4341030

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**Estudio de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* productoras de
Ocratoxina A (OTA) asociadas a la producción de café
(*Coffea arabica*).**

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

IBQ. Jorge Niño Rodríguez

Asesores:

Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz

Dr. Oscar González Ríos

H. Veracruz, Ver.

Enero 2018



"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

H. Veracruz, ver; a 15 diciembre del 2017

OFICIO 422 /2017

C. JORGE NIÑO RODRÍGUEZ
PRESENTE

Por este conducto se le comunica que su tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica
Titulada:

"Estudio de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* productoras de Ocratoxina A (OTA) asociadas a la
producción de café (*Coffea arabica*)"

Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del H. Jurado
del examen, por lo que está Usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.

A T E N T A M E N T E
Antorcha y Luz de Fuego permanente®

DR. JOSÉ ALBERTO MONROY RIVERA
JEFE DE LA UNIDAD



SRIA. DE EDUCACIÓN PÚBLIC.
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE VERACRUZ
Unidad de Investigación
y Desarrollo en Alimentos

EL H. JURADO

DRA. MIRNA LEONOR SUAREZ QUIROZ
PRESIDENTE

DR. OSCAR GONZÁLEZ RÍOS
SECRETARIO

DR. VICTOR JOSÉ ROBLES OLVERA
VOCAL

DRA. MARIA GUADALUPE AGUILAR USCANGA
SUPLENTE

JAMRimaribel®



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779,
Col. Formando Hogar,
C.P. 91897, H. Veracruz, Ver.
Tel.: (229) 934 1500
www.itver.edu.mx

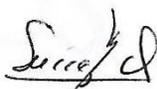


“Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos”

El presente trabajo de tesis titulado “Estudio de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* productoras de Ocratoxina A (OTA) asociadas a la producción de café (*Coffea arabica*)” presentado por la C. JORGE NIÑO RODRÍGUEZ, ha sido aprobado por su comité

MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Asesor



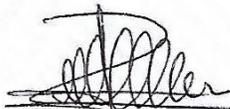
Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz

Asesor



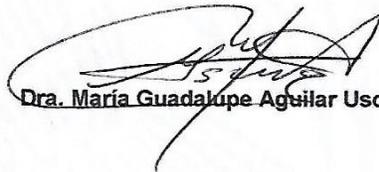
Dr. Oscar González Ríos

Revisor



Dr. Víctor José Robles Olvera

Revisor



Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

JAMR/manibel



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779,
Col. Formando Hogar,
C.P. 91897, H. Veracruz, Ver.
Tel.: (229) 934 1500
www.itver.edu.mx



**“ESTUDIO DE CEPAS DE *Aspergillus* sección *Nigri*
PRODUCTORAS DE OCRATOXINA A (OTA) ASOCIADAS A LA
PRODUCCIÓN DE CAFÉ (*Coffea arabica*)”**

Por:

IBQ. JORGE NIÑO RODRÍGUEZ

**Tesis propuesta a la
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN ALIMENTOS
del
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ**

**Como requerimiento parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

Veracruz, Ver, 30 de Enero de 2018

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme fuerzas en los momentos más difíciles y por colocar a personas buenas en mi camino.

A mi familia, porque siempre me han apoyado y alentado a lograr mis sueños, a mi hermano **Miguel Ángel** por darme sabios consejos para enfrentar la vida, a mi hermana **Yessica** por sus buenos deseos, a mi muy querido sobrino **Noé**, porque con tu sola presencia llenas de alegría nuestros días y muy especialmente a mi madre **Irene** por siempre confiar en mis decisiones.

A mis estimados compañeros de generación, porque inconscientemente me llenaban de fuerza y ánimo en un momento cuando más lo necesité, también por los gratos momentos que vivimos, serán irrepetibles.

A mis queridos compañeros de laboratorio, porque prácticamente se volvieron mi segunda familia durante mi estancia aquí en Veracruz, **Caro, Lucia, Sam, Hugo**, algunos ya han egresado, **Kim, Yeri, Lia**. Siempre les estaré agradecido por su excelente compañía, aventuras, aprecio, apoyo y buenos deseos.

A **Leo**, por su amistad sincera, por escucharme y apoyarme cuando era necesario.

He de agradecer muy especialmente a mi asesora la **Dra. Mirna L. Suárez Quiroz**, quien me invitó a formar parte de su equipo de trabajo, por compartir su gran conocimiento conmigo acerca del mundo de las micotoxinas e inocuidad alimentaria, y sobre todo por su amable disposición en brindarme todo el apoyo y herramientas necesarias para desarrollar este excelente proyecto que me apasionó desde un inicio, mil gracias Dra.

A mi asesor el **Dr. Oscar González Ríos**, por sus consejos y aportes para la realización de este trabajo y por transmitirme lo importante que es el café, lo que significa a nivel internacional y en nuestro país.

A mi comité revisor: **Dr. Víctor J. Robles Olvera, Dra. María G. Aguilar Uscanga**, gracias por el tiempo invertido a la revisión de presentaciones, documentos y tesis, sin sus aportaciones este trabajo estaría incompleto.

Un muy especial agradecimiento y reconocimiento al **Dr. Mario Ramírez Lepe †**, quien formó parte de mi comité revisor, siempre confió en este proyecto y tuvo la mejor disposición en todo momento, q.e.p.d.

Al **CONACYT e Instituto Tecnológico de Veracruz**, por el apoyo económico y académico recibido durante el desarrollo de este proyecto.

RESUMEN

Niño Rodríguez Jorge. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Enero de 2018. **Estudio de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* productoras de Ocratoxina A (OTA) asociadas a la producción de café (*Coffea arabica*).** Asesores: Dra. Mirna L. Suárez Quiroz, Dr. Oscar González Ríos.

La Ocratoxina A (OTA) es la principal micotoxina detectada actualmente en granos de café y ha sido clasificada dentro del grupo 2B como posible carcinógeno en humanos por la Agencia Internacional de Investigación para el Cáncer (IARC). La OTA es producida esencialmente en el café por especies pertenecientes al género *Aspergillus* sección *Circumdati* (*A. ochraceus* y *A. westerdijkiae*), sin embargo, recientemente un estudio mostró que durante el almacenamiento de café verde la flora fúngica dominante fueron especies pertenecientes a la sección *Nigri*, por lo que el objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar especies de *A.* sección *Nigri* presentes durante los diferentes procesamientos post-cosecha de café y evaluar su diversidad por PCR-DGGE.

Se obtuvieron muestras de café (*Coffea arabica*) por cada etapa de proceso de 4 diferentes vías de procesamiento: Vía húmeda fermentativa en ausencia de agua, fermentativa sumergida, vía mecánica y vía seca de las cosechas 2015 y 2016. Por el método de siembra directa se obtuvo el porcentaje de infección de especies de la sección *Nigri*. Las cepas que presentaron características morfológicas de la sección de estudio fueron aisladas y por el método de ELISA se evaluó su potencial ocratoxigénico, las que presentaron mayor producción de OTA fueron caracterizadas molecularmente y utilizadas como marcadores. Se realizó la extracción y amplificación del ADN de las muestras de café por PCR, se obtuvo el perfil DGGE y análisis estadístico de similitud de especies fúngicas para cada vía de procesamiento.

Se aislaron 33 cepas, 4 (*A. carbonarius* y *A. niger*) resultaron altamente productoras de OTA (110.83 - 330.41 ng/g medio), el 72.7% del total mostró la capacidad de producir la micotoxina, demostrando que las especies de esta sección constituyen la principal fuente de producción de OTA en café de México.

Los perfiles DGGE mostraron una baja incidencia de cepas toxigénicas de la sección *Nigri* y sólo fueron detectadas en muestras de café verde almacenadas en la vía húmeda fermentativa en ausencia de agua.

El análisis estadístico de similitud de especies mostró la influencia que tienen los diferentes procesamientos post-cosecha de café sobre el desarrollo de especies fúngicas durante cada etapa.

ABSTRACT

Niño Rodríguez Jorge. Master of Science in Biochemical Engineering. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. January 2018. **Study of strains of the genus *Aspergillus* section *Nigri* producing ochratoxin A (OTA) associated with coffee production (*Coffea arabica*).** Advisors: Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz, Dr. Oscar González Ríos.

Ochratoxin A (OTA) is the main mycotoxin currently detected in coffee beans and has been classified within the group 2B as a possible carcinogen in humans by the International Agency for Research on Cancer (IARC). OTA is produced essentially in coffee beans by species belonging to the genus *Aspergillus* section *Circumdati* (*A. ochraceus* and *A. westerdijkiae*), however, recently in a study it was shown that during storage of green coffee beans the dominant fungal flora were species belonging to section *Nigri*. Therefore, the objective of this work was isolate and identify species of *Aspergillus* section *Nigri* present during the different post-harvest coffee processing and to evaluate its diversity by PCR-DGGE.

Coffee samples (*Coffea arabica*) were obtained for each stage of processing of 4 different treatments: Fermentative wet process in the absence of water, submerged fermentative process, mechanical process and dry process of the 2015 and 2016 harvests. By the direct plating method, the percentage of fungal infection of section *Nigri* was obtained. The strains that presented morphological characteristics of the study section were isolated and by the ELISA method their ochratoxigenic potential was evaluated. The strains that presented higher OTA production were molecularly characterized and used as markers. The extraction and amplification of DNA from the coffee samples was performed by PCR and the DGGE profile and statistical analysis of fungal species similarity were obtained for each process.

A total of 33 strains were isolated, of which 4 (*A. carbonarius* and *A. niger*) were highly OTA producing (110.83 - 330.41 ng/g medium). The 72.7% of the total showed the capacity to produce the mycotoxin demonstrating that the species of this section constitute the main source of OTA production in coffee of Mexico.

On the other hand, the DGGE profiles showed a low incidence of toxigenic strains of section *Nigri* and were only detected in samples of green coffee beans stored from the fermentative wet process in the absence of water. The statistical analysis of species similarity showed the influence of the different post-harvest coffee processing on the development of fungal species during each stage.

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1 El café	3
1.1.1 Aspectos botánicos y agronómicos.....	3
1.1.2 Producción y aspectos económicos.....	4
1.1.3 Vías de procesamiento de café	5
1.1.3.1 Vía húmeda	6
1.1.3.2 Vía seca.....	6
1.2 Micotoxinas	7
1.2.1 Ocratoxinas.....	9
1.2.2 Ocratoxina A (OTA)	10
1.2.2.1 Características químicas, fórmula molecular y propiedades.....	11
1.2.2.2 Biosíntesis de OTA.....	11
1.2.2.3 Especies productoras de OTA.....	14
1.2.2.4 Factores implicados en la producción de OTA	15
1.2.2.4.1 Factores intrínsecos.....	15
1.2.2.4.2 Factores extrínsecos.....	16
1.2.2.5 Toxicidad de OTA.....	18
1.2.2.6 Regulación de OTA	19
1.3 Presencia de OTA en café	21
1.3.1 Especies productoras de OTA en café	21
1.4 El género <i>Aspergillus</i>	22
1.4.1 Clasificación taxonómica	22
1.4.2 Principales características morfológicas del género <i>Aspergillus</i>	23
1.4.2.1 Características morfológicas macroscópicas.....	24
1.4.2.2 Características morfológicas microscópicas.....	25

1.5 <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	25
1.6 Estudio de la diversidad microbiana en café	27
1.6.1 PCR-DGGE	27
1.6.2 Principio de la DGGE	29
1.6.3 Aplicaciones	29
1.6.4 Limitantes de la técnica	30
1.7 Importancia del estudio de especies de la sección <i>Nigri</i> en el café	32
2. JUSTIFICACIÓN	34
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo General	36
4.2 Objetivos Específicos	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS	37
5.1 Materiales	38
5.1.1 Material Biológico	38
5.1.1.1 Café de diferentes etapas de procesamiento	38
5.1.2 Medios de cultivo	38
5.1.3 Equipo de laboratorio	38
5.1.3.1 Estereoscopio	38
5.1.3.2 Microscopio de campo claro	39
5.1.3.3 Lector de micropozos	39
5.1.4 Equipo para biología molecular	39
5.1.4.1 Microcentrifuga	39
5.1.4.2 Termociclador	39
5.1.4.3 Espectrofotómetro UV- Visible	39
5.1.4.4 Equipo para DGGE	40
5.1.4.5 Transiluminador UV	40
5.2 Métodos	41
5.2.1 Muestreo	41
5.2.2 Aislamiento e Identificación de cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	42
5.2.3 Evaluación del potencial ocratoxigénico de las cepas aisladas	42

5.2.4 Estudio de la diversidad fúngica de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> mediante PCR-DGGE.....	44
5.2.4.1 Protocolo de extracción del ADN total en muestras de café.....	44
5.2.4.2 Protocolo de extracción de ADN para cepas productoras de OTA.....	45
5.2.4.3 Verificación de ADN en gel de agarosa.....	46
5.2.4.4 Verificación por espectrofotómetro UV-Visible.....	46
5.2.4.5 Amplificación por PCR acoplada a un análisis por DGGE.....	46
5.2.4.6 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE).....	48
5.2.4.7 Tratamiento estadístico de la imagen y perfiles DGGE.....	51
5.2.4.8 Secuenciación de ADN de cepas puras con alta producción de OTA.....	52
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
6.1 Aislamiento e identificación de cepas de la sección <i>Nigri</i> en las diferentes vías de procesamiento post-cosecha de café.....	53
6.1.1 Porcentaje de infección.....	53
6.1.2 Aislamiento e identificación de cepas.....	59
6.1.3 Características morfológicas de cepas aisladas.....	60
6.1.4 Evaluación del potencial ocratoxigénico de cepas aisladas.....	63
6.1.5 Caracterización molecular de cepas aisladas.....	67
6.2 Diversidad fúngica de la sección <i>Nigri</i> mediante PCR-DGGE.....	69
6.2.1 Perfiles DGGE.....	69
6.2.2 Análisis de similitud en perfiles DGGE.....	72
7. CONCLUSIONES.....	76
8. BIBLIOGRAFÍA.....	78
Anexo I. Composición y modo de preparación de medios de cultivo.....	94
Anexo II. Claves taxonómicas para especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	96
Anexo III. Claves taxonómicas para especies del género <i>Aspergillus</i> y sus teleomorfos.....	97

LISTA DE TABLAS

TABLA 1.1	Principales micotoxinas presentes en alimentos.....	8
TABLA 1.2	Contenido máximo de OTA permitido en alimentos para los estados miembros de la Unión Europea.	20
TABLA 1.3	Clasificación del género <i>Aspergillus</i>	23
TABLA 1.4	Producción de metabolitos secundarios y toxinas por especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	26
TABLA 5.5	Muestras de café obtenidas por vía de procesamiento.....	41
TABLA 5.6	Secuencia de primers utilizados para PCR.....	47
TABLA 5.7	Mezcla de reactivos y programa para PCR.....	48
TABLA 5.8	Composición de gel para DGGE.....	49
TABLA 6.9	Identificación morfológica y evaluación del potencial ocratoxigénico de las cepas aisladas.....	64

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1	Representación esquemática de las diferentes vías de procesamiento de café.....	5
FIGURA 1.2	Notificaciones alimentarias por categoría de peligro.....	9
FIGURA 1.3	Estructura química de las diferentes ocratoxinas.....	10
FIGURA 1.4	Estructura química de la OTA.....	11
FIGURA 1.5	Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de OTA propuesta por Huff y Hamilton (1979).	13
FIGURA 1.6	Estructuras microscópicas para especies del género <i>Aspergillus</i>	25
FIGURA 1.7	Etapas para el análisis por medio de PCR-DGGE.....	28
FIGURA 1.8	Porcentaje de infección fúngica en café verde almacenado	32
FIGURA 1.9	Cuantificación de OTA en granos de café verde almacenado	33
FIGURA 5.10	Diagrama general de la metodología.....	37
FIGURA 5.11	Equipo para DGGE.....	40
FIGURA 5.12	Condiciones de preparación del gel DGGE.....	50
FIGURA 5.13	Equipo DGGE en funcionamiento.....	51
FIGURA 6.14	Porcentaje de Infección por especies de la sección <i>Nigri</i> presentes en la Vía Húmeda Fermentativa en ausencia de agua.....	54
FIGURA 6.15	Porcentaje de Infección por especies de la sección <i>Nigri</i> presentes en la Vía Húmeda Fermentativa Sumergida.....	55
FIGURA 6.16	Incidencia de <i>A.</i> sección <i>Nigri</i> en la Vía Húmeda Fermentativa Sumergida.....	55
FIGURA 6.17	Porcentaje de Infección por especies de la sección <i>Nigri</i> presentes en la Vía Mecánica.....	57
FIGURA 6.18	Incidencia de <i>A.</i> sección <i>Nigri</i> en la Vía Mecánica.....	57
FIGURA 6.19	Porcentaje de Infección por especies de la sección <i>Nigri</i> presentes en la Vía Seca.....	58
FIGURA 6.20	Incidencia de <i>A.</i> sección <i>Nigri</i> en muestras de la Vía Seca.....	59
FIGURA 6.21	Cepas aisladas de <i>A.</i> sección <i>Nigri</i> en medio MEA.....	61
FIGURA 6.22	Estructuras microscópicas de <i>A. carbonarius</i>	62

FIGURA 6.23 Estructuras microscópicas de <i>A. niger</i>	62
FIGURA 6.24 Homología de AsCFSA2 <i>A. carbonarius</i> por el gen de β -tubulina.	67
FIGURA 6.25 Homología de AsCFS16 <i>A. niger</i> por el gen de β -tubulina.....	68
FIGURA 6.26 Homología de AsCN24 <i>A. niger</i> por el gen de β -tubulina.....	68
FIGURA 6.27 Perfil DGGE de la Vía húmeda fermentativa en ausencia de agua.	69
FIGURA 6.28 Perfil DGGE de la Vía Mecánica.....	70
FIGURA 6.29 Perfil DGGE de la Vía Seca.	70
FIGURA 6.30 Análisis de similitud de especies fúngicas en la Vía Húmeda Fermentativa en ausencia de agua.	72
FIGURA 6.31 Análisis de similitud de especies fúngicas en la Vía Húmeda Fermentativa Sumergida.	73
FIGURA 6.32 Análisis de similitud de especies fúngicas presentes en la Vía Mecánica.....	74
FIGURA 6.33 Análisis de similitud de especies fúngicas de la Vía seca.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Aw	Actividad de agua
BLAST	Basic Local Alignment SearchTool
CINB	Código Internacional de Nomenclatura Botánica
CYA	Agar Czapek extracto de levadura
DGGE	Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante
EFSA	Autoridad en Seguridad Alimenticia
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
EU	Unión Europea
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
<i>g</i>	Fuerza <i>g</i> (Centrifugación)
<i>g</i>	Gramo
GRAS	Generalmente Reconocido como Seguro
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
ICO	Organización Internacional del Café
JEFCA	Join FAO/WHO Expert Committe on Food Additives
MEA	Agar Extracto de Malta
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
OMS	Organización Mundial de la Salud
OTA	Ocratoxina A
OTB	Ocratoxina B
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDA	Agar de Papa y Dextrosa
pH	Potencial hidrogeno
RASFF	Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos
rpm	Revoluciones por minuto
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SSCP	Polimorfismo Conformacional Monocatenario
UV	Ultravioleta

INTRODUCCIÓN

El café es uno de los más importantes commodities en la economía mundial. Su consumo en todo el mundo casi se ha duplicado en 40 años y se prevé que sea mayor a 9 millones de toneladas para el 2019. Más de 70 países en desarrollo producen café, siendo su producción de vital importancia para su balanza de pagos (Duran *et al.*, 2013; Paterson *et al.*, 2014). El procesamiento post-cosecha de café puede realizarse a través de dos vías; la vía seca (utilizada en regiones secas y principalmente para el *Coffea canephora*) y la vía húmeda (utilizada para el *Coffea arabica*). En la vía húmeda la eliminación del mucílago puede llevarse a cabo por abrasión mecánica o mediante fermentación natural en presencia o ausencia de agua. El café es susceptible al desarrollo de hongos toxigénicos durante cada una de las etapas de procesamiento post-cosecha debido a las condiciones de humedad y temperatura óptimas para su desarrollo (Paterson *et al.*, 2014). La Ocratoxina A (OTA) es la principal micotoxina que se detecta actualmente en café y su presencia no es deseable ya que puede ser utilizada como un obstáculo para su comercialización, afectando la economía de los países productores (Suárez-Quiroz *et al.*, 2004a; Taniwaki, 2006).

La OTA es un metabolito secundario con efectos nefrotóxicos, carcinogénicos, inmunológicos y teratogénicos (IARC, 1993; Höhler, 1998; Pfohl-Leskowicz y Manderville, 2007). La OTA es producida principalmente en granos de café por especies de las secciones *Circumdati* y *Nigri* del género *Aspergillus* (Joosten *et al.*, 2001; Batista *et al.*, 2003; Taniwaki *et al.*, 2003). Se ha propuesto que las especies pertenecientes a la sección *Circumdati* (*Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus westerdijkiae*) son la principal fuente de OTA en café (Taniwaki *et al.*, 2003), sin embargo, las especies de la sección *Nigri* indican también una importante fuente de producción de OTA (Joosten *et al.*, 2001; Suárez-Quiroz *et al.*, 2004a; Noonim *et al.*, 2008b; Rezende *et al.*, 2013).

La utilización en conjunto de métodos basados en la microbiología clásica y biología molecular ha permitido identificar a nuevas especies de la sección *Nigri* (*Aspergillus lacticoffeatus* y *Aspergillus sclerotioniger*) presentes en granos de café verde, las cuales se reportan como especies altamente productoras de OTA (Samson *et al.*, 2004a; Noonim *et al.*, 2008a). Por otra parte, *Aspergillus carbonarius* perteneciente a esta sección se ha propuesto como el principal hongo responsable de la producción de OTA en uvas y sus derivados (Pitt, 2000; Battilani *et al.*, 2003; Medina *et al.*, 2005; Perrone *et al.*, 2006; Serra *et al.*, 2006a; Leong *et al.*, 2007a). Por lo anterior, se hizo necesario el estudio particular de la sección *Nigri* para determinar si constituyen la principal fuente de OTA en los procesos post-cosecha de café.

El presente trabajo tuvo como objetivo aislar e identificar la flora fúngica de la sección *Nigri* presente durante los diferentes procesamientos post-cosecha de café y evaluar su diversidad por PCR-DGGE.

1. ANTECEDENTES

1.1 El café

1.1.1 Aspectos botánicos y agronómicos

Las plantas de café pertenecen al género *Coffea* de la familia de las *Rubiáceas*. Es una semilla que procede de un árbol o arbusto denominado cafeto. Su origen fue en Etiopia, en el África Oriental, exactamente en el territorio denominado «Kaffa», de cuyo nombre se deriva el café (Echeverri *et al.*, 2005).

Los granos de café o semillas, están contenidos en el fruto del arbusto, que en el estado de madurez es de color rojo y se le denomina "cereza". Cada cereza consiste en una piel exterior que envuelve una pulpa dulce. Debajo de la pulpa están los granos recubiertos por una membrana; estas membranas envuelven las dos semillas de café. La semilla del café es de aproximadamente un centímetro de largo, tostada y molida se usa para preparar una bebida estimulante.

El cafeto comienza a dar frutos cuando tienen de 3 a 5 años de edad y presenta un óptimo desarrollo en climas cálidos y semicálidos, con una temperatura media anual entre 18 y 21°C, no mayor de 26°C ni menor de 16°C; las precipitaciones ideales para su cultivo fluctúan entre 1200 y 1800 mm anuales distribuidos durante todo el año, aunque también debe existir una estación seca para permitir su floración. En general, dichas condiciones se reúnen en la franja que está comprendida entre el trópico de Cáncer y el de Capricornio (Nolasco, 1985).

Actualmente existen 80 especies de este género y varios cientos de variedades. Las principales especies que se cultivan y participan en el comercio mundial son *Coffea arabica* y *Coffea canephora*, conocidos como café arábica y robusta respectivamente. (Hamdouche *et al.*, 2016)

Coffea arabica es la especie más apreciada y explotada a nivel mundial. Crece en alturas entre 900 y 2000 msnm. Su contenido en cafeína es relativamente bajo (0.9%-1.5%). Su cultivo es más delicado y requiere mayores cuidados. Sus frutos son redondos, suaves, levemente agrios, presentan un color rojo cereza, de corteza lisa e intenso perfume.

Por su parte *C. canephora* es más precoz y resistente que la anterior. Crece a altitudes bajas (0- 900 msnm). Sus granos son menos perfumados, picantes y astringentes y su contenido en cafeína es superior (2%-4.5%).

El café arabica posee un aroma fino y acidez agradable, mientras que el café robusta presenta una baja acidez, pero en cambio proporciona una bebida con más cuerpo (Puerta, 1998).

1.1.2 Producción y aspectos económicos

El café es el segundo producto de mayor importancia económica en el mercado internacional, solamente le antecede el petróleo. La producción total mundial de café en 2016 se estimó en 157.4 millones de sacos de 60 kg (9.4 millones de toneladas). África, México-América Central representaron el 10.9% y 12.9 % respectivamente, Asia-Oceanía el 28.6% y América del sur el 47.6% de la producción total (ICO 2016).

El café es producido por 78 países en el mundo. Este producto representa para muchos países en vías de desarrollo la mayor de sus exportaciones totales, además de ser importante para el desarrollo social debido a que su cultivo es una excelente fuente de empleo rural, que da trabajo a 125 millones de personas en el mundo (Paterson *et al.*, 2014). Diecinueve países son los responsables del 90 % de la producción mundial total, entre los cuales México se encuentra entre los 10 primeros (ICO 2016).

En México los principales estados productores de café son Chiapas Veracruz, Oaxaca y Puebla, otras entidades que lo producen son: Guerrero, San Luis Potosí, Nayarit, Hidalgo, Jalisco, Querétaro, Colima y Tabasco, en su mayoría la producción de café nacional se canaliza para la exportación (SAGARPA 2011).

1.1.3 Vías de procesamiento de café

Después de la cosecha, el café cereza puede someterse a un procesamiento húmedo o seco (Figura 1.1). El procesamiento seco o por vía seca representa la variante más simple, mientras que el método húmedo o vía húmeda corresponde a una serie de operaciones. El objetivo de estos métodos es eliminar las partes externas del café cereza, es decir, la piel del fruto (exocarpio), la pulpa (mesocarpio), y el pergamino (endocarpio), para obtener café verde (Champion *et al.*, 2008).

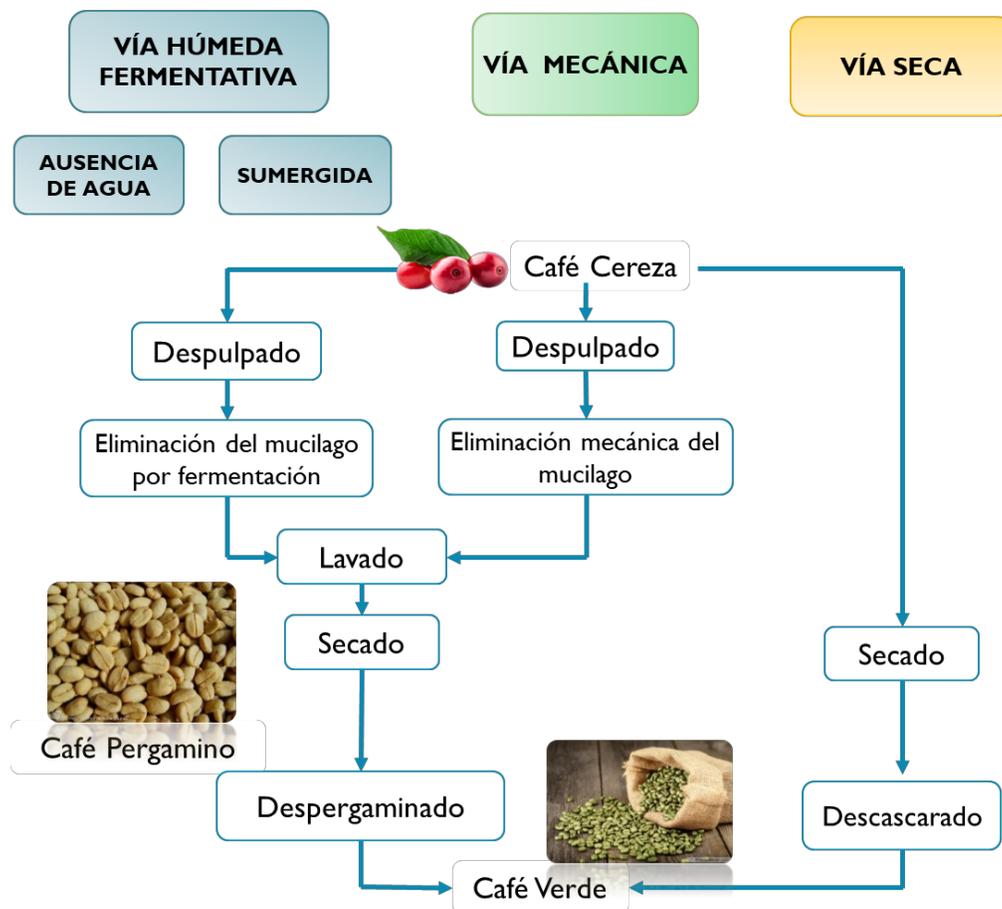


FIGURA 1.1 Representación esquemática de las diferentes vías de procesamiento de café.

1.1.3.1 Vía húmeda

El proceso por vía húmeda comprende las siguientes etapas: recolección de café cereza, despulpado, remoción del mucilago, lavado y secado hasta obtener café pergamino seco con una humedad menor a 12%. Posteriormente, el grano seco se trilla para retirar el pergamino que lo cubre, obteniéndose de esta forma el café verde, el cual es seleccionado y clasificado cuidadosamente, tomando en cuenta su tamaño, peso, color y defectos. La remoción del mucílago puede llevarse a cabo sometiendo el café despulpado a una fermentación en ausencia o presencia de agua y mediante la utilización de desmucilagadores mecánicos, denominadas vía húmeda fermentativa en ausencia de agua, fermentativa sumergida y vía mecánica respectivamente.

El procesamiento de café por vía húmeda requiere una maduración uniforme de los frutos; siendo necesario recurrir a una recolección manual, por lo que sólo las cerezas completamente maduras y rojas pueden ser usadas, debido a que las cerezas inmaduras (verdes y amarillas) no pueden ser despulpadas correctamente y las cerezas sobremaduras (negras) se pudrirán durante la fermentación.

El café cereza arábica es procesado principalmente por vía húmeda (Chalfoun y Carvlaho; 1987), y mediante esta se produce una tercera parte de la producción mundial. Sin embargo, en Brasil, Yemen y Etiopía más del 80% de café arábica, se procesa por la vía seca (Masoud, 2006).

1.1.3.2 Vía seca

El procesamiento por vía seca consiste en someter las cerezas de café con cualquier grado de madurez a un secado directo al sol, obteniendo café cereza seco, posteriormente este pasa a un proceso de descascarado por medios mecánicos para producir café verde. El procesamiento por este método es poco costoso, pero produce resultados de baja calidad.

El café robusta es principalmente procesado por la vía seca, debido a que posee una pulpa delgada que permite el secado directo.

Los factores que determinan la vía a ser utilizada están dados por la precipitación fluvial, tradición y economía de cada región productora.

Durante cada una de las diferentes etapas de procesamiento post-cosecha es donde se determina la calidad e inocuidad final de los granos de café, debido a que estos son susceptibles a la contaminación por hongos capaces de producir micotoxinas.

1.2 Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos, cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea reduce la actividad, hace enfermar o causa la muerte de animales y personas (Pitt, 1996). Se denomina micotoxicosis a la respuesta tóxica causada por las micotoxinas en el hombre y los animales.

El primer indicio documentado de enfermedad causada por micotoxinas data de la Edad Media en Europa, se trataba del ergotismo, atribuido al consumo de alimentos preparados con cereales contaminados con alcaloides ergóticos, producidos por el hongo *Claviceps purpurea* (Bove, 1970). Posteriormente en el siglo XX, la producción de toxinas de *Fusarium* y *Stachybotrys* en cereales almacenados durante el invierno ocasionó en Siberia y Rusia la muerte de miles de personas y animales, durante la Segunda Guerra Mundial, debido a una micotoxicosis conocida como Aleucia Tóxica Alimentaria (ATA) (Nesterov, 1951).

Debido a su diversidad química, las micotoxinas pueden disolverse en las fases lipídicas (fundamentalmente) o acuosas de los alimentos, y difundirse a su interior (Pitt, 2000). En consecuencia, estas toxinas pueden ser encontradas principalmente en cereales, semillas, frutas, y alimentos elaborados en base a estas materias primas. Se ha estimado que hasta un 25% de los cultivos alimentarios mundiales están contaminados con micotoxinas (OMS, 1999).

Aunque existen muchos tipos de micotoxinas, en la Tabla 1.1 se presenta algunas de las principales, en cuanto a presencia en productos alimenticios y toxicidad para los seres vivos, también se incluye los hongos productores, los alimentos principales que contaminan y sus efectos tóxicos más representativos.

TABLA 1.1 Principales micotoxinas presentes en alimentos
(González Salgado, 2010).

MICOTOXINA	HONGO	SUSTRATO PRINCIPAL	PRINCIPALES EFECTOS TÓXICOS
Aflatoxinas	<i>Aspergillus</i> sp.	Cereales, leche, frutos secos	Altamente cancerígena, produce toxicidad y cáncer de hígado
Citrinina	<i>Penicillium</i> sp.	Cereales y frutas	Efecto nefrotóxico, inmunosupresora
Fumonisinias	<i>Fusarium</i> sp. <i>A. niger</i>	Cereales (maíz)	Carcinógena, hepatotóxica
Ocratoxinas	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Penicillium</i> sp.	Cereales, café, legumbres, quesos, carnes ahumadas, frutas	Efecto nefrotóxico, necrosis hepática, efecto inmunosupresor
Patulina	<i>Penicillium</i> sp.	Cereales, frutas, quesos	Neurotóxica, afecciones pulmonares, lesiones de hígado y riñón, carcinomas, inmunosupresora.
Tricotecenos (T2, NIV, DON)	<i>Fusarium</i> sp.	Cereales	Afecciones sistema digestivo, circulatorio, nervioso y piel.
Zearalenona	<i>Fusarium</i> sp.	Cereales y subproductos	Afecciones sistema reproductor, estrógena.

NIV: Nivalenol, **DON:** Deoxinivalenol, **T2:** Toxina T2

Los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* contienen básicamente las principales especies y cepas productoras de micotoxinas.

Varios países han adoptado regulaciones para limitar la incidencia de micotoxinas en alimentos, por lo que su presencia impacta al comercio internacional.

De acuerdo con el informe anual del Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF), en 2016 las micotoxinas representaron el segundo peligro en las notificaciones alimentarias de rechazo fronterizas de la Unión Europea (EU), registrándose 551 notificaciones en el rubro de micotoxinas de un total de 3060 notificaciones (Figura 1.2).



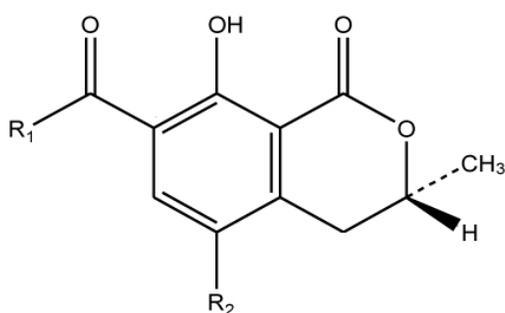
FIGURA 1.2 Notificaciones alimentarias por categoría de peligro (RASFF, 2016).

1.2.1 Ocratoxinas

Las ocratoxinas son pentaquétidos cíclicos que contienen una porción de isocumarina, normalmente ligado a una L-fenilalanina a través de un grupo carboxilo, mediante un enlace amida. Existen 5 tipos de ocratoxinas, sin embargo, la más tóxica es la ocratoxina A (OTA). En la estructura de esta toxina, la porción de isocumarina está clorado y ligado a una L-fenilalanina (EFSA, 2006). La ocratoxina B (OTB) es el derivado no clorado de la OTA, y es significativamente menos tóxica tanto *in vivo* como *in vitro* (Mally *et al.*, 2005). La ocratoxina C (OTC) es el éster de la OTA, y su posible

potencial tóxico, aunque se considera prácticamente nulo, se ha descrito específicamente sobre algunas líneas celulares de monocitos en el ser humano (O'Brien y Dietrich, 2005).

La ocratoxina α (OT α) y la ocratoxina β (OT β) son productos de la hidrólisis de la OTA y OTB respectivamente, no poseen la molécula de fenilalanina y no se consideran tóxicas (Kuiper-Goodman y Scott, 1989; O'Brien y Dietrich, 2005). En la Figura 1.3 se muestra la estructura química de las diferentes ocratoxinas.



TIPO DE OCRATOXINA	R1	R2
Ocratoxina A	Fenilalanina	Cl
Ocratoxina B	Fenilalanina	H
Ocratoxina C	Fenilalanina, etil éster	Cl
Ocratoxina α	OH	Cl
Ocratoxina β	OH	H

FIGURA 1.3 Estructura química de las diferentes ocratoxinas (González Salgado, 2010).

1.2.2 Ocratoxina A (OTA)

La OTA fue aislada por primera vez en 1965 por un grupo de investigadores sud-africanos a partir de *Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe, *et al.*, 1965) y fue identificada en Estados Unidos en 1969 en muestras de maíz.

1.2.2.1 Características químicas, fórmula molecular y propiedades

La OTA está constituida por la 7-carboxi-5-cloro-8-hidroxi-3, 4,-dihidro-3-R-metilisocumarina unida a través de un enlace peptídico en el C-7 a la L-β-fenilalanina por medio de un enlace amido (Figura 1.4). Sus sinónimos corresponden a OA y OTA (Cole y Cox, 1981).

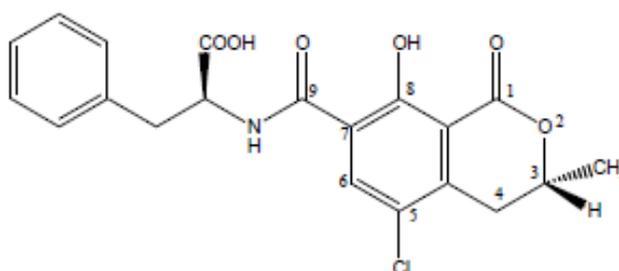


FIGURA 1.4 Estructura química de la OTA (Cole y Cox, 1981).

La OTA es un compuesto cristalino blanco de fórmula molecular $C_{20}H_{18}ClNO_6$, con una masa molecular de 403.8 g/mol. La OTA exhibe fluorescencia azul bajo la luz UV. La sal de sodio de esta molécula es hidrosoluble, moderadamente soluble en disolventes orgánicos polares como cloroformo y metanol (Budavari, 1989). También se considera termoestable debido a que sobrevive a la mayoría de los procesos de alimentos, tales como tostado, malteado y cocción, por mencionar algunos (Krogh *et al.*, 1973; Scott, 1996).

1.2.2.2 Biosíntesis de OTA

Las rutas biosintéticas de la formación de OTA por diversas especies fúngicas no han sido ampliamente descritas. En 1979 Huff y Hamilton propusieron una ruta basada en tres distintas etapas para la biosíntesis de OTA. La primera corresponde a la síntesis de un residuo poliquétido de ocratoxina α ($OT\alpha$) a partir de acetil CoA y malonato. En un primer paso, una enzima poliquétido sintasa inicia la síntesis del residuo poliquétido a través de la vía del acetato-malonato, dando lugar a meleina como intermediario. A

continuación, la meleina es metilada y oxidada, dando lugar a ocratoxina β (OT β), y una molécula de cloro es incorporada directamente para dar lugar a OT α . En la segunda etapa se sintetiza el otro precursor, la fenilalanina, a partir de ácido shikímico, que se une a su vez a la OT α . Por último, en la tercera etapa, una enzima sintetasa genera ocratoxina C (OTC), y una esterasa conduce finalmente a la formación de OTA (Figura 1.5).

Sin embargo, en un estudio realizado por Harris y Mantle en 2001 no se encontró evidencia de que la meleina y OTC jueguen un rol de intermediarios en la ruta biosintética de OTA. Ellos difieren de la ruta propuesta por Huff y Hamilton y proponen una ruta donde la OT β , un intermediario pentacético, puede transformarse eficientemente tanto en OTA como en OTB con valores de 14 y 19% respectivamente. Por otra parte, observaron que la OT α previamente clorada puede transformarse en OTA, por lo que sugiere que la cloración es el penúltimo paso en la ruta de síntesis de OTA.

Una de las enzimas clave para la biosíntesis es la ocratoxina-A-sintetasa. Se propone que esta enzima cataliza el último paso de la biosíntesis de OTA, a partir de OT α y fenilalanina.

En la actualidad, se sabe que los genes involucrados en la biosíntesis de micotoxinas y otros metabolitos secundarios están organizados formando agrupaciones de genes o clusters, en los que se incluyen genes responsables de la propia síntesis, de la regulación de la ruta, del transporte del producto sintetizado y de la autoprotección del hongo frente al propio metabolito (Ehrlich *et al.*, 2005; Shwab y Keller, 2008).

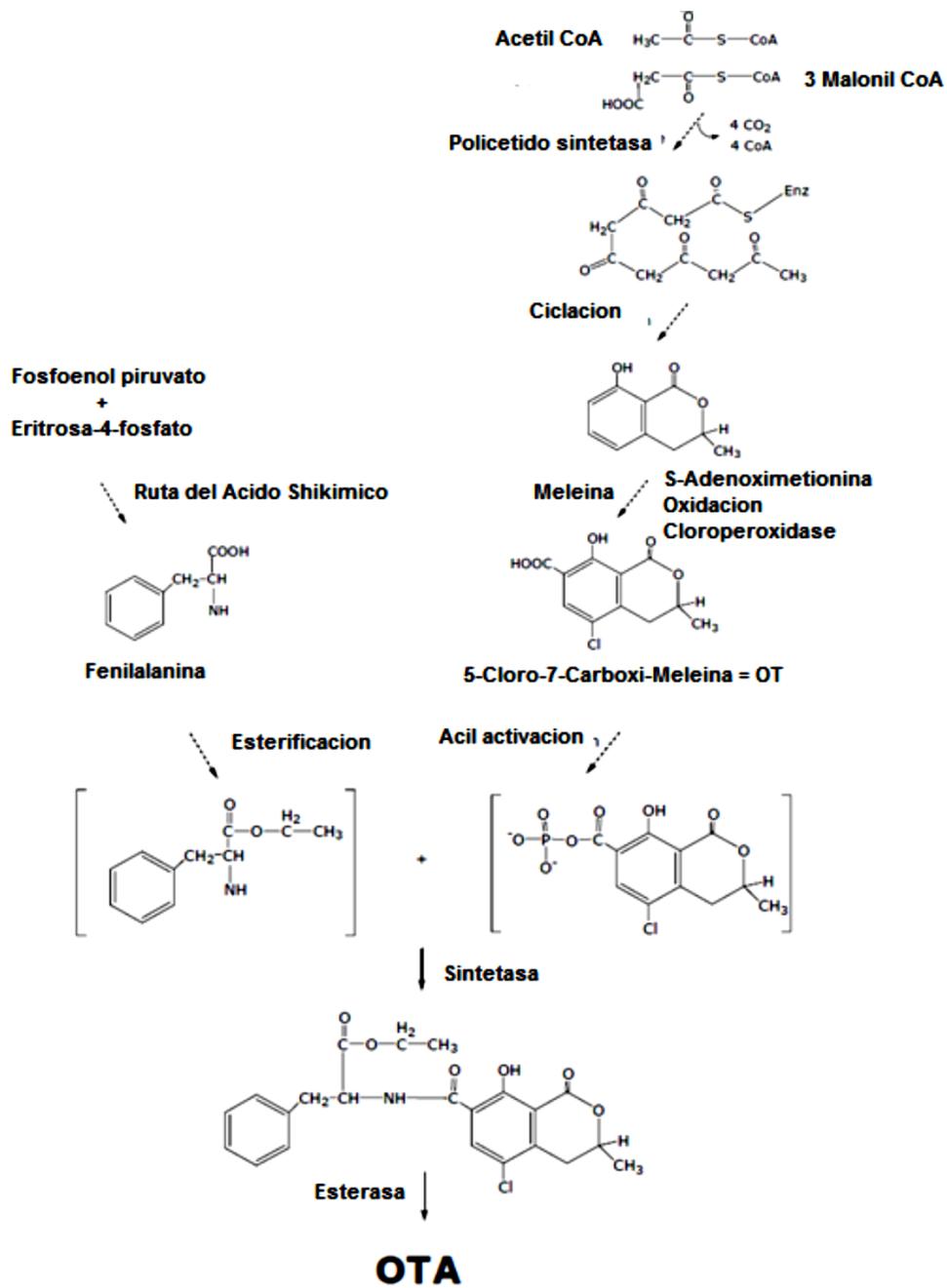


FIGURA 1.5 Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de OTA propuesta por Huff y Hamilton (1979).

1.2.2.3 Especies productoras de OTA

Las especies productoras de OTA pertenecen a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Dentro del género *Aspergillus* las que producen OTA se pueden dividir en dos grupos distintos: el primero incluye especies productoras de conidios marrón dorado, clasificadas dentro de la sección *Circumdati* y relacionadas con *Aspergillus ochraceus*, el segundo incluye especies productoras de conidios negros, clasificadas dentro de la sección *Nigri* de la cual *Aspergillus carbonarius* es la más importante.

Las especies de la sección *Nigri* han adquirido gran importancia como productoras de OTA desde la primera descripción de la producción de esta micotoxina por *A. niger* (Abarca *et al.*, 1994), por *A. carbonarius* (Horie, 1995), y por *A. tubingensis* (Medina *et al.*, 2005). Sin embargo, existe una gran diferencia entre los porcentajes de cepas ocratoxigénicas en cada caso, siendo cercano al 100% en *A. carbonarius* y variando entre el 0.6 y el 50% en el agregado *A. niger* (González Salgado, 2010). Algunos autores han señalado a su vez la capacidad de las especies uniseriadas (*A. japonicus/A. aculeatus*) de producir OTA (Dalcero *et al.*, 2002; Battilani *et al.*, 2003; Magnoli *et al.*, 2004), aunque este hecho no está totalmente aceptado, ya que en general no se consideran especies productoras (Visconti *et al.*, 2008).

Ocasionalmente, también se ha descrito la producción de OTA por especies de *Aspergillus* no pertenecientes a las secciones *Circumdati* o *Nigri*, como *A. albertensis* (Varga *et al.*, 1996) *A. fumigatus* o *A. terreus* (Riba *et al.*, 2008).

Dentro del género *Penicillium*, la producción de OTA se detectó inicialmente en *Penicillium viridicatum* (Van Walbeek *et al.*, 1969) y posteriormente en otras especies, si bien en algunos casos se trataba de cepas erróneamente identificadas. La revisión de la identificación de cepas ocratoxigénicas de *P. viridicatum* permitió detectar que, en realidad, se trataba de cepas de *P. verrucosum* (Pitt, 1987). *P. verrucosum* se ha dividido en dos especies ocratoxígenas: *P. verrucosum* y *P. nordicum* (Frisvad y Samson, 2004; Bragulat *et al.*, 2008).

1.2.2.4 Factores implicados en la producción de OTA

Existen múltiples factores que intervienen en el desarrollo fúngico y también en la biosíntesis de metabolitos secundarios. Los principales factores que contribuyen a la formación de una micotoxina en los productos alimentarios están ligados principalmente a los factores intrínsecos relacionados con la especie fúngica y los factores extrínsecos constituidos por las condiciones medio-ambientales (humedad, temperatura, actividad de agua (Aw), así como otros factores como el daño a la integridad de los granos debido a la presencia de plagas (Northolt, *et al.*, 1979; Le-Bars, 1988; Cabrera, *et al.*, 2001).

1.2.2.4.1 Factores intrínsecos

Dentro de las especies consideradas como toxigénicas, no todas tienen la capacidad de presentar esta propiedad. La producción de las micotoxinas depende primordialmente de las características individuales de cada cepa, de su base genética. Existen estudios que han permitido la detección de algunos genes que podrían estar involucrados en la biosíntesis de OTA. Inicialmente se caracterizaron genes que codificaban una policétido sintasa expresada exclusivamente cuando el hongo se desarrollaba en condiciones favorables para la producción de OTA. La identificación se realizó en *A. ochraceus* (O'Callaghan *et al.*, 2003) y en *P. nordicum* (Geisen *et al.*, 2004; Karolewicz *et al.*, 2005) pero entre ambas especies estos genes presentaban poca homología. Se han podido identificar además en *P. nordicum* otros genes de enzimas posiblemente involucradas igualmente en el proceso de biosíntesis: una péptido sintasa no ribosómica, una halogenasa, una fenilalanina RNAt sintetasa, una metilasa y un fragmento homólogo a genes ABC transportadores (Färber *et al.*, 2004; Karolewicz *et al.*, 2005).

1.2.2.4.2 Factores extrínsecos

Sustrato

La producción de micotoxinas está muy ligada a la composición del sustrato. Las diferencias en las características físicas y químicas del sustrato, la disponibilidad de agua y oxígeno, el contenido en azúcares, proteínas o aminoácidos o las trazas de minerales presentes puede influir de forma significativa en la producción de OTA y otras micotoxinas (Ominski *et al.*, 1994; Mühlencoert *et al.*, 2004).

Actividad de agua (A_w)

La A_w es conocida como la cantidad de agua libre disponible para el crecimiento microbiano y para los procesos químicos y enzimáticos. En los alimentos, no toda el agua se encuentra en estado libre, una parte se puede encontrar ligada a las proteínas o formando parte de otros compuestos.

Los requerimientos de agua para cepas fúngicas que atacan productos alimenticios son relativamente bajos, muchas especies crecen a 0.85 A_w o menos, aunque algunas levaduras requieren generalmente una alta actividad de agua. El valor de 0.60 A_w es considerado el límite para el crecimiento celular, pero las esporas de *Aspergillus* y *Penicillium*, por ejemplo, son capaces de sobrevivir a bajas A_w por varios años (Carlile *et al.*, 2001).

Temperatura

La temperatura juega un papel importante en el desarrollo y producción de micotoxinas. Este factor está correlacionado directamente con el crecimiento de las cepas fúngicas. En general, las especies de *Penicillium* spp. presentan una producción de OTA a rangos de temperatura inferiores a los de las especies de *Aspergillus*. Este hecho permite relacionar la producción de OTA en climas fríos a *Penicillium* spp, concretamente *P. verrucosum*, mientras que en zonas de clima cálido y templado la producción de OTA está más relacionada con especies ocratoxigénicas del género *Aspergillus* (Heenan *et al.*, 1998; Abarca *et al.*, 2001; Logrieco *et al.*, 2003).

pH

Este factor puede influir también en el crecimiento del hongo y la producción de micotoxinas. Sin embargo, su efecto no parece ser tan limitante como el de otros factores, por lo que se ha estudiado en modelos que incluyen otras variables (Bullerman, 1985; Patterson *et al.*, 1986).

El requerimiento ácido/alcalino para el crecimiento de levaduras y hongos es muy amplio, el rango va de un pH de 3 hasta 8, con un óptimo alrededor de pH 5, si los requerimientos nutritivos son satisfechos. En general, las especies de *Aspergillus* son más tolerantes a un pH alcalino mientras que las especies de *Penicillium* parecen ser más tolerantes a pH ácido (Wheeler *et al.*, 1991).

Oxígeno

Todos los hongos filamentosos y levaduras, poseen un requerimiento absoluto de oxígeno. La reducción de la presión parcial de este factor tiene un efecto inhibitorio muy marcado sobre la toxigenénesis y la concentración de oxígeno disuelto en el sustrato tiene una influencia mucho mayor en el crecimiento de hongos que la tensión de oxígeno atmosférico (Pitt y Hocking, 1997).

Otros factores

La composición de la atmósfera donde se desarrolla el hongo puede afectar el crecimiento de las especies productoras de OTA y también la posible presencia de la micotoxina en el sustrato. Paster *et al.*, (1983) observaron que la producción de OTA por una cepa de *A. ochraceus* se inhibía completamente con un porcentaje de CO₂ del 30% independientemente de los niveles de O₂ presentes. Este efecto inhibitorio no estaba relacionado con un efecto directo sobre el crecimiento fúngico ya que el crecimiento sólo se veía afectado a partir de niveles del 60% de CO₂ y superiores.

Por otra parte, la microflora competitiva de diferentes microorganismos, tales como bacterias u otros hongos, puede afectar el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas. Es por esto que varios microorganismos han sido reportados como agentes control de plagas biológicas. Un ejemplo claro se observa en *Trichoderma*

harzianum el cual produce una enzima lítica, quitinasa con una actividad antifúngica contra un amplio rango de cepas fúngicas, una de ellas, *A. niger* (Nampoothiri *et al.*, 2004, Valero *et al.*, 2007).

1.2.2.5 Toxicidad de OTA

Bajo condiciones experimentales, se ha comprobado que la OTA es nefrotóxica en todas las especies de animales estudiadas hasta el momento, incluyendo a roedores, cerdos, pájaros y pequeños rumiantes, e incluso a muy bajas concentraciones (Walker y Larsen, 2005). La mayoría de los informes sobre nefropatía inducida por OTA fueron obtenidos en estudios experimentales con cerdos, en los que se describieron cambios tanto estructurales como funcionales (Stoev *et al.*, 2002). Así mismo, en cerdos y otros animales (roedores, conejos), se produjeron trastornos en el hígado, dando lugar a una acumulación de glucógeno en los tejidos hepático y muscular, se inhibió la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Verma y Chakraborty, 2008), y se comprobaron efectos neurotóxicos, teratogénicos e inmunosupresores (JECFA, 2001; Follmann y Lucas, 2003; Pfohl-Leszkowicz y Manderville, 2007).

Basándose en estudios de carcinogénesis realizados con ratas y ratones, en los que la administración crónica de OTA provocó cáncer hepático y renal (National Toxicology Program, 1989), la OTA fue clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) como un posible carcinógeno para el ser humano en el grupo 2B (IARC, 1993).

En humanos, la exposición a OTA se ha asociado con la Nefropatía Endémica de los Balcanes (BEN), una afección renal de etiología desconocida, que hasta ahora sólo se ha observado en algunas partes de la Península Balcánica. La BEN es una enfermedad crónica, de evolución lenta, y que finalmente causa la muerte por fallo renal (Stefanovic *et al.*, 2006). En las zonas de la Península Balcánica donde prevalece la enfermedad se ha observado una elevada concentración de OTA en alimentos habituales en la dieta (Fink-Gremmels, 2005; Castegnaro *et al.*, 2006), y también se han detectado niveles elevados de la toxina en sangre y orina, considerados como biomarcadores de exposición (Castegnaro *et al.*, 1990).

Las lesiones renales en esta enfermedad son comparables a las advertidas en la nefropatía porcina vinculada con la OTA (Pfohl-Leszkowicz y Manderville, 2007). Otras patologías asociadas con la OTA son los Tumores del Tracto Urinario (UTT), descritos también con mayor incidencia en las áreas endémicas para BEN (Fink-Gremmels, 2005), y la Nefropatía Crónica Intersticial (en el Norte de África) (Bayman y Baker, 2006).

Aunque el mecanismo de acción de la OTA es desconocido, la inhibición de la síntesis de proteínas se ha definido como el mecanismo de toxicidad primario (Bayman y Baker, 2006). Por otra parte, según la EFSA, evidencias científicas indican que la toxicidad renal, así como el daño genotóxico, medidos en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, pueden ser atribuidos a daño celular oxidativo causado por la toxina (EFSA, 2006).

1.2.2.6 Regulación de OTA

Hasta finales de la década de los 90, las regulaciones para micotoxinas eran, en su mayoría, legislaciones a nivel nacional (Van Egmond *et al.*, 2007). Gradualmente, dichas regulaciones se han ido unificando y armonizando para países miembros tanto de la Unión Europea como de otras comunidades económicas, y el número de países que se unen a estas regulaciones conjuntas ha ido en aumento.

En el caso de regulaciones para OTA, en 1991, el Comité Conjunto de Expertos sobre Aditivos Alimentarios de la FAO/OMS (Joint Expert Committee on Food Additives) estableció un valor de ingesta semanal tolerable para OTA de 112 ng/kg de peso corporal (16 ng/kg/día). En 1998, debido a las propiedades tóxicas de la OTA, el Comité Científico sobre Alimentos de la UE (European Union Scientific Committee for Food) estimó que el nivel aceptable de seguridad en la ingesta diaria de OTA debía estar por debajo de 5 ng/kg. Desde el año 2002 la Unión Europea (UE) dispone de una normativa por la que se establecen los niveles máximos de OTA en distintos alimentos.

El último reglamento propuesto por la Unión Europea para contenidos máximos de OTA permitidos en productos alimentarios ha sido publicado en 2006 (Tabla 1.2)

(Comisión Europea, 2006). EFSA en ese mismo año declara una ingesta semanal tolerable para OTA de 120 ng/kg de peso corporal (EFSA, 2006).

TABLA 1.2 Contenido máximo de OTA permitido en alimentos para los estados miembros de la Unión Europea (Comisión Europea, 2006).

PRODUCTO ALIMENTICIO	LÍMITE OTA (µg/kg)
Cereales:	
- Cereales no elaborados	5
- Productos derivados de cereales no elaborados, incluidos los productos transformados a base de cereales y los cereales destinados al consumo humano directo.	3
Uvas pasas (pasas de Corinto, sultanas y otras variedades de pasas)	10
Café:	
- Café tostado en grano y café tostado molido, excluido el café soluble	5
- Café soluble (café instantáneo)	10
Vino:	
- Vino (incluidos los vinos espumosos y excluidos los vinos de licor y los vinos con un grado alcohólico mínimo de 15 % vol.) y vino de frutas.	2
- Vino aromatizado, bebidas aromatizadas a base de vino y cocteles aromatizados de productos vitivinícolas.	2
Zumo de uva, zumo de uva concentrado reconstituido, néctar de uva, mosto de uva y mosto de uva concentrado reconstituido, destinados al consumo humano directo.	2
Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad.	0.5
Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales y dirigidos específicamente a los lactantes.	0.5
Café verde, frutos secos distintos de las uvas pasas, cerveza, cacao y productos del cacao, vinos de licor, productos cárnicos, especias y regaliz.	-

1.3 Presencia de OTA en café

La OTA es la principal micotoxina que se detecta actualmente en granos de café (Taniwaki, 2006), su presencia como contaminante en café verde fue descrita por primera vez por Levi *et al.*, (1974) en niveles que fluctuaron entre 20 a 360 ppb y un límite de detección de 20 ppb. Desde entonces y hasta la fecha, los métodos de cuantificación de OTA son cada vez más sensibles y han puesto de manifiesto que la contaminación por esta toxina en café sigue siendo un problema que pone en riesgo la salud de los consumidores.

1.3.1 Especies productoras de OTA en café

La producción de OTA en los granos de café está relacionada a dos géneros de hongos: *Aspergillus* y *Penicillium*. Particularmente *A. ochraceus* y *A. westerdijkiae* (sección *Circumdati*) y *A. Carbonarius* y *A. niger* (sección *Nigri*) son las que frecuentemente se desarrollan en cerezas y granos de café (Paterson *et al.*, 2014)

Se ha propuesto que *A. ochraceus* es la principal fuente de OTA en café (Taniwaki *et al.*, 2003), sin embargo, las especies de la sección *Nigri* indican también una importante fuente de producción de la toxina (Joosten *et al.*, 2001; Taniwaki *et al.*, 2003; Pardo *et al.*, 2004; Suárez-Quiroz *et al.*, 2004a; Noonim *et al.*, 2008b; Rezende *et al.*, 2013).

Por otra parte, en años recientes la utilización de métodos polifásicos en combinación con la secuenciación del gen de la β -tubulina ha permitido aislar e identificar a 4 nuevas especies de la sección *Nigri* (*A. aculeatinus*, *A. scleroticarbonarius*, *A. lacticoffeatus* y *A. sclerotioniger*) presentes en granos de café verde, reportándose que *A. lacticoffeatus* y *A. sclerotioniger* son especies altamente productoras de OTA (Samson *et al.*, 2004a; Noonim *et al.*, 2008a).

1.4 El género *Aspergillus*

El término *Aspergillus* fue catalogado por primera vez en 1729 por el biólogo italiano Pier Antonio Micheli, uso el nombre “*Aspergillum*” por parecerse al instrumento usado para dispersar agua bendita (Hawksworth, 1976). Las especies que pertenecen a este género son hongos filamentosos, es decir, están compuestos de cadenas de células llamadas hifas, además poseen hifas especializadas denominadas esporangióforos, el cual está compuesto por una vesícula rodeada de células denominadas fiálides en forma de botella directamente insertadas sobre la vesícula (Kozakiewicz, 1989). De las fiálides se desprenden las esporas. Habitan el suelo, pero colonizan fácilmente diversos alimentos.

1.4.1 Clasificación taxonómica

Desde 1965, la monografía sobre el género *Aspergillus* denominada “The genus *Aspergillus*” publicada por Raper y Fennell ha sido la base de partida de los taxónomos en la identificación de una especie. En esta obra se aceptaron 132 especies subdivididas en 18 grupos. Sin embargo, esta monografía presentaba serios problemas de adecuación a las normas del Código Internacional de Nomenclatura Botánica (CINB), ya que no se tomó en cuenta la prioridad de los nombres más antiguos y las especies nuevas descritas no estaban tipificadas. Gams *et al.*, (1985) reclasificaron el género y lo dividieron en 6 subgéneros, cada uno dividido a su vez en una o más secciones (Tabla 1.3) que se corresponden con los grupos descritos por Raper y Fennell. Varias especies del género *Aspergillus* presentan un teleomorfo (forma sexual de hongos filamentosos) dentro de los ascomicetos, pero Raper y Fenell retuvieron el nombre *Aspergillus* tanto para el teleomorfo como para el anamorfo (forma asexual de hongos filamentosos), en contraposición con el artículo 59 del CINB. Gams *et al.*, (1985) y Kozakiewicz (1989) se encargaron de realizar los cambios necesarios para su adecuación.

TABLA 1.3 Clasificación del género *Aspergillus* (Gams *et al.*, 1985).

Subgénero	Sección	Sinónimo	Teleomorfo
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	Grupo <i>A. glaucus</i>	<i>Eurorium</i>
	<i>Restricti</i>	Grupo <i>A. restrictus</i>	--
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	Grupo <i>A. fumigatus</i>	<i>Neosartorya</i>
	<i>Cervini</i>	Grupo <i>A. cervinus</i>	--
<i>Ornati</i>	<i>Ornati</i>	Grupo <i>A. ornatus</i>	<i>Warcupilla, Sclerocleista, Hemicarpensteles</i>
<i>Clavati</i>	<i>Clavati</i>	Grupo <i>A. clavatus</i>	--
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i>	Grupo <i>A. nidulans</i>	<i>Emericella</i>
	<i>Versicolores</i>	Grupo <i>A. versicolor</i>	--
	<i>Usti</i>	Grupo <i>A. ustus</i>	--
	<i>Terrei</i>	Grupo <i>A. terreus</i>	--
	<i>Flavipedes</i>	Grupo <i>A. flavipes</i>	<i>Fennellia</i>
<i>Circumdati</i>	<i>Wentii</i>	Grupo <i>A. wentii</i>	--
	<i>Flavi</i>	Grupo <i>A. flavus</i>	--
	<i>Nigri</i>	Grupo <i>A. niger</i>	--
	<i>Circumdati</i>	Grupo <i>A. ochraceus</i>	<i>Petromyces</i>
	<i>Candidi</i>	Grupo <i>A. candidus</i>	--
	<i>Cremei</i>	Grupo <i>A. cremeus</i>	<i>Chaesartorya</i>
	<i>Sparsi</i>	Grupo <i>A. sparsus</i>	--

1.4.2 Principales características morfológicas del género *Aspergillus*

Las principales características morfológicas del género *Aspergillus* se basan en observaciones macroscópicas y microscópicas de las colonias y estructuras (Abarca, 2000).

1.4.2.1 Características morfológicas macroscópicas

Diámetro de las colonias

Los hongos crecen sólo por la parte terminal de las hifas, y el micelio posterior envejece. Las hifas terminales se ramifican según las condiciones ambientales, especialmente las nutritivas. Lo que se mide es el avance del micelio.

Color

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de las especies del género *Aspergillus*. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. También deben ser evaluados el color del reverso de la colonia, así como el cambio de este en el medio de cultivo.

Presencia de esclerocios

Un esclerocio es una estructura formada en los hongos filamentosos a partir del crecimiento de las hifas principales en un punto en común, conforme pasa el tiempo, la estructura va adquiriendo una apariencia sólida y forma esférica. La caracterización de los esclerocios es importante ya que existe una relación entre el tipo de esclerocio y la producción de micotoxinas (Chang *et al.*, 2001).

Presencia de exudado, textura y topografía

Algunas especies secretan agua en pequeñas gotas, así como otras características que pueden ser evaluadas de forma cualitativa ya que son evidentes, como la textura, en donde las principales características buscadas son: algodonosas, granular y aterciopelada; la topografía, si la colonia es umbodonada, rugosa y cerebriforme.

1.4.2.2 Características morfológicas microscópicas

Las principales estructuras microscópicas (Figura 1.6) que son estudiadas para caracterizar las especies del género *Aspergillus* principalmente son la presencia de hifas, estipes, vesículas, disposición de métulas y fiálides sobre las vesículas, forma, diámetro y ornamentación, células de Hülle y tipo de esporas (Samson *et al.*, 2004b).

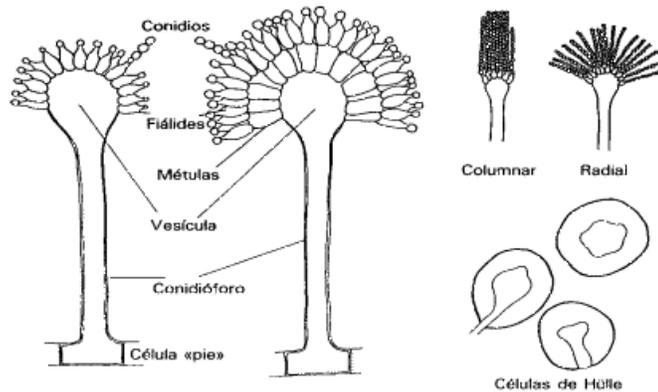


FIGURA 1.6 Estructuras microscópicas para especies del género *Aspergillus*.

1.5 *Aspergillus* sección *Nigri*

Las especies pertenecientes a la sección *Nigri* son unas de las de mayor importancia dentro del género *Aspergillus*. Se encuentran distribuidos en una gran variedad de sustratos a nivel mundial, principalmente: semillas, granos, forrajes, piensos, frutas, verduras y cuero. (Pitt y Hocking, 1997).

Algunas especies de la sección *Nigri* se utilizan a nivel industrial como fuente de enzimas extracelulares y ácidos orgánicos para ser utilizados en la industria alimentaria, tal es el caso de los productos obtenidos por *Aspergillus niger* que poseen la categoría GRAS (Generally Recognised As Safe) de la FDA (Food and Drug Administration) y se utilizan en cantidades significativas como aditivos alimentarios (Abarca *et al.*, 2004). Éstos incluyen, entre otros, α -amilasas, catalasas, celulasas,

glucoamilasas, lipasas, pectinasas y proteasas, así como ácido cítrico y ácido glucónico (Bigelis, 1987).

No obstante, las especies de esta sección pueden también producir diversos metabolitos secundarios tóxicos, como OTA (Samson *et al.*, 2006), y por lo tanto se les considera como hongos responsables del deterioro de alimentos. En la Tabla 1.4 se presenta los principales metabolitos secundarios y toxinas producidas por especies de la sección *Nigri*.

La producción de OTA por especies de esta sección se observa principalmente en uvas y productos derivados. Concretamente, se ha propuesto que *A. carbonarius* es la principal especie responsable de la producción de OTA en uvas de vino en el Mediterráneo (Pitt, 2000; Battilani *et al.*, 2003; Medina *et al.*, 2005; Perrone *et al.*, 2006; Serra *et al.*, 2006a; Leong *et al.*, 2007a).

TABLA 1.4 Producción de metabolitos secundarios y toxinas por especies de *Aspergillus* sección *Nigri* (Samson *et al.*, 2006).

Especie	OTA	Pir ¹	N-γ-P ²	Asp ³	SeD ⁴	Ant ⁵	Afl ⁶	Cor ⁷	Kot ⁸
<i>A. aculeatus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>A. brasiliensis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. carbonarius</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. costaricensis</i>	-	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>A. ellipticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. foetidus</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>A. heteromorphus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. homomorphus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>A. japonicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. lacticoffeatus</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>A. niger</i>	+/-	+	+	-	-	-	-	-	+/-
<i>A. piperis</i>	-	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>A. sclerotioniger</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>A. tubingensis</i>	+/-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>A. vadensis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-

¹Pir: Piranonigrina A; ²N-γ-P: Nafto-γ-pirononas; ³Asp: Asparazina; ⁴SeD: Ácido secalónico D; ⁵Ant: Antafumionisinas; ⁶Afl: Aflavininas; ⁷Cor: Lactonas de Corymbiferan; ⁸Kot: Kotaninas.

1.6 Estudio de la diversidad microbiana en café

Los estudios de la diversidad microbiana en café han sido analizados por dos metodologías diferentes, la microbiología clásica y la microbiología molecular.

El uso de técnicas por microbiológica clásica, ha permitido obtener información sobre la diversidad fúngica presente en las diferentes vías de procesamiento de café (Taniwaki *et al.*, 2003; Suárez-Quiroz *et al.*, 2004a; Noonim *et al.*, 2008a; Rezende *et al.*, 2013), sin embargo, estas técnicas son laboriosas y los microorganismos cultivados no representan sino una pequeña parte de la diversidad microbiana en relación a la abundancia de especies presentes en las muestras (Von Wintzingerode *et al.*, 1997).

La aplicación en conjunto de métodos basados en la biología molecular ha permitido determinar de manera específica la diversidad microbiana presente en café y otras matrices alimentarias (Ampe y Miambi, 2000; Masoud *et al.*, 2004; Prakitchaiwattana *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2007; Jeyaram *et al.*, 2008; Vilela *et al.*, 2010; Magalhães *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2010). Particularmente la utilización de la técnica PCR-DGGE (Reacción en Cadena de la Polimerasa – Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante) ha sido sugerida como una herramienta útil para investigar las especies fúngicas productoras de OTA en granos de café (Durand *et al.*, 2013), además de poder diferenciar su origen a partir de diferentes tratamientos post-cosecha, localizaciones geográficas y especie (Hamdouche *et al.*, 2016).

1.6.1 PCR-DGGE

Muyzer *et al.*, (1993) fue el primero en utilizar la técnica de PCR-DGGE para el estudio de un perfil de comunidades microbianas. Esta técnica no requiere del cultivo de microorganismos para su detección e identificación y es ampliamente utilizada en ecología microbiana y en distintas matrices alimentarias porque es capaz de proporcionar la “huella genética” de la comunidad microbiana de la muestra en estudio (Ercolini, 2004; El Sheikha y Ray, 2014).

Básicamente la muestra se somete a una extracción de ADN total (Figura 1.7), el cual contiene una mezcla de ADN microbiano de las diferentes especies presentes en la muestra. Posteriormente, la mezcla de ADN se utiliza como molde para llevar a cabo la amplificación por PCR de determinadas regiones variables del ADNr de interés taxonómico, obteniéndose así una nueva mezcla de productos amplificados denominados amplicones. Todos los amplicones tienen el mismo tamaño, pero diferentes secuencias, y por lo tanto pueden ser separados por DGGE. El resultado final es la huella genética, la cual es específica de la muestra analizada y contiene una serie de bandas en relación con las especies microbianas presentes en ella.

La identificación de las especies se puede lograr mediante la purificación y secuenciación de las bandas en el perfil DGGE (El Sheikh y Montet, 2011).

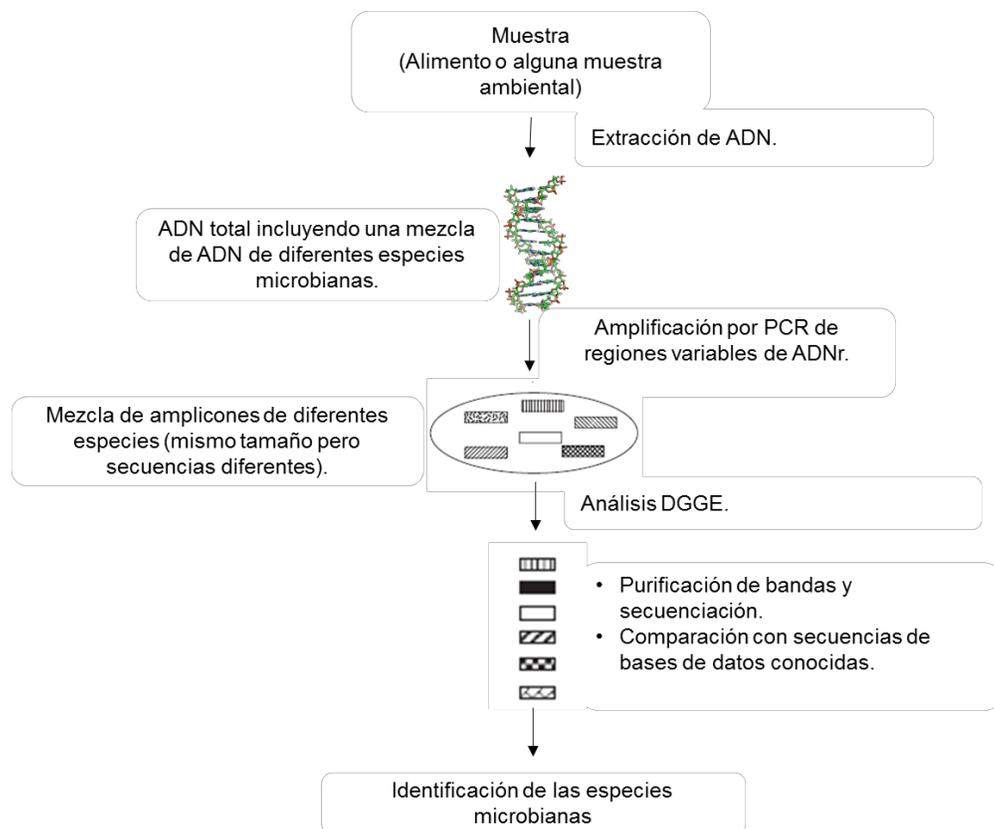


FIGURA 1.7 Etapas para el análisis por medio de PCR-DGGE (Ercolini, 2004).

1.6.2 Principio de la DGGE

La DGGE (Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante) permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño, pero con diferente secuencia de nucleótidos. Para ello, un gradiente lineal creciente de agentes químicos desnaturalizantes del ADN (una mezcla de urea y formamida) se incorpora a lo largo de un gel de poliacrilamida. Durante la electroforesis, se mantiene una temperatura constante entre 50-65 °C y los fragmentos de ADN de doble cadena migran por el gel hasta encontrar una determinada concentración de urea y formamida (concentración desnaturalizante) a la cual las cadenas se separan localmente y el desplazamiento de las moléculas disminuye o se interrumpe. La concentración desnaturalizante a la cual las cadenas se separan depende de la secuencia de nucleótidos, es decir, del contenido de dobles o triples puentes de hidrogeno dependiendo de si son pares de bases adenina-timina o citosina-guanina. Aquellos fragmentos de ADN pobres en guanina-citosina se desnaturalizan a bajas concentraciones de urea y formamida, por lo que su migración en el gel se interrumpe rápidamente y ocupan posiciones superiores. Ocurre lo contrario con los fragmentos de ADN ricos en guanina-citosina, cuya migración por el gel sólo se retarda a altas concentraciones de urea y formamida, ocupando posiciones inferiores. (Myers *et al.* 1987). Así, fragmentos de ADN con secuencias nucleotídicas diferentes tendrán diferentes posiciones en el gel.

1.6.3 Aplicaciones

Existen varios campos de aplicación para la DGGE, destacando los estudios de detección de mutaciones puntuales para aplicaciones clínicas y los estudios de comunidades microbianas.

La DGGE ha proporcionado información novedosa en el estudio de comunidades microbianas en ambientes complejos como suelos, lagos, lodos activados, biorreactores, alimentos y tracto gastrointestinal (Suárez Fernández y Le Borgne, 2014).

Durante los últimos años, en el ámbito de alimentos la DGGE ha sido utilizada principalmente para estudiar la dinámica de levaduras en fermentaciones en vino (Cocolin *et al.*, 2000), la distribución espacial de la microbiota en pozol durante el proceso de fermentación (Ampe *et al.*, 1999), la diversidad de bacterias (Lefeber *et al.*, 2011; Papalexandratou *et al.*, 2013) y levaduras (Nielsen *et al.*, 2005) en cacao, las levaduras involucradas en el proceso de fermentación (Masoud *et al.*, 2004) y la población de hongos filamentosos (Vilela *et al.*, 2010; Durand *et al.*, 2013; Hamdouche *et al.*, 2016) en café.

Esta técnica es una alternativa más viable que los métodos por microbiología clásica para evaluar la diversidad microbiana presente en las muestras de interés. Sin embargo, esta presenta ciertas limitantes por lo que se recomienda el análisis en conjunto con los métodos microbiológicos clásicos para reducir cualquier sesgo (Vilela *et al.*, 2010).

1.6.4 Limitantes de la técnica

La PCR-DGGE presenta ciertas limitantes que pueden ser críticas para el análisis de la diversidad microbiana de una muestra. Estas limitantes pueden presentarse en diferentes etapas del análisis y van desde el muestreo hasta la migración electroforética sobre el gel DGGE.

La muestra debe ser aleatoria para representar lo más fielmente posible la comunidad microbiana del medio a analizar. En el caso donde no sea posible extraer el ADN inmediatamente, las muestras deben conservarse en condiciones que permitan conservar la integridad de los ácidos nucleicos. El lavado, el transporte o los procedimientos de enfriamiento pueden influenciar la presencia o ausencia de especies microbianas presentes en la muestra, aumentando o reduciendo el número de especies que pudieran ser cuantificadas e identificadas (Ercolini, 2004).

En la lisis celular, la cual es la primera etapa de extracción de ADN, se debe dañar lo menos posible los ácidos nucleicos. Las especies microbianas no poseen la misma sensibilidad a los agentes de lisis, esto es debido a las diferentes composiciones de su membrana y pared celular. La purificación de los ácidos nucleicos puede ser difícil si las muestras no son homogéneas. Las matrices alimentarias que contienen un alto contenido de lípidos, proteínas, polisacáridos y sales, disminuyen los rendimientos de extracción y pueden contaminar los extractos de ADN. Estos residuos pueden actuar como inhibidores en la amplificación por PCR.

La amplificación por PCR es una de las principales fuentes de sesgo en el estudio de la diversidad microbiana. En algunas ocasiones las secuencias a amplificar pueden presentar una preferencia (Reysenbach *et al.*, 1992). Una mezcla de ADN de una comunidad microbiana, puede ser parcialmente amplificada, y como consecuencia se obtendrá un producto que no sea representativo del número de especies originalmente presentes en dicha comunidad. Por lo que las especies detectadas no reflejaran completamente la diversidad en la muestra.

Otra de las limitantes de la técnica puede ser la propia DGGE, ya que sólo pueden separarse fragmentos de hasta 500 pares de bases (Myers *et al.*, 1985). Por otra parte, existe un límite en el número máximo de bandas de ADN que puedan separarse, por lo que, en el caso de análisis de perfiles de comunidades microbianas, no podrán detectarse a aquellos microorganismos que constituyan menos del 1% de la comunidad (Muyzer *et al.* 1993). También es posible que ocurra la co-migración de fragmentos de ADN, es decir, que dos secuencias diferentes de ADN compartan una misma posición en el gel. Esto puede provocar la subestimación de diversidad, del mismo modo que se dificulta la secuenciación del ADN recuperado de aquellas bandas en las que existe co-migración (Nikolausz *et al.* 2005).

Referente al límite de detección del método, ciertos autores estiman que depende de la concentración de la población a analizar, por ejemplo, Cocolin *et al.*, (2000) consideran que una población mínima de 10^4 células/mL de levaduras es necesaria para una detección.

Durand *et al.*, en 2012, determinaron para especies de *A. ochraceus*, *A. carbonarius* y *A. niger* que la concentración de 10^4 esporas/mL es la mínima para una detección exitosa.

1.7 Importancia del estudio de especies de la sección *Nigri* en el café

Broissin Vargas *et al.*, (2017) estudiaron la incidencia de OTA en granos de café verde y café pergamino almacenados en sacos de yute y en mega saconas (empaques de polipropileno). Emplearon técnicas moleculares de identificación fúngica y de microbiología clásica, encontrando que la diversidad fúngica obtenida por PCR-SCCP (Reacción en Cadena de la Polimerasa – Polimorfismo Conformacional Monocatenario) disminuye conforme el tiempo de almacenamiento, debido a que existe una predominancia en un 100% de la sección *Nigri* a diferencia de la sección *Circumdati* y *Flavi* (Figura 1.8).

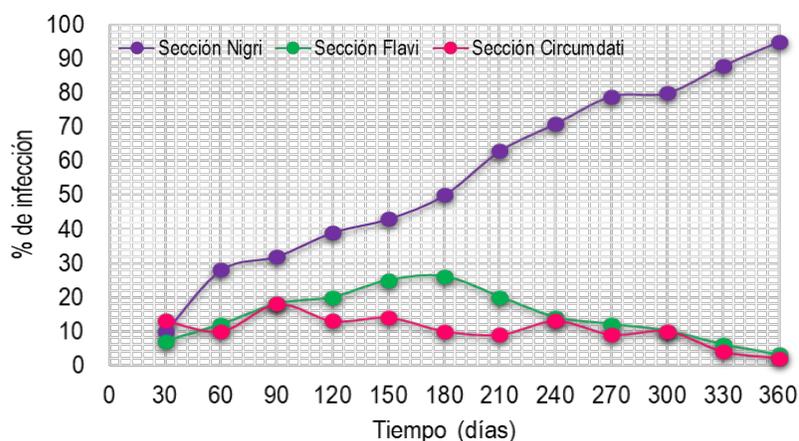


FIGURA 1.8 Porcentaje de infección fúngica en café verde almacenado (Broissin Vargas *et al.*, 2017).

Por otro lado, en el mismo estudio se reportó que durante los primeros meses de almacenamiento la presencia de OTA fue nula en los tratamientos, debido a que las condiciones de humedad relativa y actividad de agua no son óptimas para que las especies presentes produzcan la toxina, sin embargo, a los 180 días de almacenamiento el café verde almacenado en sacos de yute registró una producción de OTA de 1.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 5.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a los 360 días y para el café verde almacenado en mega saconas la producción de la toxina inicio a los 240 días con 3.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 3.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a los 360 días de almacenamiento. (Figura 1.9).

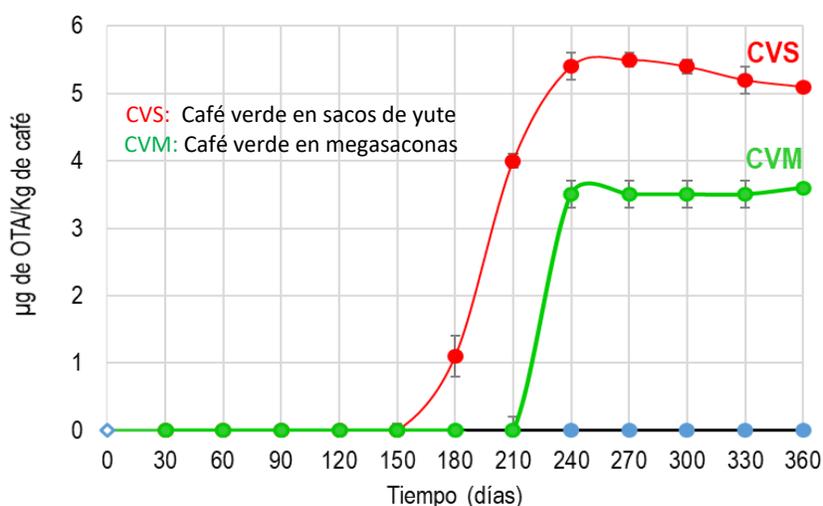


FIGURA 1.9 Cuantificación de OTA en granos de café verde almacenado (Broissin Vargas *et al.*, 2017).

Por lo tanto, los autores concluyeron que las especies de la sección *Nigri* son las responsables de la producción de OTA en café verde, ya que fueron las especies dominantes en los granos almacenados.

2. JUSTIFICACIÓN

Las especies de la sección *Nigri* podrían estar involucradas como la principal fuente de producción de OTA en café de México y considerando que ya se han reportado nuevas especies altamente productoras, resulta de particular interés evaluar por medio de un método molecular como lo es la PCR-DGGE la diversidad fúngica de la sección *Nigri* en los diferentes tratamientos post-cosecha de café.

3. HIPÓTESIS

Las especies de la sección *Nigri* representan la principal fuente de OTA en café de México y su presencia está relacionada a los diferentes tratamientos post-cosecha.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Aislar e identificar cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* presentes durante los diferentes procesamientos post-cosecha de café (*Coffea arabica*) y evaluar su diversidad por PCR-DGGE.

4.2 Objetivos Específicos

- Aislar, identificar y evaluar el potencial ocratoxigénico de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* durante los diferentes tratamientos post-cosecha de café (vía húmeda fermentativa en ausencia de agua, fermentativa sumergida, mecánica y seca).
- Determinar la diversidad fúngica de la sección *Nigri* presente durante las diferentes etapas de procesamiento de café mediante PCR-DGGE.
- Relacionar la presencia de cepas potencialmente ocratoxigénicas con las etapas de procesamiento de café.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un muestreo a lo largo de 4 vías de procesamiento post-cosecha de café. Cada una de las muestras fue sometida a 2 análisis diferentes (Figura 5.10). Por un lado, con técnicas microbiológicas clásicas se calculó el porcentaje de infección por especies de la sección *Nigri*, esto permitió aislar e identificar especies pertenecientes a la sección de estudio. Las cepas que fueron aisladas se evaluó su potencial ocratoxigénico y las que resultaron con mayor producción de OTA fueron caracterizadas molecularmente y utilizadas como marcadores. Por otro lado, se realizó la extracción del ADN total de la superficie de las muestras a fin de estudiar la diversidad fúngica de la sección *Nigri* utilizando la técnica PCR-DGGE, con los perfiles obtenidos se llevó a cabo el análisis estadístico de similitud de especies fúngicas para cada vía de procesamiento.

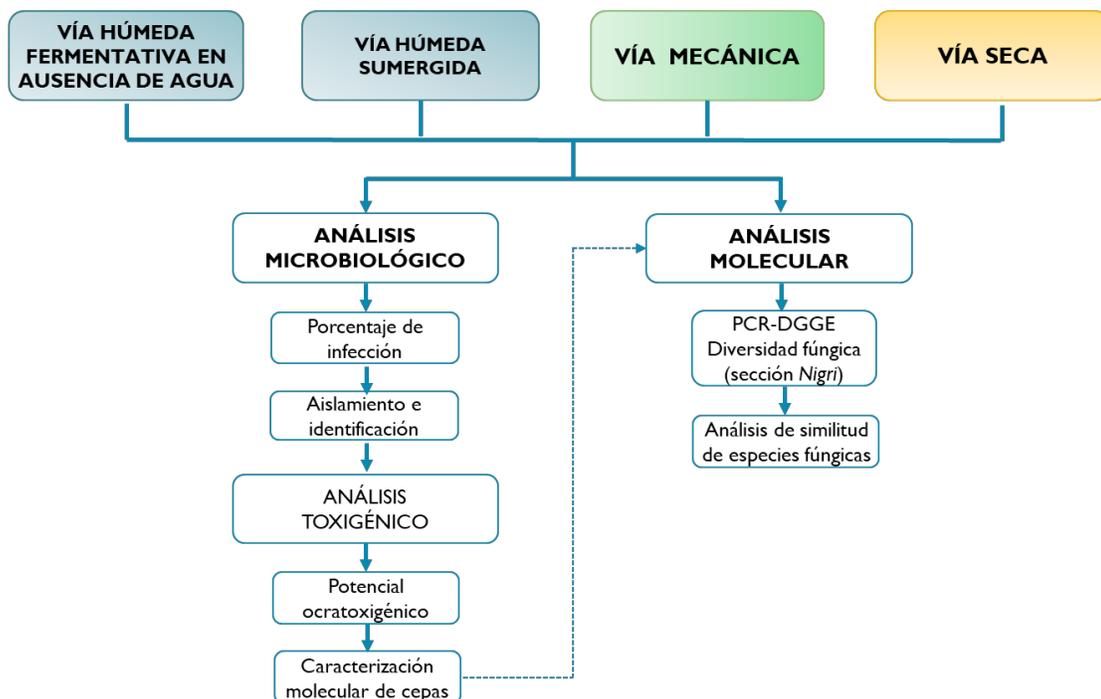


FIGURA 5.10 Diagrama general de la metodología.

5.1 Materiales

5.1.1 Material Biológico

5.1.1.1 Café de diferentes etapas de procesamiento

Las muestras de cerezas y granos de café, *Coffea arabica*, fueron recolectadas en las cosechas de alta producción 2015-2016 y 2016-2017 en dos comunidades del estado de Veracruz (México). El primer muestreo fue en la comunidad de Plan de Arroyos perteneciente al municipio de Atzalan, se recolectaron muestras en un beneficio que utiliza la Vía Húmeda Fermentativa en ausencia de agua. El segundo muestreo fue en la comunidad de Xico, en esta se tomaron muestras en 2 beneficios, el primero utiliza la Vía Húmeda Fermentativa Sumergida y la Vía Seca experimentalmente, el segundo beneficio sólo utiliza la Vía Mecánica.

5.1.2 Medios de cultivo

El aislamiento e identificación de cepas se llevó a cabo empleando los siguientes medios de cultivo: Agar de Papa y Dextrosa (PDA) (DIBICO®), Agar Extracto de Malta (MEA) (DIBICO®), Agar Czapek con extracto de levadura (CYA) (DIBICO®). El medio PDA se acidificó con ácido tartárico estéril al 10% (aprox. 1,4 mL de ácido tartárico por 100 mL de medio) para la disminución del pH del mismo a 3.5.

La composición y modo de empleo de cada uno de los medios está descrito en el Anexo I.

5.1.3 Equipo de laboratorio

5.1.3.1 Estereoscopio

Las observaciones macroscópicas de los cultivos y cepas aisladas se llevaron a cabo utilizando un estereoscopio PLIT modelo ES-24, el cual posee un objetivo único con un rango de 2x a 4x e iluminación.

5.1.3.2 Microscopio de campo claro

Las observaciones microscópicas se llevaron a cabo con un microscopio Motic® BA200, que posee objetivos de 10X, 40X, 100X (inmersión), además cuenta con una interfase electrónica (Motic® Camera MCI001/2001) que permite visualizar las observaciones en computadora mediante el uso del software Motic® Images Plus Version 2.0 ML elaborado por Motic® China Group Co. (China)

5.1.3.3 Lector de micropozos

La cuantificación de OTA en medio de cultivo se realizó en un lector ELISA automático para tiras de pozos, NEOGEN® Stat Fax® 4700, con un rango de medición lineal: 0.00 a 3.0 (A), una exactitud fotométrica de $\pm 1.0\%$ y una longitud de onda de 650 nm.

5.1.4 Equipo para biología molecular

5.1.4.1 Microcentrifuga

Se utilizó una microcentrifuga Spectrafuge™ 24D modelo C2400 (Labnet International), con velocidad máxima de 13 300 rpm, 16 300 x g.

5.1.4.2 Termociclador

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Select Bio Products modelo SelectCycler™ II.

5.1.4.3 Espectrofotómetro UV- Visible

La cantidad y calidad del ADN fue cuantificada mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). Este equipo permite leer la concentración del ADN a 260 nm, y 260/280 nm para el contenido de ácidos nucleicos/proteínas y 260/230 nm para ácidos nucleicos/inhibidores.

5.1.4.4 Equipo para DGGE

La DGGE se llevó a cabo en un equipo Bio-Rad Dcode™ System, USA (Figura 5.11), pre-calentado a una temperatura de 60°C.



FIGURA 5.11 Equipo para DGGE.

5.1.4.5 Transiluminador UV

Los geles de verificación de las extracciones de ADN y productos de PCR fueron observados y fotografiados utilizando un transiluminador UV Bio-Imaging Systems MiniBIS® Pro 16mm y para los geles DGGE se utilizó un transiluminador Bio-Rad Gel Doc™ XR+.

5.2 Métodos

5.2.1 Muestreo

En condiciones asépticas se recolectaron las muestras (aprox. 300g) de cerezas y granos de café para cada una de las vías de procesamiento (Tabla 5.5). Posteriormente las muestras se transportaron al laboratorio en hielera y se analizaron en un lapso no mayor a 48 h de su recolección.

TABLA 5.5 Muestras de café obtenidas por vía de procesamiento.

Vía Húmeda Fermentativa en ausencia de agua	Vía Húmeda Fermentativa Sumergida	Vía Mecánica	Vía Seca
Café cereza	Café cereza	Café cereza	Café cereza
Café despulpado	Café despulpado	Café despulpado	Cereza 1d de secado
Pulpa de café	Pulpa de café	Pulpa de café	Cereza 2d de secado
Café fermentado 0h	Café fermentado 3h	Café desmucilaginado	Cereza 3d de secado
Café fermentado 9h	Café fermentado 14.5h	Agua de lavado	Cereza 2h de secado
Café fermentado 18h	Agua de fermentación	Café pergamino 3h de secado	Cereza 6.5h de secado
Agua de fermentación	Café lavado	Café pergamino 15h de secado	Cereza 14h de secado
Café lavado	Café pergamino 3h de secado	Café pergamino 30h de secado	Café verde sin clasificar
Café pergamino 2h de secado	Café pergamino 4.5h de secado	Café verde sin clasificar	
Café pergamino 22h de secado	Café pergamino 9h de secado		
Café pergamino almacenado	Café verde sin clasificar		
Café verde primera almacenado			
Café verde segunda almacenado			
Café verde desmanche almacenado			
Total de muestras por vía			
14	11	9	8

5.2.2 Aislamiento e Identificación de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri*

Por el método de siembra directa en condiciones asépticas se sembraron 50 partículas (cerezas, pulpa, cerezas secas y granos de café), de cada una de las muestras obtenidas por vía de procesamiento. La siembra se realizó en placas Petri con medio PDA (pH 3.5), con incubación a 25°C durante 7 días. Los resultados fueron expresados como porcentaje de infección por especies pertenecientes a la sección *Nigri*.

Por observación macroscópica y siembra por punción se aislaron en medio PDA (pH 3.5, 25°C, 5-7 días) colonias fúngicas que presentaron coloración negra característico de esta sección (Gams *et al.*, 1985). Se obtuvieron cultivos monospóricos, los cuales fueron corroborados por observación en el estereoscopio.

Los cultivos monospóricos fueron resembrados en los medios MEA y CYA, estos medios han sido ampliamente descritos para la identificación de cepas pertenecientes a la sección *Nigri* (Samson *et al.*, 2004a; Noonim *et al.*, 2008a). Las condiciones de temperatura y tiempo de incubación empleadas fueron 25°C y 5-7 días respectivamente.

La identificación de cepas pertenecientes a la sección *Nigri* se realizó empleando las claves taxonómicas descritas por Samson *et al.*, (2004a) y Pitt y Hocking (2009) (Anexo II, III). Las cepas que presentaron características morfológicas de la sección de estudio fueron aisladas y por el método de ELISA se evaluó su potencial ocratoxigénico.

5.2.3 Evaluación del potencial ocratoxigénico de las cepas aisladas

El potencial ocratoxigénico de las cepas aisladas de la sección *Nigri* se determinó por duplicado mediante el kit ELISA competitivo directo (Veratox®, Neogen Corporation Ltd). Las concentraciones se expresaron en ng/g de medio. El ensayo ELISA se realizó de acuerdo al protocolo del fabricante, con una modificación en el paso de extracción de la micotoxina.

Las cepas aisladas fueron resembradas por el método de punción en placas con medio PDA e incubadas a 25°C durante 7 días. La extracción de OTA se realizó empleando el método de Bragulat *et al.*, (2001) y modificado por Suárez-Quiroz *et al.*, (2004b).

Con ayuda de un sacabocados previamente desinfectado de 5mm de diámetro, se tomaron tres botones de cultivo del área central de la colonia, se colocaron en viales ámbar previamente tarados y se pesaron en orden para determinar la producción de OTA por gramo de medio de cultivo.

La OTA se extrajo de las muestras utilizando 2.5 mL de solvente (metanol/ácido fórmico, 25:1) durante 15 min en baño ultrasónico. Los extractos se purificaron a través de un filtro Millipore Swimex-HV® con una membrana de 0.45 µm.

Posteriormente, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se colocaron 100 µL de conjugado en cada pozo de mezclado marcado con rojo; a continuación, se transfirieron en orden a los mismos pozos de mezclado, 100 µL de controles y muestras (extractos filtrados). Utilizando una pipeta de 12 canales, se mezcló el líquido en los pozos pipeteándolos hacia arriba y hacia abajo 3 veces. Se transfirieron 100 µL a los pozos recubiertos de anticuerpos y se mezcló deslizando hacia atrás y hacia adelante el portapozos sobre una superficie plana durante 10-20 segundos cuidando de no salpicar los reactivos de los pozos.

Se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con agua destilada 5 veces y eliminar el agua restante de los pozos, se añadió el sustrato e incubó durante 10 minutos. Finalmente se añadieron 100 µL de la solución para detener la acción enzimática e inmediatamente se transfirió la placa ELISA a un espectrofotómetro Stat Fax® 4700 y se cuantificó a una longitud de onda de 650 nm.

Las cepas aisladas que presentaron mayor producción de OTA fueron caracterizadas molecularmente.

5.2.4 Estudio de la diversidad fúngica de *Aspergillus* sección *Nigri* mediante PCR-DGGE

5.2.4.1 Protocolo de extracción del ADN total en muestras de café

La extracción del ADN total de cada una de las muestras de café se llevó a cabo empleando el protocolo descrito por El Sheikha *et al.*, (2009, 2011). Los ensayos se realizaron por duplicado para cada muestra.

En condiciones asépticas se colocaron aprox. 20 g de cada muestra de café en tubos Falcón de 50 mL, se agregó 20 mL de agua peptonada estéril al 1%, posteriormente los tubos se incubaron en shaker a 20°C con agitación media durante 1 h. Dos mL de la solución de lavado de las muestras fueron colocados en tubos Eppendorf estériles de 2 mL, con previa adición de 0.3 g de perlas de vidrio (Sigma, USA) de 425-600 µm de diámetro. Seguidamente los tubos se agitaron en vortex durante 30 min a velocidad máxima, se centrifugaron a 12 000 x g durante 15 min, el sobrenadante fue desechado y el residuo se resuspendió con 300 µL de Tampón de Lisis (2% Tritón X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8) y se agitó en vortex durante 3 min a velocidad máxima.

Se adicionaron 100 µL de TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA pH 8.0), 100 µL de lisozima (25 mg/mL) y 100 µL de proteinasa K (20 mg/mL), entre cada adición se agitó en vortex por 3 min a velocidad máxima. Posteriormente los tubos se incubaron en baño María a 42°C durante 30 min. Seguidamente se adicionaron 50 µL de SDS 20% (Dodecil Sulfato de Sodio, IBI Scientific), se agitó en vortex por 3 min a velocidad máxima y se incubó a 42°C por 10 min.

Se agregaron 400 µL de MATAB (Mezcla de Bromuro de Alquil-Trimetil Amonio, Sigma) 2% (p/p) NaCl 3M, se agitó en vortex durante 3 min a velocidad máxima y se incubó a 65°C durante 10 min. Seguidamente se adicionaron 700 µL de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:21, v/v/v), se agitó en vortex durante 5 min a velocidad máxima. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 12 000 x g durante 15 min y la fase acuosa fue recuperada en un nuevo tubo Eppendorf estéril.

La etapa de lavado con la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico se repitió una vez más.

El fenol residual fue eliminado con 600 μ L de una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y por centrifugación a 12 000 x *g* durante 15 min. La fase acuosa fue recuperada en un nuevo tubo Eppendorf estéril y se agregaron 30 μ L de acetato de sodio 3M pH5 e inmediatamente se agregó un volumen igual al contenido en el tubo de isopropanol frío (-20°C).

Los tubos se guardaron en congelación durante 12h, después de este lapso de tiempo se centrifugaron a 12 000 x *g* durante 15 min y se eliminó el sobrenadante. Se adicionó un volumen de 500 μ L de etanol al 70% y se centrifugo a 12 000 x *g* durante 10 min. Finalmente se eliminó la fase acuosa y se dejó secar el pellet depositado en el fondo del tubo a temperatura ambiente (2-3h). Al finalizar esta etapa se agregaron a cada tubo 50 μ L de agua ultra pura (molecular) para resuspender el pellet, se dejó solubilizar durante 3 h y se conservó en el congelador a -20°C hasta su análisis. La cantidad y calidad del ADN extraído de cada muestra se verificó en gel de agarosa al 1% con un marcador de peso molecular de 1 kpb y en espectrofotómetro UV- Visible a 260 nm.

5.2.4.2 Protocolo de extracción de ADN para cepas productoras de OTA

Las cepas que resultaron con la mayor producción de OTA se realizó su extracción de ADN, para ello con un asa bacteriológica se tomó una asada de las esporas y parte del micelio crecidos en medio PDA (pH 3.5, 25°C, 7 días de incubación) y se depositaron en tubos Eppendorff estériles de 2 mL que contenían 0.3 g de perlas de vidrio (Sigma, USA) de 425-600 μ m de diámetro. A cada tubo se adicionaron 500 μ L de una solución NaCl (8g/L) estéril. Posteriormente los tubos fueron agitados en vortex durante 30 min a velocidad máxima, se centrifugaron a 12 000 x *g* por 15 min, se eliminó el sobrenadante y el protocolo continuó de manera idéntica al protocolo de extracción del ADN total para muestras de café descrito anteriormente.

5.2.4.3 Verificación de ADN en gel de agarosa

La cantidad y pureza de los extractos de ADN fueron estimados por electroforesis en gel de agarosa (IBI Scientific, USA) al 1% (p/v) en solución TAE 1X (Invitrogen, USA). Se tomaron 5 μ L del extracto de ADN de cada muestra y se mezclaron con 2 μ L de una solución de colorante Blue/Orange (Promega, USA), la mezcla se depositó en los pozos del gel de agarosa. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kpb (Promega, USA).

La migración duro de 45 minutos a 1 hora con una tensión de 100 V. Inmediatamente el gel se sumergió en solución de bromuro de etidio (IBI Scientific, USA) a 0.1 μ g/mL durante 15 min, después durante 10 min en agua destilada para retirar los residuos de bromuro de etidio. Finalmente, el gel se observó y fotografió en un transiluminador UV.

5.2.4.4 Verificación por espectrofotómetro UV-Visible

La cuantificación y pureza del ADN extraído, fueron estimadas en un espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000. Este equipo permite observar la relación de contenidos entre ácidos nucleicos y proteínas que idealmente debe ser entre 1.8 y 2, si es superior a 2 representa que hay una contaminación por ARN y si es inferior a 1.8 representa que hay un contenido elevado de proteínas.

Para efectuar la lectura se requirió 1 μ L del extracto de ADN y el equipo se calibró con agua ultrapura grado biología molecular, libre de ácidos nucleicos u otros contaminantes.

5.2.4.5 Amplificación por PCR acoplada a un análisis por DGGE

En la técnica DGGE, se agregó una GC-clamp de 30 nucleótidos al extremo 5' de uno de los primers para asegurar que el fragmento de ADN no fuera totalmente separado durante la migración (Sheffield *et al.*, 1989).

Primers utilizados

El par de primers utilizados para la amplificación por PCR de los extractos de ADN fueron GC-U1f y U2r (Tabla 5.6).

El primer U1 corresponde de 403 a 422, y el primer U2 corresponde de 645 a 662 de un ADNr de referencia del gen del ARN 28S de *S. cerevisiae* (J01355 GenBank). Este par de primers dan un amplicón de 260 pb.

En la caracterización molecular de las cepas aisladas de la sección *Nigri* se emplearon los primers diseñados a partir del gen de la β -tubulina (Glass y Donaldson, 1995)

TABLA 5.6 Secuencia de primers utilizados para PCR.

Población	Primers	Posición	Secuencia
Hongos	GCU1f (Sigma, USA)	403 – 422	5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GTG AAA TTG TTG AAA GGG AA – 3'
	U2r (Sigma, USA)	645 – 662	5'- GAC TCC TTG GTC CGT GTT – 3'
Hongos (Cepas aisladas)	Bt2a F (Sigma, USA)	352 - 375	5'- GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC -3'
	Bt2a R (Sigma, USA)	824 - 847	5'- ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC- 3'

Mezcla de reactivos para PCR

La amplificación por PCR se realizó en microtubos de 0.2 mL (Axygen, USA) y la mezcla de reactivos fue preparada de acuerdo a lo descrito por El Sheikha y Montet (2011).

Condiciones de PCR

Las amplificaciones para los extractos del ADN total de las muestras de café y ADN de cepas productoras de OTA se llevaron a cabo de acuerdo a las condiciones descritas por El Khoury *et al.*, (2011). Una desnaturalización inicial a 94°C durante 4 min, después 35 ciclos con una desnaturalización a 94°C por 40 s, una hibridación a 58 °C durante 40 s y una elongación a 72 °C por 1 min, finalizados los 35 ciclos, una elongación final durante 10 min.

En la Tabla 5.7 se describe la mezcla de reactivos y el programa PCR utilizados para cada muestra.

TABLA 5.7 Mezcla de reactivos y programa para PCR,

Reactivos	Volumen por muestra (μL)	Programa PCR	
Agua grado biología Molecular (Sigma, USA)	14.75		
Primer GCU1 (Sigma, USA)	10	1. 94 °C	4 min
Primer U2 (Sigma, USA)	10	2. 94 °C	40 s
MgCl ₂	7	3. 58 °C	40 s
DNTPs 10Mm (Invitrogen, USA)	1	4. 72 °C	1 min
Buffer Top taq	5	5. Ir a 2,	35 veces
Top taq polimerasa (Qiagen, Germany)	0.25	6. 72 °C	10 min
Extracto de ADN	2	7. 4°C	

5.2.4.6 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

Los productos de PCR se analizaron por DGGE en un gel de acrilamida/bisacrilamida 8% (37.5/1, v/v, Sigma, USA) con un gradiente desnaturalizante que se extiende de 40% a 70% (El Sheikha y Montet, 2011).

Composición del gel DGGE

El gradiente desnaturalizante se conforma de urea (Sigma, USA) y formamida (Sigma, USA). 100% corresponde a 7M de urea y 40% de formamida (v/v). En la Tabla 5.8 se muestran los reactivos utilizados para la composición del gel.

TABLA 5.8 Composición de gel para DGGE.

Reactivos	Solución desnaturalizante 40%	Solución desnaturalizante 70%
	Low (L)	High (H)
40% acrilamida	20 mL	20mL
Formamida	16 mL	28mL
Urea	16.8 g	29.4 g
TAE 50X	2mL	2mL
H ₂ O	cbp. 100 mL	cbp 100 mL

Preparación del gel DGGE

Las soluciones desnaturalizantes 40% y 70% fueron preparadas en matraces aforados de 100 mL, 50 mL de cada solución fueron depositadas en tubos Falcon identificados como L y H respectivamente. Posteriormente 16 mL de cada solución se depositaron en el compartimento especial para la formación del gradiente y mezclado de los componentes del gel (Figura 5.12).

Una vez depositadas las soluciones en sus respectivos compartimentos, se les agregó 50 μ L de per sulfato de amonio (Sigma, USA) 10% (p/v) y 50 μ L de Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Affimetrix, USA).

El gel se transfirió de la preparación del gradiente hasta el espacio entre las dos placas de vidrio con ayuda de una mini bomba peristáltica a una velocidad de agitación de 20 rpm.

Una vez que se llenó el molde, se colocó un “peine” plástico con 16 “dientes” sobre la superficie del espacio creado por las dos placas de vidrio, estos corresponden a 16 pozos, donde se depositaron las muestras a analizar. El gel se dejó reposar hora y media para una buena polimerización.



FIGURA 5.12 Condiciones de preparación del gel DGGE.

(1) Fabricación del gradiente, H=Solución de alta concentración desnaturalizante: 70%. L= Solución de baja concentración desnaturalizante: 40%. (2) Mini bomba peristáltica. (3) Casting con placas de vidrio para formación del gel DGGE.

Condiciones de electroforesis de la DGGE

La cuba de electroforesis del equipo Bio-Rad Dcode™ System fue llenada con TAE 1X (Tris-acetato, EDTA pH 8.3) y precalentada a la temperatura de migración, 60°C (Díez *et al.*, 2001).

Una vez que el gel DGGE polimerizo completamente, se colocó en la cuba precalentada a 60°C. Previamente se depositaron 10 µL de colorante Blue/Orange (Promega, USA) y 30 µL de los productos de PCR con ayuda de una micropipeta.

La electroforesis se llevó a cabo en dos periodos continuos, primero a 20 V durante 10 min, después a 80 V durante 16 h (Figura 5.13). Terminado la electroforesis el gel fue retirado delicadamente de las placas de vidrio y se sumergió en una solución de bromuro de etidio (IBI Scientific, USA) a 0.1 µg/mL durante 30 min, después fue lavado con TAE 1X durante 20 min. El gel se observó y fotografió sobre un transiluminador UV Bio-Rad Gel Doc™ XR+.

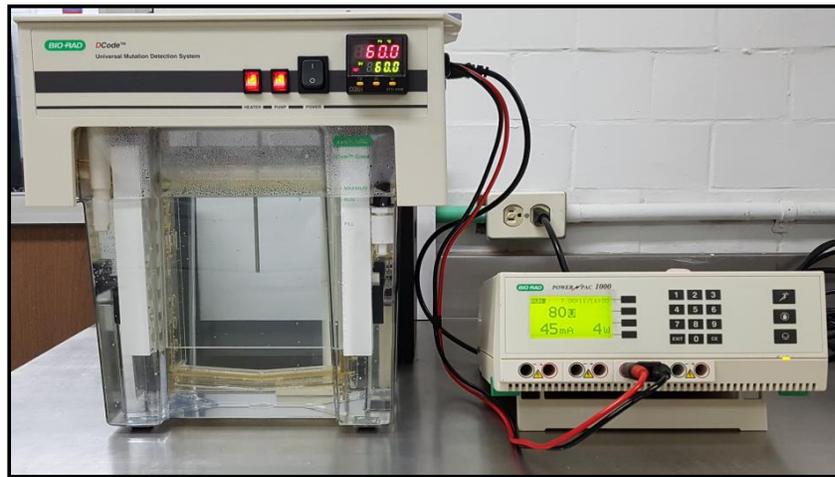


FIGURA 5.13 Equipo DGGE en funcionamiento.

5.2.4.7 Tratamiento estadístico de la imagen y perfiles DGGE

La imagen capturada por la cámara del transiluminador se guardó en formato TIFF (8 bits) en negativo, es decir con las bandas de ADN oscuras y el fondo claro. Las imágenes fueron procesadas por el Software Image Lab™ 6.0 (Bio-Rad, USA)

El análisis de estas imágenes permitió la comparación de bandas de ADN de cada población estudiada, en virtud de su posición después de la migración y con respecto a otras bandas, denominado frente relativo.

De tal forma que cada banda de ADN fue caracterizada por su frente relativo en el gel.

Los perfiles DGGE difieren en el número, la posición o intensidad de bandas presentes en cada carril (columna), por lo que para cada carril se codificó la presencia o ausencia de una banda a una posición particular, otorgando un valor de uno (presencia) o cero (ausencia), con lo cual se calculó el número de bandas en común entre cada muestra y llevó a construir una matriz binaria a partir de la cual se originó un dendograma (Schäfer y Muyzer, 2001; Fromin *et al.*, 2002) de similitud de especies de acuerdo a las distancias.

Esto permitió una clasificación numérica de las muestras, utilizando el coeficiente de similitud de Dice.

El coeficiente de similitud de Dice (Heyndrickx *et al.*, 1996) fue calculado de acuerdo a la formula siguiente:

$$S_{\text{Dice}} = (100)(2) \frac{(N_{AB})}{(N_A + N_B)}$$

Donde:

N_{AB} = Número de bandas en común entre las muestras.

N_A = Número de bandas en la muestra A

N_B = Número de bandas en la muestra B

El conjunto de estos análisis fue realizado, utilizando el Software Primer 7 (PRIMER-E, USA).

5.2.4.8 Secuenciación de ADN de cepas puras con alta producción de OTA

Los productos de PCR de las cepas aisladas de la sección *Nigri* con mayor producción de OTA, fueron purificados con FavorPrep™ Gel/PCR Kit de purificación (Favorgen®, USA). La purificación se llevó a cabo de acuerdo al protocolo del fabricante y la eficacia de este procedimiento fue verificado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% y una cuantificación del contenido de ácidos nucleicos en el espectrofotómetro UV- Visible a 260 nm.

Los productos de PCR purificados fueron enviados a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM (México). Las secuencias obtenidas fueron tratadas con el software MEGA versión 7.0.20 (Kumar *et al.*, 2016) y posteriormente comparadas con las secuencias registradas en el GenBank de NCBI (Centro Nacional de información de bases de datos para Biotecnología) utilizando el programa BLAST para determinar las secuencias conocidas más próximas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento e identificación de cepas de la sección *Nigri* en las diferentes vías de procesamiento post-cosecha de café.

6.1.1 Porcentaje de infección

Mediante microbiología clásica se estudió la incidencia de especies de la sección *Nigri* presentes en las muestras de las 4 vías de procesamiento post-cosecha de café. Los resultados fueron expresados en porcentaje de infección para cada muestra analizada. Los ensayos se llevaron a cabo mediante la siembra directa de 50 partículas (cerezas, pulpa, cerezas secas, granos de café) por cada muestra en medio PDA acidificado (pH 3.5) con un periodo de incubación de 7 días a 25°C, durante este tiempo se observó las características macroscópicas de las colonias fúngicas desarrolladas, mostrando interés en aquellas que desarrollaron coloración negra, característico de las especies de la sección *Nigri* (Gams *et al.*, 1985; Pitt y Hocking, 2009).

El porcentaje de infección para cada muestra se calculó de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ de infección por especies de la seccion } Nigri = \frac{A}{B} \times 100$$

Donde:

A= No. de partículas con características morfológicas de la sección *Nigri*

B= No. de partículas sembradas

En relación a las muestras obtenidas de la Vía húmeda fermentativa en ausencia de agua las especies de la sección *Nigri* mostraron una incidencia del 14.3% a partir de las primeras 2 horas de secado en café pergamino, incrementándose este valor a lo largo del proceso, presentándose un 100% de infección en las muestras de café verde almacenado (Figura 6.14).

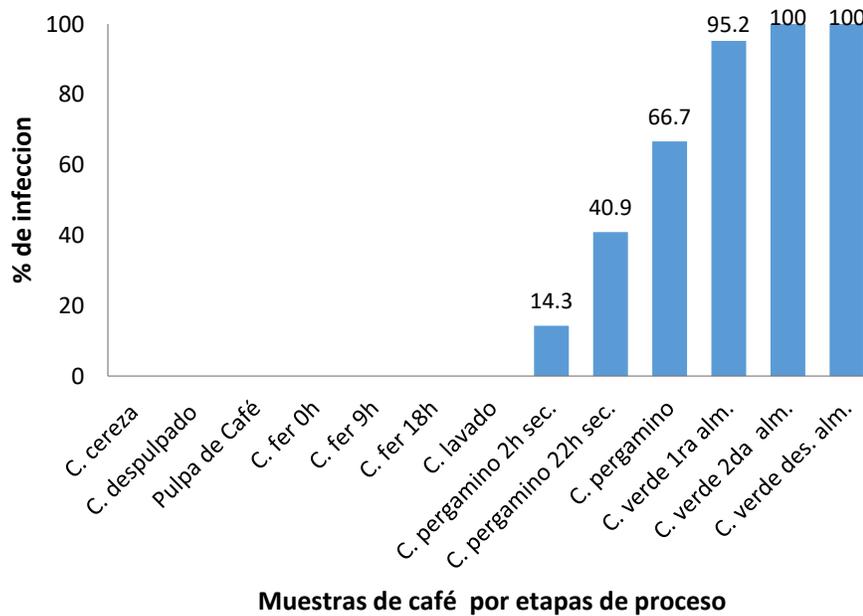
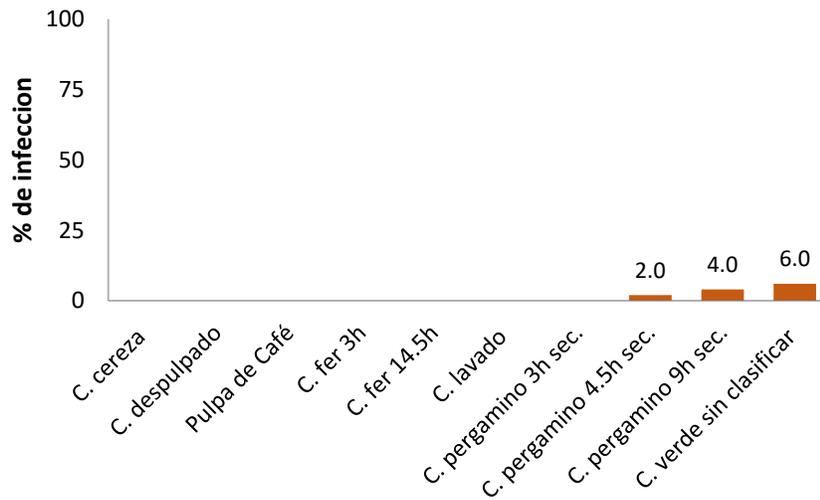


FIGURA 6.14 Porcentaje de Infección por especies de la sección *Nigri* presentes en la Vía Húmeda Fermentativa en ausencia de agua.

Los altos porcentajes de infección coinciden con lo reportado por Broissin Vargas *et al.*, (2017), quienes estudiaron el almacenamiento de café verde durante un año, observando que durante este lapso de tiempo las especies de la sección *Nigri* se vuelven dominantes sobre las especies de la sección *Circumdati* y *Flavi*, hallando un porcentaje de infección muy cercano 100% al término del almacenamiento.

En las muestras analizadas de la Vía húmeda fermentativa sumergida, estas presentaron los porcentajes más bajos de infección en comparación con las otras vías estudiadas. La incidencia por especies de la sección *Nigri* tuvo lugar a partir de las 4.5h de secado en café pergamino con un 2% de infección y un valor del 6% en la última etapa de obtención de café verde (Figuras 6.15, 6.16).



Muestras de café por etapas de proceso

FIGURA 6.15 Porcentaje de Infección por especies de la sección *Nigri* presentes en la Vía Húmeda Fermentativa Sumergida.

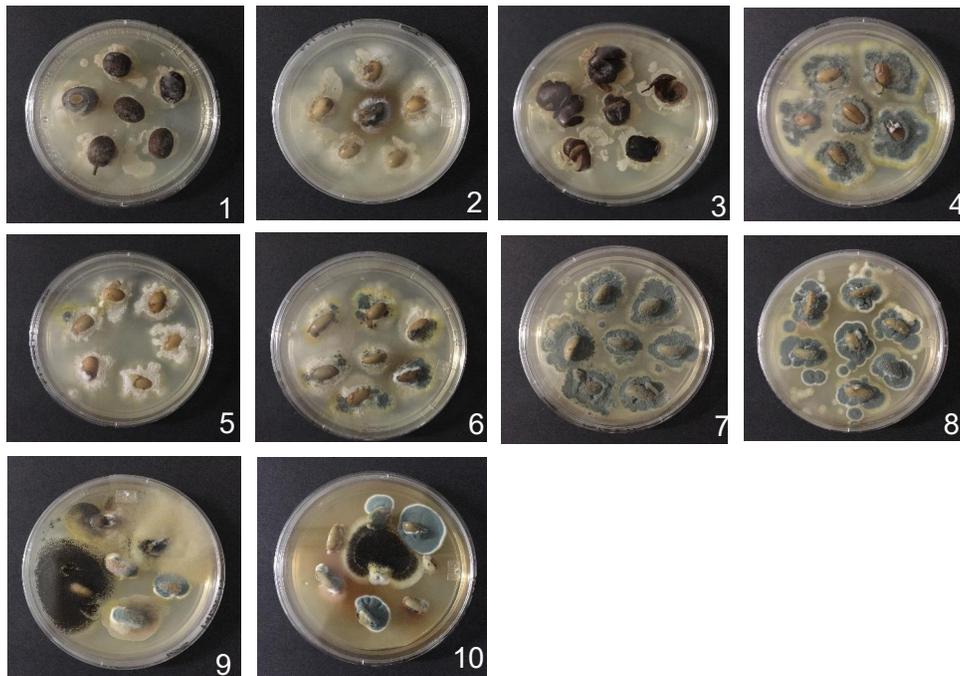


FIGURA 6.16 Incidencia de A. sección *Nigri* en la Vía Húmeda Fermentativa Sumergida.

1)Café cereza 2) Café despulpado 3) Pulpa de café 4) Café fermentado 3h
5) Café fermentado 14.5h 6) Café lavado 7) Café pergamino 3h de secado
8) Café pergamino 4.5h de secado 9) Café pergamino 9h de secado 10) Café verde.

La baja incidencia de especies de la sección *Nigri* en la Vía húmeda fermentativa sumergida puede ser atribuido a que durante la etapa de fermentación existe el desarrollo de bacterias ácido lácticas tales como, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*, las cuales se han reportado con la capacidad de inhibir el desarrollo de hongos toxigénicos en café (Champion *et al.*, 2008), ya sea por competición de nutrientes, o por la producción de metabolitos tales como, ácido propiónico, peróxido de hidrógeno y diacetil (Lindgren y Dobrogosz, 1990), los cuales han sido reportados como compuestos antifúngicos.

Por otro lado, se ha demostrado la presencia de levaduras en este tipo de fermentación y que éstas también son capaces de producir compuestos antifúngicos. Armando *et al.*, (2013), mostraron que ciertas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* disminuyen el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* y *Fusarium graminearum* dando como resultado la inhibición de la producción de OTA, Zearalenona y Deoxinivalenol (DON). En otro trabajo *S. cerevisiae* inhibió la incidencia de *A. ochraceus* y *A. niger* y como consecuencia la contaminación por OTA en el café (Velmourougane, 2013).

Respecto a las muestras obtenidas de la Vía mecánica la incidencia por especies de la sección *Nigri* estuvo presente a partir de las 3h de secado en café pergamino, mostrando un valor del 2% de infección, duplicándose este porcentaje en la siguiente etapa. Al término del secado el porcentaje de infección se incrementó hasta un 58% y en la etapa final de obtención de café verde se redujo a un 4% (Figuras 6.17, 6.18). Este efecto de incremento-reducción en la transformación de café pergamino a café verde se explica por lo reportado por Broissin Vargas *et al.*, (2017), quienes determinaron que el pergamino ejerce un efecto protector sobre el grano, ya que la producción de OTA fue nula en los granos de café almacenado en pergamino, mientras que en los granos de café verde almacenado se tuvo una producción de hasta 5.5 µg/kg.

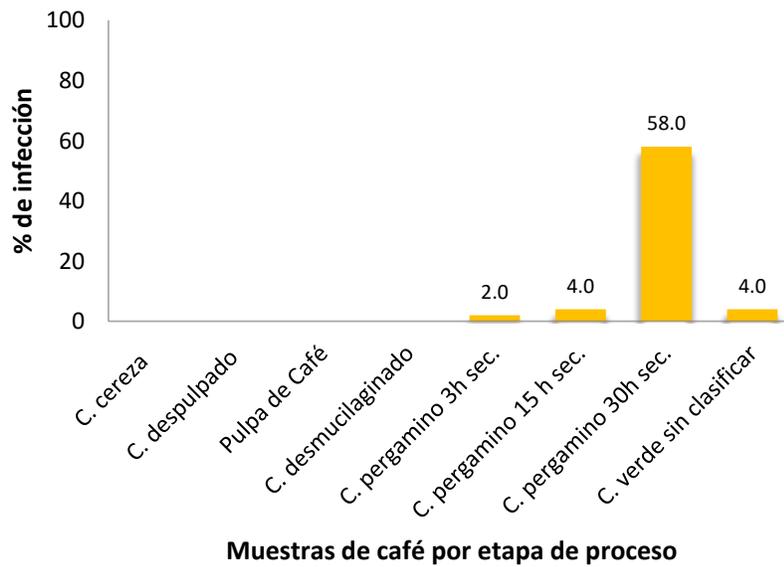


FIGURA 6.17 Porcentaje de Infección por especies de la sección *Nigri* presentes en la Vía Mecánica.

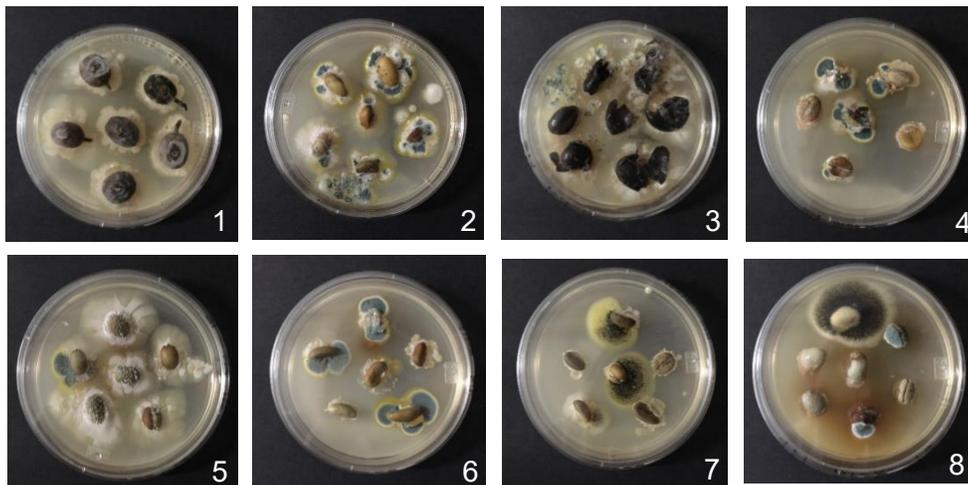


FIGURA 6.18 Incidencia de *A.* sección *Nigri* en la Vía Mecánica.

1) Café cereza 2) Café despulpado 3) Pulpa de café 4) Café desmucilaginado
 5) Café pergamino 3h de secado 6) Café pergamino 15h de secado 7) Café pergamino 30h de secado 8) Café verde.

En relación a las muestras de la vía seca, la presencia por especies de la sección de estudio fue evidente a partir del segundo día de secado en las cerezas de café, mostrando un porcentaje de infección del 4%, duplicándose este valor en la siguiente etapa y reduciéndose a un 2% en las siguientes tres, sin embargo, en el proceso final de obtención de café verde el porcentaje de infección se incrementó drásticamente hasta 70% (Figuras 6.19, 6.20).

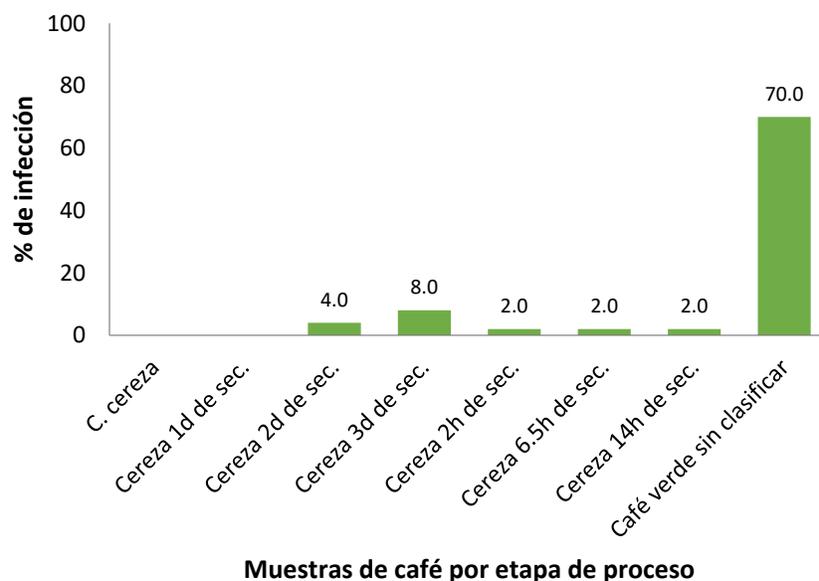


FIGURA 6.19 Porcentaje de Infección por especies de la sección *Nigri* presentes en la Vía Seca.

Este efecto puede atribuirse a las condiciones de secado, ya que las cerezas son expuestas al ambiente durante varios días para la obtención de cerezas secas, durante este tiempo el café es más susceptible a la contaminación fúngica. Por ello, una vez que las cerezas se encuentran secas, al pasar al proceso de descascarado se propicia una contaminación cruzada de las especies fúngicas que proliferaron en la superficie de las cerezas durante el tiempo de secado hacia los granos de café verde, incrementando significativamente el porcentaje de infección en los mismos.

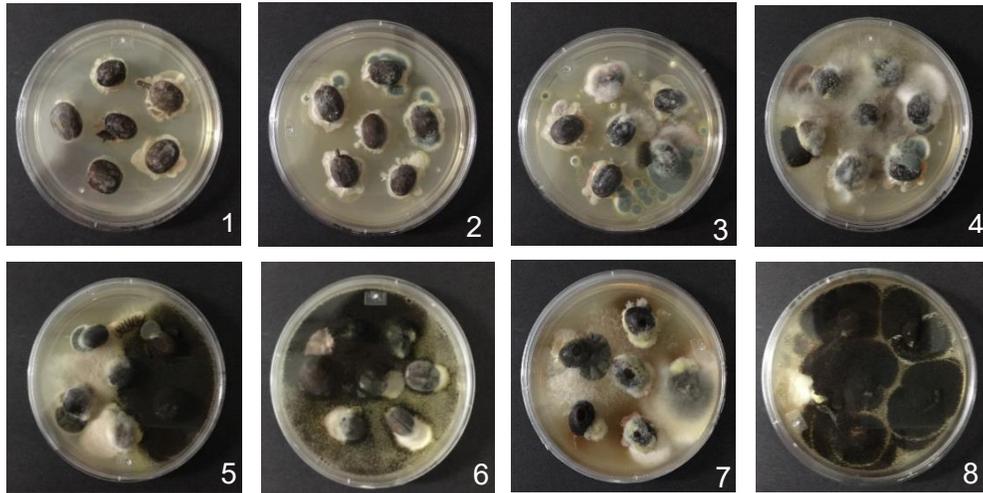


FIGURA 6.20 Incidencia de *A. sección Nigri* en muestras de la Vía Seca.

1) Café cereza 2) Cereza 1d de secado 3) Cereza 2d de secado 4) Cereza 3d de secado 5) Cereza 2h de secado 6) Cereza 6.5h de secado 7) Cereza 14h de secado 8) Café verde.

6.1.2 Aislamiento e identificación de cepas

A partir de las placas con medio PDA, utilizadas para calcular los porcentajes de infección se realizó el aislamiento de cepas pertenecientes a la sección *Nigri* y mediante el empleo de las claves taxonómicas descritas por Samson *et al.*, (2004a) y Pitt y Hocking (2009), se llevó a cabo la identificación morfológica para cada cepa aislada.

Se aisló un total de 68 cepas por las 4 vías de procesamiento estudiadas, sin embargo, el análisis por claves taxonómicas, reflejó que sólo 33 cepas presentaron características morfológicas diferentes y el resto fueron semejantes.

De las 33 cepas aisladas, 30 cepas fueron identificadas morfológicamente como *Aspergillus niger*, 2 como *A. carbonarius* y 1 *A. tubingensis*.

6.1.3 Características morfológicas de cepas aisladas

Las cepas fueron aisladas por punción en medio PDA acidificado (pH 3.5), y resembradas mediante esta misma técnica en los medios MEA (Figura 6.21) y CYA. Las condiciones de incubación para cada medio se llevaron a cabo de acuerdo a lo descrito en el apartado 5.2.2 de métodos y materiales.

Las características morfológicas macroscópicas observadas en las cepas aisladas en el medio PDA fueron: coloración marrón de las colonias fúngicas con diámetros entre 44-77 mm, presentando una variación de color en función del tiempo de blanco a marrón, conidios color marrón, coloración crema en el reverso de las colonias, textura del micelio aterciopelada y pulverulenta, y con diferentes texturas en la superficie, 53 cepas con textura plana, 32 con pliegues circulares, 3 con textura cerebriforme y 27 con textura plegada. Particularmente en 3 cepas se observó la producción de esclerocios con coloración blanco y rosa.

Respecto a las características macroscópicas en el medio MEA se observaron colonias con coloración negra con diámetros entre 34-50 mm, presentando variación de color en función del tiempo de blanco a negro, conidios negros, coloración crema en el reverso de las colonias, textura de micelios pulverulentos y sólo en 11 cepas textura granulosa. La textura de la superficie se observó plana, 33 cepas presentaron pliegues circulares, 1 con textura acuminada y 1 con textura plegada. Ninguna cepa presentó producción de esclerocios.

Referente a las observaciones macroscópicas en el medio CYA se obtuvieron colonias fúngicas color marrón con diámetros entre 67-86 mm, con variación de color en función del tiempo de blanco a marrón, conidios color marrón, coloración crema en el reverso de las colonias, textura de micelios aterciopelados y pulverulentos, 3 cepas con textura vellosa, 2 con textura granulosa y 1 con textura algodonosa. La textura de la superficie se observó plana, plegada y con exudado, 50 cepas con pliegues circulares, 14 con textura crateriforme, 12 con textura cerebriforme y 4 con textura umbilicada. Específicamente sólo 2 cepas presentaron producción de esclerocios con color blanco y rosa.

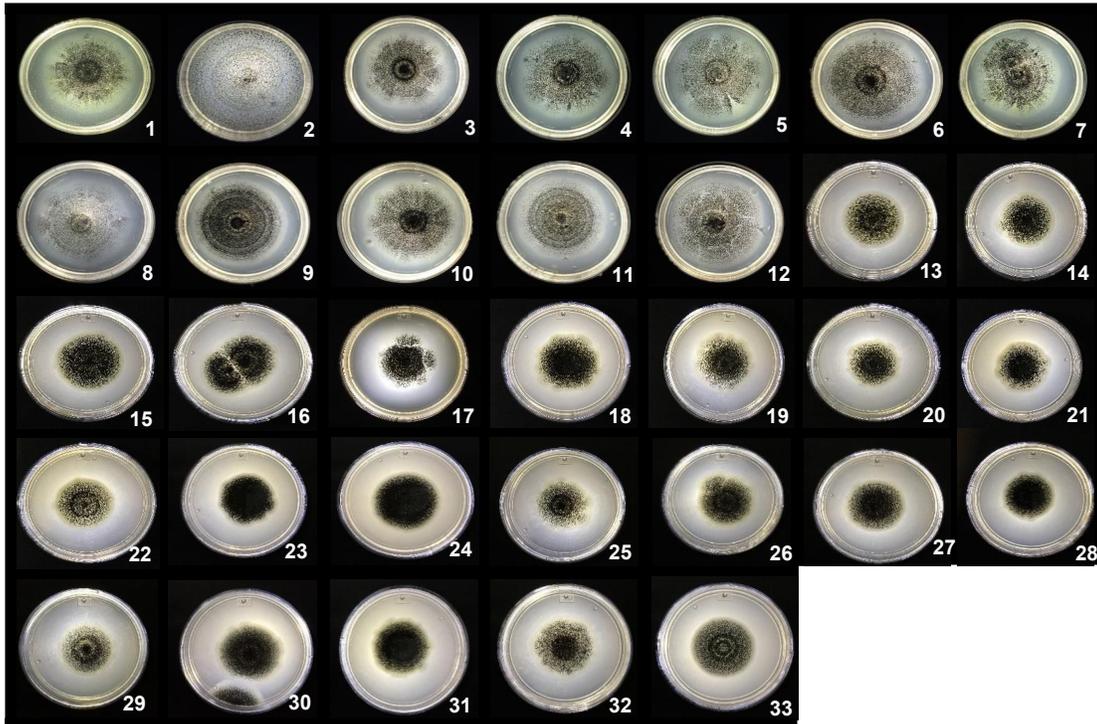


FIGURA 6.21 Cepas aisladas de A. sección *Nigri* en medio MEA.

Cepas 1-12: Vía húmeda fermentativa en ausencia de agua; Cepas 13-16: Vía húmeda fermentativa sumergida; Cepas: 17-22: Vía mecánica; Cepas 23-33: Vía seca.

En relación a las observaciones microscópicas, estas se llevaron a cabo empleando una tinción con colorante lactofucsina, la cual consiste básicamente en cortar con un asa estéril un fragmento de cultivo fúngico en forma de “triángulo”, el cual se coloca sobre un portaobjetos limpio y se le agrega una gota de colorante, posteriormente se coloca un cubreobjetos y con un material suave se esparce la muestra y se observa al microscopio con los objetivos de 10X,40X y 100X.

Las características microscópicas para las 33 cepas aisladas fueron: forma globosa de cabezas conidiales y vesículas, presencia de metúlas y fiálides, crecimiento radial de conidios, especies biseriadas, tamaño de diámetro de vesículas entre 24.25 - 92.66 μm , tamaño de diámetro de conidios entre 2.39 – 7.18 μm .

El tamaño de diámetro de conidios fue la principal característica microscópica que ayudo a discriminar las especies de *A. carbonarius* y *A. niger*, ya que de acuerdo a las claves taxonómicas de Samson *et al.*, (2004a), Pitt y Hocking (2009) (Anexo II, III), las especies de *A. carbonarius* presentan un tamaño de diámetro de conidios mayor a 6 μm , mientras que las de *A. niger* presentan un diámetro inferior a este valor.

La Figura 6.22 muestra las estructuras microscópicas de la cepa número 2, aislada en la vía húmeda fermentativa en ausencia de agua, se identificó como *A. carbonarius* debido a que su tamaño de diámetro de conidios fue de 6.29 μm .

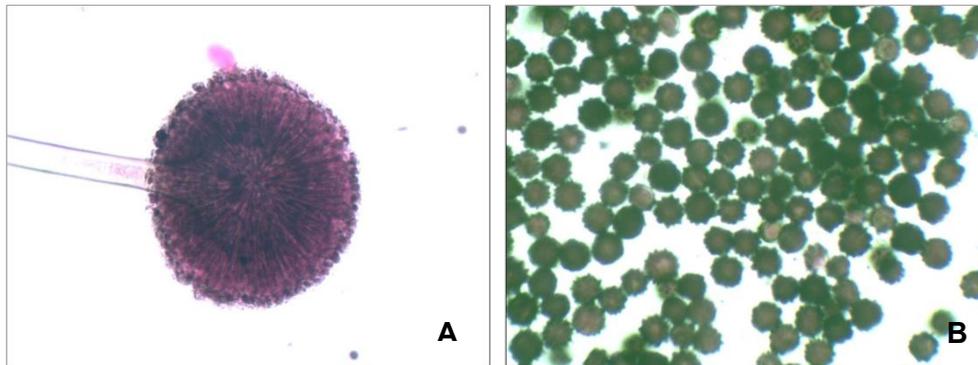


FIGURA 6.22 Estructuras microscópicas de *A. carbonarius* (Cepa 2).
A) Conidióforo, B) Conidios

Por su parte, la Figura 6.23 muestra las estructuras microscópicas de una cepa identificada como *A. niger*, aislada de la vía húmeda fermentativa sumergida, el tamaño de diámetro de conidios que se observó fue de 3.46 μm .

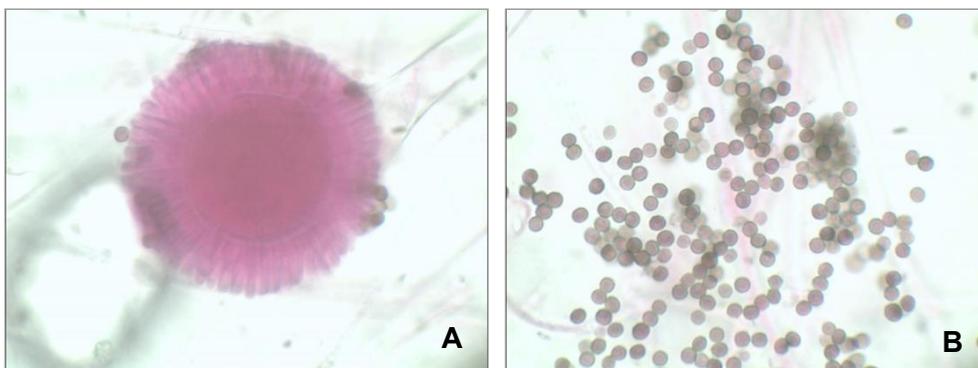


FIGURA 6.23 Estructuras microscópicas de *A. niger* (Cepa 16).
A) Conidióforo, B) Conidios

Por consiguiente, *Aspergillus niger* fue la especie dominante con una incidencia del 90.9% de las 33 cepas aisladas (Tabla 6.9). *A. carbonarius* y *A. tubingensis* mostraron una incidencia del 6.06% y 3.04% respectivamente. Estos resultados coinciden con los estudios de diversidad fúngica en café de Brasil (Taniwaki *et al.*, 2003) (Rezende *et al.*, 2013), Tailandia (Noonim *et al.*, 2008b), Vietnam (Leong *et al.*, 2007b) y con el trabajo de Suárez-Quiroz *et al.*, (2004a) en café de Coatepec, México.

La dominancia de *A. niger* se debe a que esta especie se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente (Urbano *et al.*, 2001) y junto con las demás especies de la sección *Nigri* son considerados como los principales hongos responsables del deterioro de alimentos (Pitt y Hocking, 1997).

Por otra parte, las especies de *A. carbonarius* son menos comunes que *A. niger* en granos de café arábica, por el contrario, en granos de café robusta la incidencia de *A. carbonarius* se ha observado notablemente más alta que en café arábica (Pardo *et al.*, 2004; Leong *et al.*, 2007b; Noonim *et al.*, 2008b), debido a que la mayoría de estos granos son procesados por vía seca. Se ha propuesto que *A. carbonarius* es la principal especie responsable de la contaminación por OTA en café robusta (Noonim *et al.*, 2008b).

De acuerdo a Samson *et al.*, (2006) las especies aisladas tienen la habilidad de producir OTA, por lo cual se llevó a cabo la evaluación del potencial ocratoxigénico de estas mismas.

6.1.4 Evaluación del potencial ocratoxigénico de cepas aisladas

La habilidad de las 33 cepas aisladas para producir OTA se realizó a partir de cultivos de 7 días de incubación en medio PDA acidificado (pH 3.5) a 25°C. Para ello, con ayuda de un sacabocados de 5 mm de diámetro se tomaron tres botones del centro de la colonia. Posteriormente, se realizó la extracción de OTA con una solución de solventes, se filtraron e inmediatamente se cuantificó la producción de la toxina.

La cuantificación de OTA se realizó mediante un ensayo ELISA, y los resultados (Tabla 6.9) se expresaron en ng/g de medio. El ensayo se realizó por duplicado para cada cepa aislada.

TABLA 6.9 Identificación morfológica y evaluación del potencial ocratoxigénico de las cepas aisladas.

Vía de procesamiento	Cepa	Clave	Etapas	Identificación Morfológica	Producción de OTA ng/g medio
Húmeda Fermentativa en ausencia de agua	1	AsCFSA1	Café pergamino	<i>A. niger</i>	18.19
	2	AsCFSA2	Café pergamino	<i>A. carbonarius</i>	110.83
	3	AsCFSA3	Café verde	<i>A. niger</i>	4.73
	4	AsCFSA4	Café verde	<i>A. niger</i>	27.59
	5	AsCFSA5	Café verde	<i>A. niger</i>	20.72
	6	AsCFSA6	Café verde	<i>A. niger</i>	38.09
	7	AsCFSA7	Café verde	<i>A. niger</i>	62.9
	8	AsCFSA8	Café verde	<i>A. niger</i>	26.77
	9	AsCFSA9	Café verde	<i>A. niger</i>	20.11
	10	AsCFSA10	Café verde	<i>A. niger</i>	27.93
	11	AsCFSA11	Café pergamino	<i>A. niger</i>	33.86
	12	AsCFSA12	Café verde	<i>A. niger</i>	32.11
Húmeda Fermentativa Sumergida	13	AsCFS13	Café verde	<i>A. niger</i>	37.03
	14	AsCFS14	Café verde	<i>A. niger</i>	123.91
	15	AsCFS15	Café verde	<i>A. niger</i>	40.06
	16	AsCFS16	Café pergamino	<i>A. niger</i>	213.01
Mecánica	17	AsCM17	Café pergamino	<i>A. tubingensis</i>	<Lmd ^a
	18	AsCM18	Café pergamino	<i>A. niger</i>	8.27
	19	AsCM19	Café pergamino	<i>A. niger</i>	6.55
	20	AsCM20	Café pergamino	<i>A. niger</i>	18.61
	21	AsCM21	Café verde	<i>A. niger</i>	36.72
	22	AsCM22	Café pergamino	<i>A. niger</i>	10.11
Seca	23	AsCN23	Cereza seca	<i>A. niger</i>	6.78
	24	AsCN24	Cereza seca	<i>A. niger</i>	330.41
	25	AsCN25	Café verde	<i>A. niger</i>	23.57
	26	AsCN26	Café verde	<i>A. niger</i>	Nc ^b
	27	AsCN27	Café verde	<i>A. niger</i>	Nc
	28	AsCN28	Café verde	<i>A. niger</i>	Nc
	29	AsCN29	Café verde	<i>A. niger</i>	Nc
	30	AsCN30	Café verde	<i>A. niger</i>	Nc
	31	AsCN31	Café verde	<i>A. niger</i>	Nc
	32	AsCN32	Café verde	<i>A. niger</i>	Nc
	33	AsCN33	Café verde	<i>A. carbonarius</i>	Nc

^a Límite mínimo de detección Lmd = 1 µg/kg.

^b No cuantificado.

El 72.7% de las 33 cepas aisladas, mostró la capacidad de producir OTA, sin embargo, este resultado es más alto en comparación con los estudios previos. Pardo *et al.*, (2004) reportaron un 7.3% de los aislamientos de la sección *Nigri* como productores de OTA en granos de café verde de diferentes orígenes, Urbano *et al.*, (2001) 11.5% en un trabajo similar. Taniwaki *et al.* (2003) 6.65%, Rezende *et al.*, (2013) 4.54% y Batista *et al.*, (2003; 2009) no detectaron aislamientos ocratoxigénicos de la sección *Nigri*, en muestras de café de Brasil.

Por consiguiente, del total de aislamientos que mostraron la habilidad de producir OTA, el 76.7% fueron especies de *A. niger* (23 cepas). Este resultado representa una mayor producción de OTA de esta especie en relación con los estudios existentes. Noonim *et al.*, (2008b) cuantificaron que el 13% de los aislamientos de *A. niger* producen OTA en café de Tailandia. Taniwaki *et al.*, (2003) 3% y Rezende *et al.*, (2013) 12.1% y 0% en café convencional y café orgánico respectivamente, producido en Brasil. Sin embargo, en un estudio con otra matriz alimentaria como la uva (Magnoli *et al.*, 2003) se ha reportado que la producción de OTA por especies de *A. niger* ha sido del 45.4%.

Respecto a la producción de OTA por *A. carbonarius* sólo 1 cepa presentó la habilidad de producir la toxina representando el 50%, lo cual tiene cierta relación con lo reportado por Taniwaki *et al.*, (2003) quienes reportaron que el 77% de los aislamientos de *A. carbonarius* produce OTA.

La eventual divergencia sobre la producción de OTA por el género *Aspergillus* sugiere que la síntesis de esta toxina depende de la interacción de los factores extrínsecos (sustrato, Aw, temperatura, pH) más que por la capacidad inherente del organismo para producir la toxina. Si un aislamiento no produce OTA bajo ciertas condiciones dadas, esto no justifica cualquier conclusión sobre su capacidad general para producirla (Mühlencoert *et al.*, 2004).

La producción de metabolitos secundarios como las micotoxinas no son esenciales para las especies productoras. Los factores que intervienen en la síntesis de OTA regulan los genes y enzimas involucradas en la producción de la toxina (Ehrlich *et al.*, 2005; Shwab y Keller, 2008).

Por otra parte, los niveles de producción de OTA de las cepas aisladas estuvieron en el rango 4.73-330.41 ng/g de medio. 4 cepas presentaron altos niveles de producción de OTA, cepa AsCFSA2 *A. carbonarius*, AsCFS14 *A. niger*, AsCFS16 *A. niger* y AsCN24 *A. niger* con niveles de producción de 110.83, 123.91, 213.01 y 330.41 ng/g de medio respectivamente.

Posteriormente, para confirmar la identidad de las cepas con alta producción de OTA se llevó a cabo su caracterización molecular, a excepción de AsCFS14 *A. niger*.

6.1.5 Caracterización molecular de cepas aisladas

La taxonomía de las especies pertenecientes a la sección *Nigri* comprende uno de los más confusos y complejos debido a las ligeras diferencias entre los taxones. Por mucho tiempo, la clasificación e identificación de estas especies han sido estudiadas a través de criterios morfológicos (Pitt y Hocking, 1997; Samson *et al.*, 2004b)

Recientemente el uso de métodos moleculares basados principalmente en la secuenciación del ADN ha permitido una fácil identificación y descubrimiento de nuevas especies pertenecientes a la sección *Nigri*. (Samson *et al.*, 2004a, 2007; Serra *et al.*, 2006b; Noonim *et al.*, 2008a; Silva *et al.*, 2011; Varga *et al.*, 2011).

La caracterización de las cepas aisladas (AsCFSA2 *A. carbonarius*, AsCFS16 *A. niger* y AsCN24 *A. niger*) con alta producción de OTA se llevó a cabo mediante la secuenciación del gen de β -tubulina. Las secuencias obtenidas fueron comparadas contra secuencias registradas en el GenBank de NCBI mediante BLAST para determinar su homología. Se aceptó como válido una homología mayor al 99%.

AsCFSA2 *A. carbonarius* (Figura 6.24), AsCFS16 *A. niger* (Figura 6.25) y AsCN24 *A. niger* (Figura 6.26) presentaron una homología entre 99-100% contra las secuencias en la base de datos.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Aspergillus carbonarius isolate A1S3_D53 beta-tubulin gene, exons 3 through 6 and partial cds	992	992	99%	0.0	99%	JX463315.1
Aspergillus carbonarius strain CICC41254 beta-tubulin gene, partial cds	985	985	98%	0.0	99%	KP259287.1
Aspergillus carbonarius strain A-1750 beta-tubulin gene, partial cds	983	983	97%	0.0	100%	KC520551.1
Aspergillus carbonarius strain A-2160 beta-tubulin gene, partial cds	977	977	97%	0.0	99%	KC520550.1
Aspergillus carbonarius partial benA gene for beta-1 and beta-2 tubulin, isolate CCF 3388, exons	974	974	99%	0.0	99%	FR775314.1
Aspergillus carbonarius strain A-1759 beta-tubulin gene, partial cds	972	972	97%	0.0	99%	KC520549.1
Aspergillus carbonarius partial benA gene for beta-tubulin, exons 1-4, isolate CCF 3388	966	966	97%	0.0	99%	HE577803.1
Aspergillus carbonarius strain 100-12-10L beta-tubulin gene, partial cds	965	965	97%	0.0	99%	KF434634.1
Aspergillus carbonarius isolate 144 3 K2 beta-tubulin (tub2) gene, partial cds	955	955	95%	0.0	99%	KJ599604.1
Aspergillus carbonarius isolate ZIM8 beta-tubulin (tub2) gene, partial cds	946	946	94%	0.0	99%	JX088040.1

FIGURA 6.24 Homología de AsCFSA2 *A. carbonarius* por el gen de β -tubulina.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Aspergillus niger voucher IHEM4023 beta-tubulin gene, partial sequence	1031	1031	99%	0.0	100%	HQ632722.1
Aspergillus niger strain L06 beta-tubulin gene, partial cds	1029	1029	99%	0.0	100%	KF669400.1
Aspergillus niger voucher IHEM21604 beta-tubulin gene, partial sequence	1029	1029	99%	0.0	100%	HQ632700.1
Aspergillus niger isolate A3S4_D6 beta-tubulin gene, exons 3 through 6 and partial cds	1027	1027	99%	0.0	100%	JX463317.1
Aspergillus niger strain 1062 beta-tubulin gene, partial cds	1026	1026	99%	0.0	100%	KM189806.1
Aspergillus niger voucher IHEM21697 beta-tubulin gene, partial sequence	1026	1026	99%	0.0	99%	HQ632702.1
Aspergillus niger voucher IHEM21605 beta-tubulin gene, partial sequence	1026	1026	99%	0.0	99%	HQ632701.1
Aspergillus niger voucher IHEM6126 beta-tubulin gene, partial sequence	1022	1022	99%	0.0	99%	HQ632726.1
Aspergillus niger voucher IHEM21970 beta-tubulin gene, partial sequence	1022	1022	99%	0.0	99%	HQ632703.1
Aspergillus niger voucher IHEM2312 beta-tubulin gene, partial sequence	1022	1022	99%	0.0	99%	HQ632679.1

FIGURA 6.25 Homología de AsCFS16 *A. niger* por el gen de β -tubulina.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Aspergillus niger voucher IHEM4023 beta-tubulin gene, partial sequence	1031	1031	99%	0.0	100%	HQ632722.1
Aspergillus niger strain L06 beta-tubulin gene, partial cds	1029	1029	98%	0.0	100%	KF669400.1
Aspergillus niger voucher IHEM21604 beta-tubulin gene, partial sequence	1029	1029	98%	0.0	100%	HQ632700.1
Aspergillus niger isolate A3S4_D6 beta-tubulin gene, exons 3 through 6 and partial cds	1027	1027	98%	0.0	100%	JX463317.1
Aspergillus niger strain 1062 beta-tubulin gene, partial cds	1026	1026	98%	0.0	100%	KM189806.1
Aspergillus niger voucher IHEM21697 beta-tubulin gene, partial sequence	1026	1026	99%	0.0	99%	HQ632702.1
Aspergillus niger voucher IHEM21605 beta-tubulin gene, partial sequence	1026	1026	99%	0.0	99%	HQ632701.1
Aspergillus niger voucher IHEM6126 beta-tubulin gene, partial sequence	1022	1022	99%	0.0	99%	HQ632726.1
Aspergillus niger voucher IHEM21970 beta-tubulin gene, partial sequence	1022	1022	99%	0.0	99%	HQ632703.1
Aspergillus niger voucher IHEM2312 beta-tubulin gene, partial sequence	1022	1022	99%	0.0	99%	HQ632679.1

FIGURA 6.26 Homología de AsCN24 *A. niger* por el gen de β -tubulina.

La confirmación de la homología de las cepas aisladas en relación con la identificación microbiológica fue exitosa. Por lo tanto, el ADN amplificado de las cepas se empleó como marcador molecular en los perfiles DGGE.

6.2 Diversidad fúngica de la sección *Nigri* mediante PCR-DGGE

6.2.1 Perfiles DGGE

La diversidad fúngica de la sección *Nigri* presente en las diferentes vías de procesamiento de café fue estudiada mediante perfiles por PCR-DGGE, estos se obtuvieron a partir de las diferentes muestras de las etapas post-cosecha y utilizando a las cepas caracterizadas molecularmente como marcadores. Cada carril vertical representó una muestra de café con su respectivo duplicado y cada banda representó una especie fúngica. En los primeros dos carriles se colocó el ADN amplificado de las cepas toxigénicas aisladas, esto permitió observar y relacionar la presencia de especies ocratoxigénicas de la sección *Nigri* para cada etapa de proceso.

La presencia de cepas toxigénicas de la sección *Nigri* sólo fue detectada con bandas de baja intensidad en muestras de café verde almacenado en la vía húmeda fermentativa en ausencia de agua (Figura 6.27).

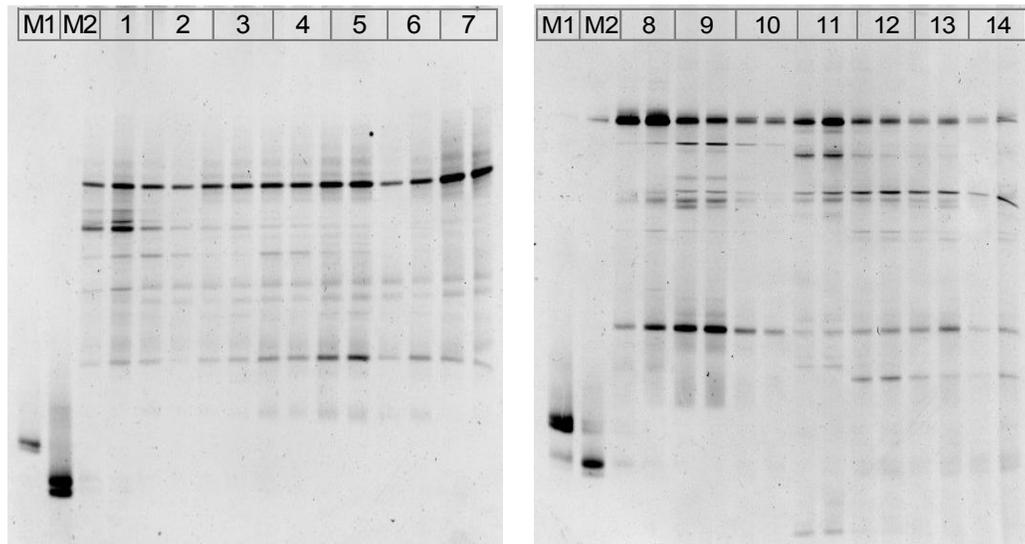


FIGURA 6.27 Perfil DGGE de la Vía húmeda fermentativa en ausencia de agua.

M1:AsCFSA2 *A. carbonarius*, **M2:** AsCN24 *A. niger*.

1) Café cereza **2)** Café despulpado **3)** Pulpa de café **4)** Café fermentado 0h **5)** Café fermentado 9h **6)** Café fermentado 18h **7)** Agua de fermentación **8)** Café lavado **9)** Café pergamino 2h de secado **10)** Café pergamino 22h de secado **11)** Café pergamino almacenado **12)** Café verde 1ra almacenado **13)** Café verde 2da almacenado **14)** Café verde desmanche almacenado.

En las vías restantes (Figuras 6.28,6.29), los perfiles DGGE no reflejaron la presencia de cepas toxigénicas de la sección de estudio.

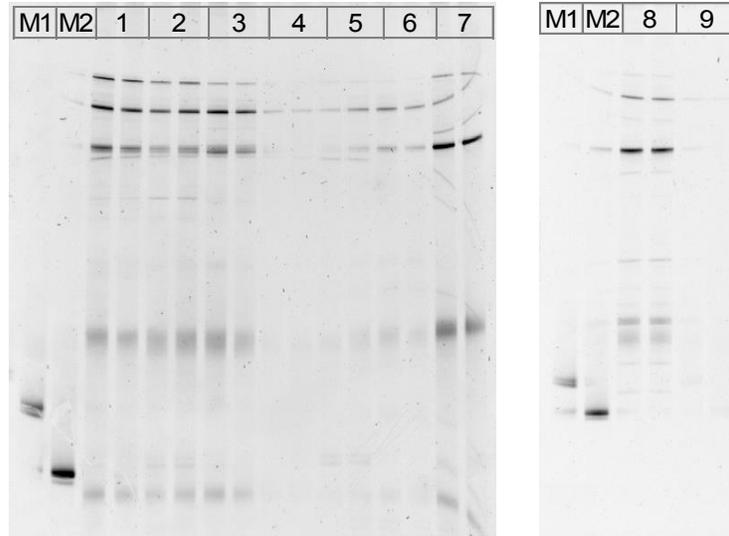


FIGURA 6.28 Perfil DGGE de la Vía Mecánica.

M1:AsCFSA2 *A. carbonarius*, **M2:** AsCN24 *A. niger*

1)Café cereza **2)** Café despulpado **3)** Pulpa de café **4)** Café desmucilaginado **5)** Agua de lavado **6)** Café pergamino 3h de secado **7)** Café pergamino 15h de secado **8)** Café pergamino 30h de secado **9)** Café verde.

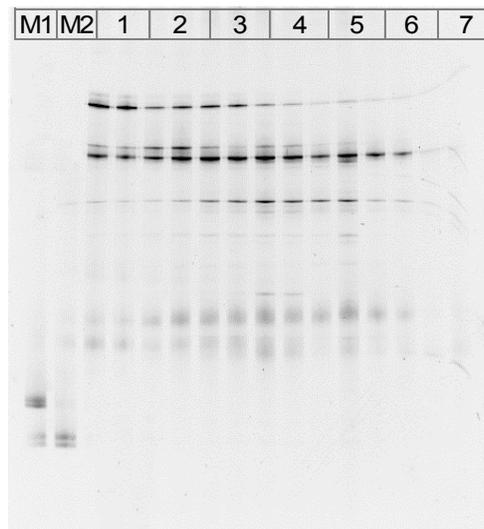


FIGURA 6.29 Perfil DGGE de la Vía Seca.

M1:AsCFSA2 *A. carbonarius*, **M2:** AsCN24 *A. niger*

1) Café cereza **2)** Cereza 1d de secado **3)** Cereza 2d de secado **4)** Cereza 3d de secado **5)** Cereza 2h de secado **6)** Cereza 14h de secado **7)** Café verde.

La baja detección de especies toxigénicas de la sección *Nigri* en los perfiles DGGE obtenidos presentó mínima relación con los resultados alcanzados por microbiología clásica, ya que los porcentajes de infección reflejaron la incidencia de estas especies en todas las vías de procesamiento post-cosecha de café estudiadas, mientras que con el método molecular sólo fue posible detectarlas en una sola vía de procesamiento.

Esta discordancia es atribuida al límite de detección que presenta la DGGE (Durand *et al.*, 2012), donde la concentración de las especies debe encontrarse en un valor mayor a 10^4 esporas/mL para ser identificadas.

Los resultados confirman lo propuesto por Vilela *et al.*, (2010), quienes sugieren que los métodos moleculares deben ser empleados simultáneamente con la microbiología clásica para describir con el máximo detalle la diversidad fúngica asociada al proceso post-cosecha de café.

Este estudio es el primero en utilizar métodos moleculares y tradicionales para determinar las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* productoras de OTA presentes en las diferentes vías de procesamiento post-cosecha de café en México.

6.2.2 Análisis de similitud en perfiles DGGE

El análisis de los perfiles DGGE se llevó a cabo mediante la construcción de dendogramas de similitud de especies entre las etapas de procesamiento post-cosecha de café, mostrando diferentes agrupaciones de comunidades fúngicas de acuerdo a la cronología de los procesos post-cosecha.

Concerniente a la Vía húmeda fermentativa en ausencia de agua (Figura 6.30) el análisis de similitud de especies mostró 2 agrupaciones principales, guardando una similitud de alrededor del 45% entre ellas. La primera agrupación incluyó esencialmente las muestras que constituyen el beneficio húmedo de café, estas presentaron una similitud de alrededor del 63%. El segundo grupo comprendió las muestras que conforman el beneficio seco, teniendo una similitud cercana al 55%. Los resultados indican que la diversidad fúngica en café varía respecto al contenido de humedad en las muestras.

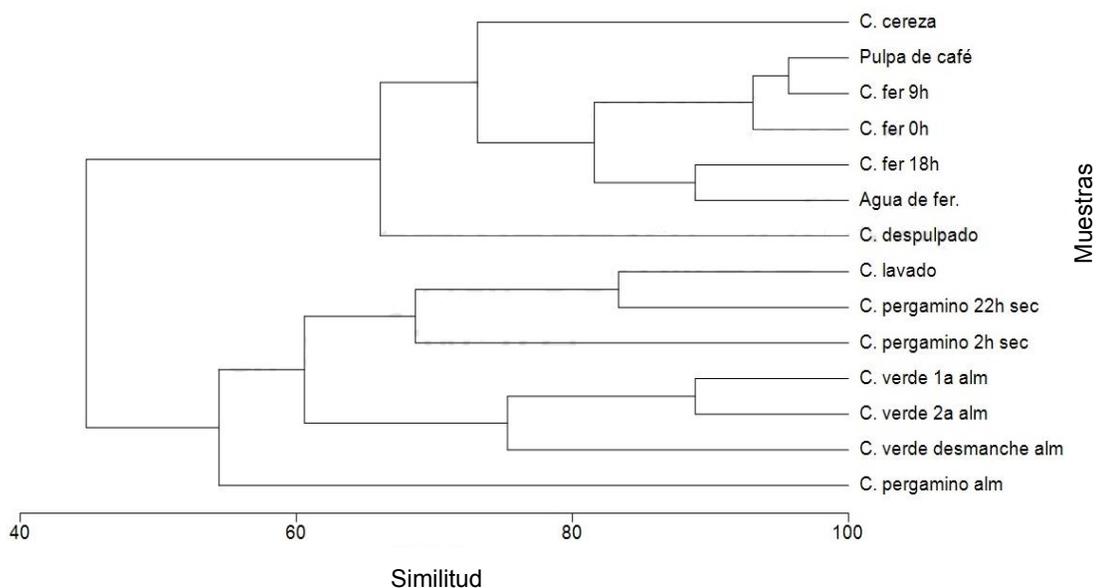


FIGURA 6.30 Análisis de similitud de especies fúngicas en la Vía Húmeda Fermentativa en ausencia de agua.

Respecto a la similitud de especies en la Vía húmeda fermentativa sumergida (Figura 6.31), principalmente se observó que la diversidad fúngica en las cerezas de café, presentan una relación de alrededor del 47% con las muestras de las etapas subsecuentes de procesamiento con excepción de la muestra de café verde.

Por el contrario, la diversidad fúngica en café verde no deriva de las etapas que le anteceden, por lo que únicamente se relacionó con la muestra de cereza de café, con un valor cercano al 42%. Este resultado puede atribuirse al desarrollo de bacterias ácido lácticas y levaduras durante la fermentación, las cuales tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de hongos toxigénicos (Champion *et al.*, 2008), (Armando *et al.*, 2013), (Velmourougane, 2013).

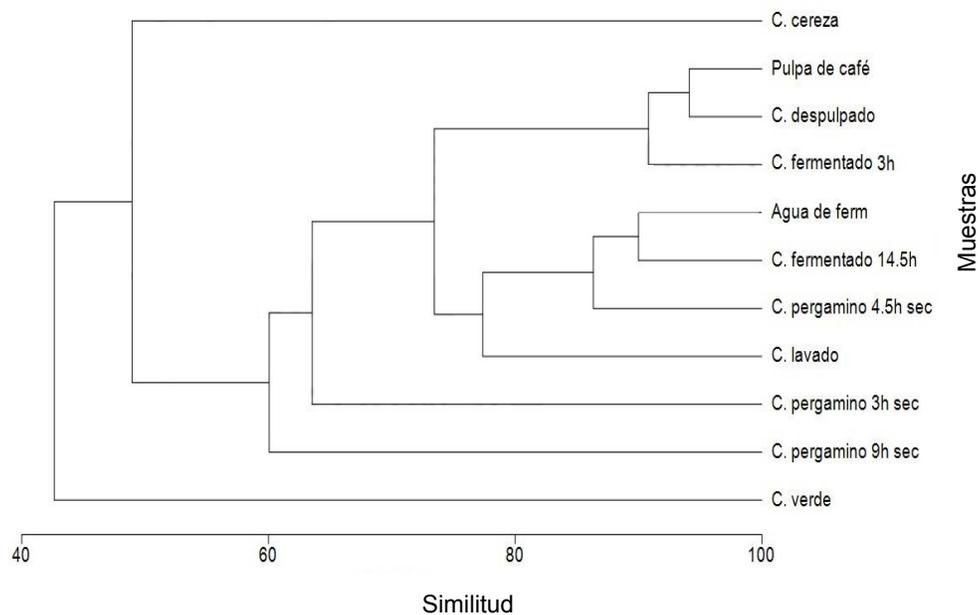


FIGURA 6.31 Análisis de similitud de especies fúngicas en la Vía Húmeda Fermentativa Sumergida.

Referente a la Vía mecánica (Figura 6.32), la mayor similitud de especies fúngicas se presentó entre las muestras de cerezas de café y las 2 etapas siguientes de procesamiento, con un valor cercano al 85 %.

Un caso interesante se presentó en la muestra de café verde, la cual sólo guardo similitud con la muestra de café desmucilaginado con un valor de alrededor del 65%. Las especies que estuvieron presentes en la etapa de desmucilaginación reaparecieron en los granos de café verde, lo cual indica la presencia de especies fúngicas con gran habilidad, principalmente de desarrollarse en condiciones de alta o baja humedad en el sustrato.

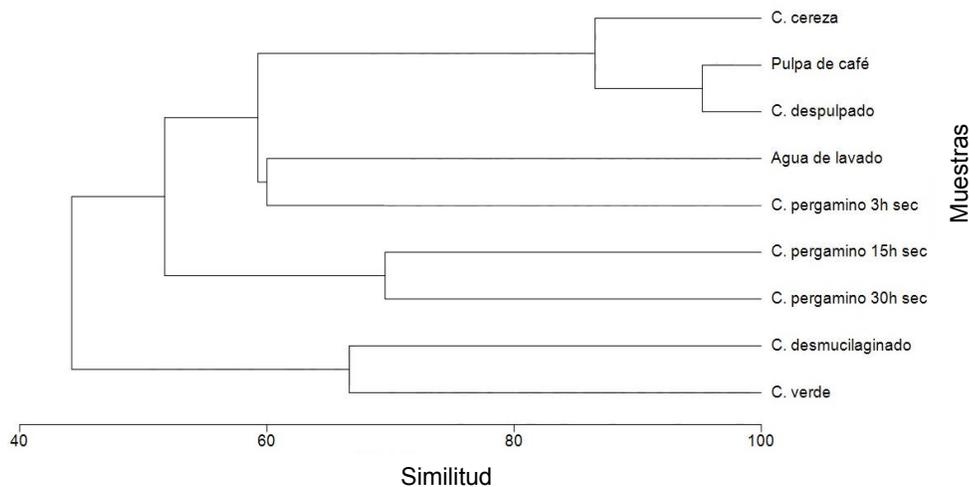


FIGURA 6.32 Análisis de similitud de especies fúngicas presentes en la Vía Mecánica.

En relación a la Vía seca (Figura 6.33), se observó la formación de dos agrupaciones principales y una consistencia de la diversidad fúngica entre las etapas de procesamiento. La primera agrupación comprendió de la muestra de cereza de café hasta las 2 primeras horas de secado, con una similitud de especies cercana al 65%. La segunda agrupación contempló las últimas 2 etapas de procesamiento, la similitud entre ellas fue de alrededor del 93%.

Aproximadamente un 53% de las especies presentes en café verde procedieron desde las cerezas. Este resultado ayuda a explicar el alto porcentaje de infección (70%) por especies de la sección *Nigri* en café verde reportado para esta vía. La contaminación fúngica proviene desde las cerezas, se incrementa durante el tiempo de secado e incide drásticamente en los granos de café.

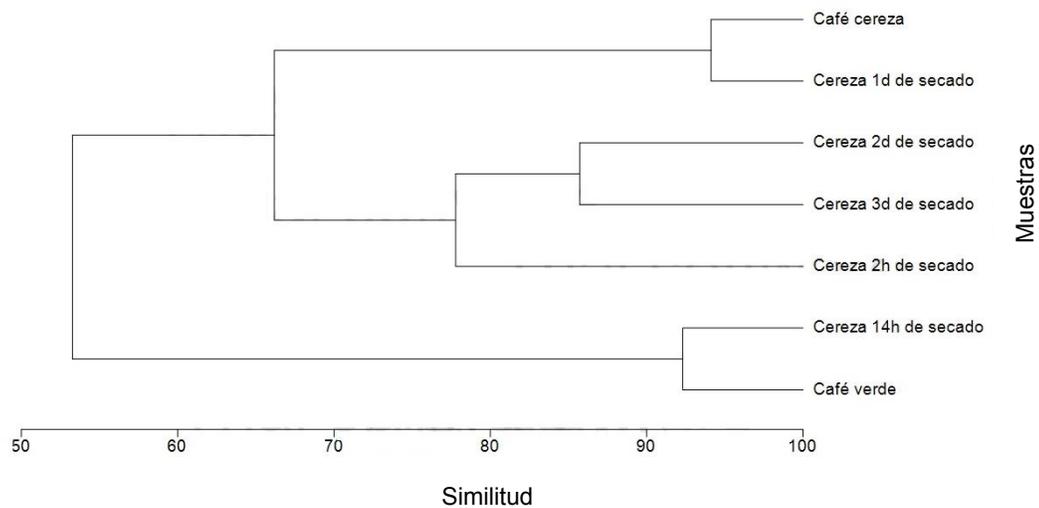


FIGURA 6.33 Análisis de similitud de especies fúngicas de la Vía seca.

7. CONCLUSIONES

De acuerdo al análisis por microbiología clásica las especies de la sección *Nigri* presentan incidencia a partir de la etapa de secado en la vía húmeda fermentativa en ausencia de agua, fermentativa sumergida y mecánica. En la vía seca a partir del segundo día de secado. Por lo cual, los resultados muestran que la etapa de secado es el punto crítico de proliferación por especies de la sección *Nigri*.

Asimismo, este estudio permitió observar que el café procesado por vía húmeda fermentativa sumergida representa el tratamiento más inocuo de procesamiento post-cosecha, debido a que mostró los porcentajes más bajos de infección por especies de la sección de estudio. Por lo tanto, se sugiere emplear primordialmente esta vía de procesamiento para la obtención de granos de café con la mejor calidad sanitaria posible.

Por otra parte, el 72.7% de las cepas aisladas presentó la capacidad de producir OTA, *Aspergillus niger* fue la principal especie ocratoxigénica aislada con una habilidad de producción de hasta 330.41 ng/g de medio. Por consiguiente, los resultados demostraron que las especies de la sección *Nigri* constituyen la principal fuente de producción de OTA en café de México. Por ello, los estudios posteriores de diversidad fúngica asociados a la producción de OTA en café de México deben ser enfocados a las especies pertenecientes a la sección *Nigri*.

En relación al análisis molecular, los perfiles DGGE mostraron baja incidencia de cepas ocratoxigénicas de la sección *Nigri* y únicamente fueron detectadas en las muestras de café verde almacenado de la vía húmeda fermentativa en ausencia de agua, por el contrario, el análisis por microbiología clásica fue capaz de detectar estas especies en las demás vías de procesamiento.

El análisis estadístico de similitud de especies, mostró la influencia que tienen los diferentes procesamientos post-cosecha de café sobre el desarrollo de especies fúngicas durante cada etapa.

Este estudio confirmó nuevamente la idea de que los métodos moleculares deben ser empleados simultáneamente con la microbiología clásica para obtener la mejor aproximación de la diversidad fúngica presente en el proceso post-cosecha de café.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abarca M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G. y Cabañes, F.J. (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 2650-2652.

Abarca, M.L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de micología*, **17**, S79-S84.

Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R. y Cabañes, F.J. (2001). Current importance of ochratoxin A producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food Protection*, **64**, 903-906.

Abarca, M.L., Accensi, F., Cano, J. y Cabañes, F.J. (2004). Taxonomy and significance of black *Aspergilli*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **86**, 33-49.

Al Musallam A. (1980). Revision of the black *Aspergillus* species. Tesis doctoral. Universidad de Utrech. Utrech, Holanda.

Ampe F., N. Ben Omar, C. Moizan, C. Wachter y J.P. Guyot. (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrate the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 5464-5473.

Ampe, F. y Miambi, E. (2000). Cluster analysis, richness and biodiversity indexes derived from denaturing gradient gel electrophoresis fingerprints of bacterial communities demonstrate that traditional maize fermentations are driven by the transformation process. *International Journal of Food Microbiology*, **60** (1), 91-97.

Armando, M. R., Dogi, C. A., Poloni, V., Rosa, C. A. R., Dalcero, A. M. y Cavaglieri, L. R. (2013). In vitro study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*. *International journal of food microbiology*, **161** (3), 182-188.

Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Prado, G., Freitas, R. y Wheals A. E. (2003). Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). *International Journal of Food Microbiology*, **85**, 293– 300

Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Silva, C. F., Cirillo, M., Varga, E. A. y Schwan, R. F. (2009). Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. *Food control*, **20** (9), 784-790.

- Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Languasco, L. Giorni, P. y Kozakiewicz, Z. (2003). Occurrence of Ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection*, **66** (4), 633-636.
- Bayman, P. y Baker, J.L. (2006). Ochratoxins: a global perspective. *Mycopathologia*, **162** (3), 215-223.
- Bigelis, R., y Lasure, L. L. (1987). Fungal enzymes and primary metabolites used in food processing.
- Bove, F. J. (1970). The History of Ergot. In *The Story of Ergot* (pp. 134-165). Karger Publishers.
- Bragulat, M. R., Abarca, M. L. y Cabañes, F. J. (2001). An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*, **71** (2), 139-144.
- Bragulat, M.R., Martínez, E., Castellá, G. y Cabañes, F.J. (2008). Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus *Penicillium* from feedstuffs. *International Journal of Food Microbiology*, **126** (1-2), 43-48.
- Broissin Vargas, L. M., Suárez Quiroz, M. L. y González Ríos, O. (2017). Estudio de la dinámica de poblaciones fúngicas y su impacto en los marcadores de calidad durante el almacenamiento de café verde. Tesis Doctoral, Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.
- Budavari, S., O'Neil, M. J., Smith, A. y Heckelman, P. E. (1989). The Merck Index, Merck & Co. Inc., Rahway, NJ, 104.
- Bullerman, L.B. (1985). Interactive effects of temperature and pH on mycotoxin production. *Lebensmittel - Wissenschaft Technologie*, **18**, 197-200
- Cabañes, F.J., Accensi, F., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castellá, G., Mínguez, S. y Pons, A. (2002). What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology*, **79**, 213-215.
- Cabrera, H. P., Taniwaki, M. H., Menezes, H. C., Iamanaka, B. T. y Salgado, S. A. (2001). Ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee as affected by alternating temperatures and different water activity values. In *19 th ASIC coffee Conference*.

Carlile, M. J., Watkinson, S. C. y Gooday, G. W. (2001). *The fungi*. Gulf Professional Publishing.

Castegnaro, M., Chernozemsky, I.N., Hietanen, E. y Bartsch, H. (1990). Are mycotoxins risk factors for endemic nephropathy and associated urothelial cancers? *Archiv für Geschwulstforschung*, **60** (4), 295-303.

Castegnaro, M., Canadas, D., Vrabcheva, T., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N. y Pfohl-Leszkowicz, A. (2006). Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxins A through biomarkers. *Molecular Nutrition and Food Research*, **50** (6), 519-529.

Chalfoun, S. M. y Carvalho, V.D. (1987). Efecto de microorganismos en la calidad de la bebida de café, *Informe Agropecuario*, Belo Horizonte, **18**, 21-26.

Champion Martínez, E. I., Suárez Quiroz, M. L. y González Ríos, O. (2008). Efecto de las bacterias lácticas aisladas en fermentación del café (*Coffea arabica*) sobre el crecimiento de *Aspergillus ochraceus* y la producción de Ocratoxina A. Tesis de Maestría, Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.

Chang, P. K., Bennett W. y Cotty, P. J. (2001). Association of aflatoxin biosynthesis and sclerotial development in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*, **153**, 41-48, 2001.

Cocolin, L., Bisson, L. F. y Mills, D. A. (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, **189** (1), 81-87.

Cole, R. J. y Cox, R. H. (1981). Handbook of toxic fungul metabolites. New York, Academic Press. 647-669.

Comisión Europea (2006). Reglamento N° 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, 19 de diciembre de 2006.

Dalcero, A., Magnoli, C., Hallak, C., Chiacchiera, S.M., Palacio, G. y Rosa, C.A. (2002). Detection of Ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, **19** (11), 1065- 1072.

Díez, B., Pedrós-Alió, C., Marsh, T. L. y Massana, R. (2001). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and environmental microbiology*, **67** (7), 2942-2951.

Durand, N. (2012). *Dynamique des populations microbiennes au cours du traitement post récolte du café et relations interspécifiques entre souches ochratoxinogènes*. (Doctoral dissertation, Montpellier 2).

Durand, N., El Sheikha, A. F., Suárez-Quiroz, M. L., Oscar, G. R., Nganou, N. D., Fontana-Tachon, A. y Montet, D. (2013). Application of PCR-DGGE to the study of dynamics and biodiversity of yeasts and potentially OTA producing fungi during coffee processing. *Food Control*, **34** (2), 466–471.

Echeverri, D., Buitrago, L., Montes, F., Mejía, I. y González, M. D. P. (2005). Coffee for cardiologists. *Revista Colombiana de Cardiología*, **11** (8), 357-365.

EFSA (2006). European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the Food Chain of the EFSA on a request from the Commission related to ochratoxin A in food. *EFSA Journal*, **365**, 1-56.

Ehrlich, K. C., Yu, J. y Cotty, P. J. (2005). Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *Journal of Applied Microbiology*, **99**, 518–527.

El Khoury, A., Atoui, A., Rizk, T., Lteif, R., Kallassy, M., y Lebrihi, A. (2011). Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from Pure Culture and Aflatoxin-Contaminated Grapes Using PCR-RFLP Analysis of *aflR-aflJ* Intergenic Spacer. *Journal of Food Science*, **76** (4), 247-253.

El Sheikha, A.F., Condur, A., Métayer, I., Le Nguyen, D. D., Loiseau, G. y Montet, D. (2009). Determination of fruit origin by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR–DGGE: preliminary application to *Physalis* fruits from Egypt. *Yeast*, **26** (10), 567-573.

El Sheikha, A.F. y Montet, D. (2011). Determination of fruit origin by using 28S rDNA fingerprinting of fungal communities by PCR-DGGE: an application to *Physalis* fruits from Egypt, Uganda and Colombia. *Fruits*, **66**, 79–89.

- El Sheikha, A. F. y Ray, R. C. (2014). Is PCR-DGGE an innovative molecular tool for the detection of microbial plant pathogens. *Biological controls for preventing food deterioration: strategies for pre-and post-harvest management*. John Wiley & Sons Ltd, 409-433.
- Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: Novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, **56** (3), 297–314.
- Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R. y Cabañes, F.J. (2004). Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black *aspergilli*. *Research in Microbiology*, **155** (10), 861-866.
- Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R. y Cabañes, F.J. (2005). Influence of pH and incubation time on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in culture media. *Journal of Food Protection*, **68** (7), 1435-1440.
- Färber, P. y Geisen, R. (2004). Analysis of differentially-expressed ochratoxin A biosynthesis genes of *Penicillium nordicum*. *European Journal of Plant Pathology*, **110** (5-6), 661-669.
- Fink-Gremmels, J. (2005). Conclusions from the workshops on ochratoxin A in food: recent developments and significance, organized by ILSI Europe in Baden (Austria), 29 June–1 July 2005.
- Follmann, W. y Lucas, S. (2003). Effects of the mycotoxin ochratoxin A in a bacterial and a mammalian in vitro mutagenicity test system. *Archives in Toxicology*, **77** (5), 298-304.
- Frisvad, J.C. y Samson, R.A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, **49**, 1-173.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., y Rossi, P. (2002). Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*, **4** (11), 634-643.
- Gams, W., Christensen, M., Onions, A. H., Pitt, J. I. y Samson, R. A. (1986). Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics* (pp. 55-62). Springer US.

Geisen, R., Mayer, Z., Karolewicz, A. y Färber, P. (2004). Development of a real time PCR system for detection of *Penicillium nordicum* and for monitoring ochratoxin A production in foods by targeting the ochratoxin polyketide synthase gene. *Systematic and Applied Microbiology*, **27**, 501-507.

Glass, N. L., y Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, **61** (4), 1323-1330.

González Salgado, A. (2010). Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de Ocratoxina A. Tesis Doctoral, Madrid, España.

Hamdouche, Y., Meile, J. C., Nganou, D. N., Durand, N., Teyssier, C. y Montet, D. (2016). Discrimination of post-harvest coffee processing methods by microbial ecology analyses. *Food Control*, **65**, 112–120.

Harris, J. P. y Mantle, P. G. (2001). "Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*." *Phytochemistry*. **58**, 709-716.

Hawksworth, D. L. (1976). *Nova plantarum genera*, New introduction. Editorial Richmond, 1976.

Heenan, C.N., Shaw K.J. y Pitt, J.I. (1998). Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A.niger* isolates and detection using coconut cream agar. *Journal of food mycology*, **1**, 67-72.

Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K. y De Vos, P. (1996). Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *Journal of Microbiological Methods*, **26** (3), 247-259.

Höhler, D. (1998). Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. *Zeitschrift Für Ernährungswissenschaft*, **37**, 2–12.

Horie, Y. (1995). Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. *Nippon Kingakukai Kaiho*, **36**, 73-76.

Huff, W. E. y Hamilton, P. B. (1979). Mycotoxins their biosynthesis in fungi: ochratoxins metabolites of combined pathways. *Journal of Food Protection*, **42** (10), 815-820.

IARC (1993). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 56.

ICO Estadísticas 2016. The International Coffee Organization.
http://www.ico.org/ES/trade_statistics.asp?section=Estad%EDstica

JECFA (1991). Ochratoxin A, Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. *WHO Food Additives Series 28*, 365–417.

JECFA (2001). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; 56th Meeting. Génova, Italia.

Jeyaram, K., Singh, W.M., Premarani, T., Devi, A.R., Chanu, K.S., Talukdar, N.C. y Singh, M.R., (2008). Molecular identification of dominant microflora associated with 'Hawaijar' - a traditional fermented soybean (*Glycine max* L.) food of Manipur, India. *International Journal of Food Microbiology*, **122** (3), 259-268.

Joosten, H.M. L. J., Goetz, J., Pittet, A., Schellenberg, M. y Bucheli, P. (2001). Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. *International Journal of Food Microbiology*, **65**, 39–44.

Karolewicz, A. y Geisen, R. (2005). Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of *Penicillium nordicum* and characterization of the ochratoxin polyketide synthase gene. *Systematic and Applied Microbiology*, **28**, 588-595

Kozakiewicz, Z. (1989). *Aspergillus* species on stored products, CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey.

Krogh, P., Hald, B. y Pedersen, E. J. (1973). Occurrence of Ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. *Microbiology and Immunology*, **81**, 689–695.

Kuiper-Goodman, T. y Scott, P.M. (1989). Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and Environmental Sciences*, **2** (3), 179-248.

Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, **33** (7), 1870-1874.

Le-Bars, J. (1988). Toxinogenèse en fonction des conditions écologiques du système grains/microorganismes. *Conservation et Stockage des Grains et Graines et Produits Dérivés. Technique et Documentation Lavoisier*, 376–391.

Lefeber, T., Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N. y De Vuyst, L. (2011). Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Food Microbiology*, **28** (3), 457–464.

Leong, S.L., Hocking, A.D. y Pitt, J.I. (2004). Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* section *Nigri*) on some drying varieties of irrigated grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **10**, 83-88.

Leong, S.L., Hocking, A.D. y Scott, E.S. (2007a). *Aspergillus* species producing ochratoxin A: isolation from vineyard soils and infection of Semillon bunches in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, **102** (1), 124-133.

Leong, S. L., Hien, L. T., An, T. V., Trang, N. T., Hocking, A. D. y Scott, E. S. (2007b). Ochratoxin A-producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans. *Letters in Applied Microbiology*, **45** (3), 301-306.

Levi, C. P., Trenk, H. L. y Mohr, H. K. (1974). Study of occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. *Association of Official Analytical Chemists*. **57**, 866-870.

Lindgren, S. E. y Dobrogosz, W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, **87** (1-2), 149-163.

Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A. y Perrone, G. (2003). Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, **109**, 645-667.

Magalhães, K. T., de Pereira, G. V. M., Dias, D. R. y Schwan, R. F. (2010). Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **26** (7), 1241–1250.

Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G. y Dalcero, A. (2003). Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, **37** (2), 179-184.

Magnoli, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Combina, M., Palacio, G., Rosa, C.A. y Dalcero, A.M. (2004). Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. *Letters in Applied Microbiology*, **39** (4), 326-331.

Mally, A., Keim-Heusler, H., Amberg, A., Kurtz, M., Zepnik, H., Mantle, P., Volkel, W., Hard, G.C. y Dekant, W. (2005). Biotransformation and nephrotoxicity of ochratoxin B in rats. *Toxicological and Applied Pharmacology*, **206** (1), 43-53.

Masoud, W., Cesar, L. B., Jespersen, L. y Jakobsen, M. (2004). Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast*, **21** (7), 549–556.

Masoud, W. y Kalsoft C. H. (2006). The effects of yeast involved in the fermentation of *Coffea Arabica* in East Africa on growth and Ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*, **106** (2), 229-234.

Medina, A., Mateo, R., López-Ocaña, L., Valle-Algarra, F.M. y Jiménez, M. (2005). Study of Spanish grape mycobiota and Ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology*, **71** (8), 4696-4702.

Mühlencoert, E. Mayer, I., Zapf, M.W., Vogel, R.F. y Niessen, L. (2004). Production of Ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. *European Journal of Plant Pathology*, **110**, 651-659.

Muyzer, G., De Waal, E. C. y Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **59** (3), 695–700.

Myers, R. M., Fischer, S. G., Lerman, L. S. y Maniatis, T. (1985). Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-Clamp can be detected by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, **13**, 3131–3145.

Myers R.M., T. Maniatis y L.S. Lerman. (1987). Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel-electrophoresis. *Methods in Enzymology* **155**, 501-527.

Nampoothiri, K. M., Baiju, T. V., Sandhya, C., Sabu, A., Szakacs, G. y Pandey, A. (2004). Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*, **39** (11), 1583–1590.

National Toxicology Program, (1989). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ochratoxin A (CAS No. 303-47-9) in F344/N Rats (Gavage Studies). *National Toxicology Program Technical Report Series*, **358**, 1-142.

Nesterov, V.S. (1951). Etiology, pathogenesis and clinical aspects of alimentary-toxic aleukia (septic angina). *Terapevticheskiĭ Arkhiv*, **23** (1): 88-94.

Nielsen, D. S., Hønholt, S., Tano-Debrah, K. y Jespersen, L. (2005). Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast*, **22** (4), 271–284.

Nielsen, D.S., Teniola, O.D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T.S. y Holzapfel, W.H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, **114**, 168-186.

Nikolausz, M., Sipos, R., Révész, S., Székely, A. y Márialigeti, K. (2005). Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. *FEMS Microbiology Letters*, **244** (2), 385-390.

Nolasco, M. (1985). *Café y sociedad en México* (No. 338.17373 N653C.). Ciudad de México: Centro de Ecodesarrollo.

Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Varga, J., Frisvad, J. C. y Samson, R. A. (2008a). Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58** (7), 1727–1734.

Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C. y Samson, R. A. (2008b). 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.

Northolt, M. D., Egmond, H. P. V. y Paulsch, E. (1979). Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *Journal Food Protection*, **42**, 485–490.

- O'Callaghan, J., Caddick, M.X. y Dobson, A.D.W. (2003). A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology*, **149**, 3485-3491.
- O'Brien, E. y Dietrich, D.R. (2005). Ochratoxin A: the continuing enigma. *Critical Reviews in Toxicology*, **35** (1), 33-60.
- Ominski, K.H., Marquardt, R.R., Sinha, R.N. y Abramson, D. (1994). Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. Mycotoxins in Grain. Ed: Miller, J.D., Trenholm, H.L. Aegan Press, Minnesota, pp. 287-312.
- OMS (1999). Basic Food Safety for Health Workers. *World Health Organization*, 99, Ginebra, Suiza. Pág. 25.
- Panasenko, V. T. (1967). Ecology of microfungi. *The botanical review*, **33**(3), 189-215.
- Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Seng, O., Daniel, H. y Vuyst, L. De. (2013). *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiology*, **35** (2), 73–85.
- Pardo, E., Marin, S., Ramos, A. J. y Sanchis, V. (2004). Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. *Food Science and Technology International*, **10**,45–49.
- Pardo, E., Marín, S., Ramos, J. y Sanchis, V. (2006). Ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* isolates. Predictive models for fungal spoilage prevention-a review. *Food Additives and Contaminants*, **23** (4), 398-410.
- Paster, N., Lisker, N. y Chet, I. (1983). Ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* Wilhelm grown under controlled atmospheres. *Applied and Environmental Microbiology*, **45**, 1136-1139.
- Patterson, M. y Damoglou, A.P. (1986). The effect of water activity and pH on the production of mycotoxins by fungi growing on a bread analogue. *Letters in Applied Microbiology*, **3**, 123-125.
- Paterson, R. R. M., Lima, N., y Taniwaki, M. H. (2014). Coffee, mycotoxins and climate change. *Food Research International*, **61**, 1–15.

Perrone, G., Mulè, G., Susca, A., Battilani, P., Pietri, A. y Logrieco, A. (2006). Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, **72** (1), 680-685.

Pfohl-Leszkowicz, A. y Manderville, R.A. (2007). Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, **51** (1), 61-99.

Pitt, J.I. (1987). *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology*, **53** (2), 266-269.

Pitt, J.I. (1996). What are mycotoxins? *Australian Mycotoxin Newsletter*, 7: 1

Pitt, J.I. y Hocking, A.D. (1997). *Fungi and Food Spoilage* (Vol. II). Academic Press, Sydney, Australia.

Pitt, J.I. (2000). Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology*, **38**, Suppl. 1: 17-22

Pitt, J. I. y Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. III). New York: Springer.

Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H. y Heard, G.M., (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyze the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research*, **4**, 865-877.

Puerta Quintero, G.I. (1998). Calidad en taza de las variedades de *Coffea arabica* L. cultivadas en Colombia. *Cenicafe*, Chinchiná, **49** (4), 265-278.

Ramos, C. L., de Almeida, E. G., Pereira, G. V. de M., Cardoso, P. G., Dias, E. S. y Schwan, R. F. (2010). Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, **140** (2-3), 225-231.

Raper, K.B. y Fennell, D.I. (1965). The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins. Baltimore.

RASFF (2016). Annual Report.

https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2016.pdf

Reysenbach, A. L., Giver, L. J., Wickham, G. S. y Pace, N. R. (1992). Differential Amplification of Ribosomal-RNA Genes by Polymerase Chain-Reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 3417–3418.

Rezende, E. D. F., Borges, J. G., Cirillo, M. Â., Prado, G., Paiva, L. C. y Batista, L. R. (2013). Ochratoxigenic fungi associated with green coffee beans (*Coffea arabica* L.) in conventional and organic cultivation in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, **44** (2), 377-384.

Riba, A., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A. y Sabaou, N. (2008). Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. *International Journal of Food Microbiology*, **122** (1-2), 85-92

Romero, S.M., Patriarca, A., Fernández-Pinto, V. y Vaamonde, G. (2007). Effect of water activity and temperature on growth of ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Argentinean dried vine fruits. *International Journal of Food Microbiology*, **115** (2), 140-143

SAGARPA (2011). Impacto café.

<http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Documents/Cultivos%20Agroindustriales/Impactos%20Caf%C3%A9.pdf>

Samson, R.A. (1979). A compilation of the Aspergilli described since 1965. Centraalbureau Voor Schimmelcultures Baarn. *Studies in Mycology*, 18.

Samson, R. A., Houbraken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A., Frank, J. M. y Frisvad, J. C. (2004a). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, **50** (1), 45–61.

Samson, R. A., Hoekstra, E. S. y Frisvad, J. C. (2004b). Introduction to Food and Airborne Fungi. 7th ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Samson, R. A., Hong, S. B. y Frisvad, J. C. (2006). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*, **44**, S133–S148.

Samson, R. A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J. A. M. P., Frisvad, J. C. y Varga, J. (2007). Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in mycology*, **59**, 129-145.

Schäfer, H. y Muyzer, G. (2001). Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. *Methods in Microbiology*, **30**, 425-468.

Schmidt-Heydt, M., Magan, N. y Geisen, R. (2008). Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiology Letters*, **284** (2), 142-149.

Scott, P. M. (1996). Effects of processing and detoxification treatments on Ochratoxin A: introduction. *Food Additives and Contaminants*, **13**, 19-21.

Serra, R., Mendonça, C. y Venâncio, A. (2006a). Ochratoxin A occurrence and formation in Portuguese wine grapes at various stages of maturation. *International Journal of Food Microbiology*, **111**, S35-S39.

Serra, R., Cabanes, F. J., Perrone, G., Castellá, G., Venâncio, A., Mule, G., y Kozakiewicz, Z. (2006b). *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. *Mycologia*, **98** (2), 295-306.

Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L. S. y Myers, R. M. (1989). Attachment of a 40-base-pair G+ C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **86** (1), 232-236.

Shwab, E. K. y Keller, N. P. (2008). Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycological Research*, **112**, 225-230.

Silva, D. M., Batista, L. R., Rezende, E. F., Fungaro, M. H. P., Sartori, D. y Alves, E. (2011). Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *Nigri* using polyphasic taxonomy. *Brazilian Journal of Microbiology*, **42** (2), 761-773.

Stefanovic, V., Toncheva, D., Atanasova, S. y Polenakovic, M. (2006). Etiology of Balkan endemic nephropathy and associated urothelial cancer. *American Journal of Nephrology*, **26** (1), 1-11.

Stoev, S.D., Paskalev, M., MacDonald, S. y Mantle, P.G. (2002). Experimental one year ochratoxin A toxicosis in pigs. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **53** (6), 481-487.

Suárez Fernández, M. D. R. y Le Borgne, S. (2014). DGGE: Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, SEMARNAT, INECC, UAM-I, 149-174.

Suárez-Quiroz, M. L., González-Ríos, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., y Guiraud, J. P. (2004a). Study of ochratoxin A producing strains in coffee processing. *International Journal of Food Science and Technology*, **39**, 501–507.

Suárez-Quiroz, M. L., González-Ríos, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., y Guiraud, J. P. (2004b). Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. *Food Microbiology*, **21** (6), 629-634.

Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Teixeira, A. A. y Iamanaka, B. T. (2003). 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.

Taniwaki, M. H. (2006). An update on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in coffee. *Advances in food mycology*, 189–202.

Urbano, G. R., Taniwaki, M. H., de F. LEITÃO, M. F. y Vicentini, M. C. (2001). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. *Journal of food protection*, **64** (8), 1226-1230.

Valero, A., Farré, J.R., Sanchis, V., Ramos, A.J. y Marín S. (2006). Kinetics and spatial distribution of OTA in *Aspergillus carbonarius* cultures. *Food Microbiology*, **23** (8), 753-756.

Valero, A., Marín, S., Ramos, A. J. y Sanchis, V. (2007). Effect of preharvest fungicides and interacting fungi on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A synthesis in dehydrating grapes. *Letters in Applied Microbiology*, **45** (2), 194–199.

Van der Merwe, K., Fourie, L., Scott, P. M. y Theron, J. J. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*. **205**, 1112-1113.

Van Egmond, H.P., Schothorst, R.C. y Jonker, M.A. (2007). Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **389** (1), 147-157.

Van Walbeek, W., Scott, P.M., Harwig, J. y Lawrence, J.W. (1969). *Penicillium viridicatum* Westling: a new source of ochratoxin A. *Canadian Journal of Microbiology*, **15** (11), 1281-1285.

Varga, J., Kevei, E., Rinyu, E., Téren, J. y Kozakiewicz, Z. (1996). Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (12), 4461-4464.

Varga, J., Frisvad, J. C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G. y Samson, R. A. (2011). New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, **69**, 1-17.

Velmourougane, K. (2013). Impact of natural fermentation on physicochemical, microbiological and cup quality characteristics of Arabica and Robusta coffee. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, **83** (2), 233-239.

Verma, R. y Chakraborty, D. (2008). Alterations in DNA, RNA and protein contents in liver and kidney of mice treated with ochratoxin and their amelioration by *Embllica officinalis* aqueous extract. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **65** (1), 3-9.

Vilela, D. M., Pereira, G. V. de M., Silva, C. F., Batista, L. R. y Schwan, R. F. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology*, **27** (8), 1128–1135.

Visconti, A., Perrone, G., Cozzi, G. y Solfrizzo, M. (2008). Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. *Food Additives and Contaminants*, **25** (2), 193-202.

Von Witzingerode, F., Göbel, U.B. y Stackenbrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Review*. **21**, 213-229

Walker, R. y Larsen, J.C. (2005). Ochratoxin A: previous risk assessments and issues arising. *Food Additives and Contaminants*, **22**, 6-9.

Wheeler, K. A., Hurdman, B. F. y Pitt, J. I. (1991). Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*, **12** (2), 141-149.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T. y Taylor, J. L. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, **18** (1), 315-322.

ANEXOS**Anexo I. Composición y modo de preparación de medios de cultivo****PDA (Agar de Papa y Dextrosa)**

Agar..... 15 g
Dextrosa..... 20 g
Infusión de papa 4 g
Agua destilada 1000 mL
pH: 5.6 ± 0.2

Método de preparación:

Rehidratar los componentes en un litro de agua destilada. Dejar reposar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolución completa. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C y vaciar de acuerdo a la técnica a seguir en cajas de Petri estériles.

Cuando se acidifica el medio, no sobrecalentar y fundir sólo una vez, para evitar la hidrólisis del agar.

CYA (Agar Czapek Extracto de Levadura)

Agar..... 15 g
Cloruro de potasio 0.5 g
Fosfato dipotásico 1 g
Nitrato de sodio 2 g
Sacarosa..... 30 g
Sulfato ferroso 0.01 g
Sulfato de magnesio 0.5 g
Extracto de levadura..... 5 g
Agua destilada 1000 mL
pH= 7.3 ± 0.2

Método de preparación:

Rehidratar los componentes en un litro de agua destilada. Reposar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición y completa disolución del medio. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C y vaciar en cajas de Petri estériles.

MEA (Agar Extracto de Malta)

Agar..... 15 g
Dextrosa..... 2.75 g
Glicerol..... 2.35 g
Maltosa 12.75 g
Peptona..... 0.78 g
Agua destilada 1000 mL
pH: 4.6 ± 0.2

Método de preparación

Rehidratar los componentes en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolución completa del medio. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. No sobreesterilizar. Enfriar aproximadamente a 45°C y vaciar en cajas de Petri estériles.

Anexo II. Claves taxonómicas para especies de *Aspergillus* sección *Nigri*

(Samson et al., 2004a)

1. <i>A. aculeatus</i>	Conidios mayores a 6 µm de diámetro	3, (5)
2. <i>A. brasiliensis</i>	Conidios con forma espinosa	(3), 5, 6, 8, 9
3. <i>A. carbonarius</i>	Conidios con forma notablemente elipsoidal	(1), 5, (6)
4. <i>A. costaricensis</i>	Ausencia de metúlas	1, 6
5. <i>A. ellipticus</i>		(7), (8), 9, (10), (11),
6. <i>A. japonicus</i>	Metúlas menores a 15 µm de longitud	13, (14), (15)
7. <i>A. foetidus</i>	Producción de esclerocios	(1), (3), 4, (5),
8. <i>A. heteromorphus</i>		(6), 12, 13, (14)
9. <i>A. homomorphus</i>	Esclerocios amarillos a naranja	13
10. <i>A. lacticoffeatus</i>	Esclerocios amarillos a marrón rosáceo	12
11. <i>A. niger</i>	Esclerocios rosáceos a amarillo grisáceo	3
12. <i>A. piperis</i>	Diámetro de las colonias menores a 30 mm a 25 °C en CYA, 7d de incubación	15
13. <i>A. sclerotium</i>	Diámetro de las colonias mayores a 70 mm a 37 °C en CYA, 7d de incubación	2, 7, 10, 11, 12, 14
15. <i>A. tubingensis</i>	Diámetro de las colonias entre 55 y 65 mm a 37 °C en CYA, 7d de incubación	4, 15
16. <i>A. vadensis</i>	Diámetro de las colonias menores a 40 mm a 37 °C en CYA, 7d de incubación	1, 3, 5, 6, 8, 9, 13
	Ausencia de colonias a 37 °C en CYA, 7 d de incubación	(5), 8
	Producción débil o no presente de ácido en agar CREA	(1), (7), 8, 9
	Color de conidios en masa de marrón claro a amarillo oscuro	10, 15
	Color de conidios en masa verde olivo	8, (15)
	Producción de Ocratoxina A	3, 10, (11), 13
	Producción de Piranonigrina A	3, 7, 10, 11, 12, 13, 14
	Producción de una o más nafto-γ-pirononas	2, 3, 4, 7, 11, 12, 13, 14, 15
	Producción de Asparazina	7, 14, 15
	Producción de Ácido secalónico D	1, 9
	Producción de Aflavininas	4, 12, (14)
	Producción de Antafumionisinas	7
	Producción de Lactonas de Corymbiferan / compuestos semejantes a funalenonas	4, 13
	Producción de Kotanina, desmetil-kotanina y / o orlandina	10, (11)
	Producción de Austdiol	5
	Producción de Neoxalina	(1)

Números entre paréntesis: Característica no siempre presente.

Anexo III. Claves taxonómicas para especies del género *Aspergillus* y sus teleomorfos.

(Pitt y Hocking, 2009)

1	Colonias en CYA A 25 y 37 °C que exceden 35 mm de diámetro	2
	Colonias en CYA A 25 o 37 °C que no exceden 35 mm de diámetro	12
2(1)	Colonias negras o grises	3
	Colonias blancas o de color	6
3(2)	Colonias negras, excediendo 50 mm de diámetro a 25 °C	4
	Colonias grises, no excediendo 50 mm de diámetro a 25 °C	<i>A. ustus</i>
4(3)	Vesículas con métulas y fiálides	5
	Vesículas sólo con fiálides	<i>A. aculeatus</i> <i>A. japonicus</i>
5(4)	Conidia menor de 6 µm de diámetro	<i>A. niger</i>
	Conidia mayor 6 µm de diámetro	<i>A. carbonarius</i>
6(2)	Colonias blancas	Género <i>Neosartorya</i>
	Colonias con color	7
7(6)	Colonias azules	<i>A. fumigatus</i>
	Colonias amarillas, verdes o café	8
8(7)	Conidias verde oscuro, cleistotecios presentes, rodeados por células como clamidoconidia (células de Hülle)	Género <i>Emericella</i>
	Conidias amarillas, verdosas o café; no cleistotecios	9
9(8)	Conidias verdosas o amarillas	10
	Conidias café u oliva	11
10(9)	Conidias con paredes delgadas, lisas o finamente rugosas, esféricas o elípticas; vesículas arriba de 50 µm de diámetro, usualmente métulas presente.	<i>A. flavus</i> <i>A. oryzae</i> <i>A. nomius</i>
	Conidias rugosas, pared delgada, esférica; vesículas menores de 30 µm de diámetro; usualmente una baja proporción de cabezas con métulas	<i>A. parasiticus</i>
11(9)	Colonias oliva en CYA y MEA A 25 °C; conidia 5-8 µm de diámetro, pared rugosa; cabeza radiada.	<i>A. tamarii</i>
	Colonias en todos los medios; conidias menores de 3 µm de diámetro, pared lisa; cabezas desarrolladas en forma columnar.	<i>A. terreus</i>
12(1)	Colonias grises	<i>A. ustus</i>
	Colonias blancas o de color	13
13(12)	Colonias blancas o crema	14
	Colonias de color	15

14(13)	Vesículas fértiles sobre el área entera; métulas mayores de 10 μm de largo	<i>A. candidus</i>
	Vesículas fértiles sobre la mitad o dos tercios; métulas menores de 10 μm de largo	<i>A. niveus</i>
15(13)	Cleistotecios amarillos, particularmente en G25N Cleistotecios no presentes	Género <i>Eurotium</i> 16
16(15)	Conidia con sombras amarillas, naranja o café	17
	Conida verde o azul	19
17(16)	Colonia en CYA menores de 40 mm de diámetro; conidias con sombras amarillas o naranja	18
	Colonias en CYA mayores de 40 mm de diámetro; conidia café claro	<i>A. ochraceus</i> <i>A. westerdijkiae</i> <i>A. steynii</i>
18(17)	Colonias naranjas grisáceo, conidia de 2-3 μm de diámetro, pared lisa	<i>A. flavipes</i>
	Colonia amarillo grisáceo a oliva, conidia de 4-5 μm de diámetro, con pared lisa o rugosa	<i>A. wentii</i>
19(16)	Colonias en CYA mayores de 30 mm de diámetro, vesículas mayores de 50 μm de diámetro	<i>A. clavatus</i>
	Colonias en CYA no mayores de 30 mm de diámetro; vesículas menores de 25 μm de diámetro	20
20(19)	Colonias en CYA mayores de 15 mm de diámetro; cabezas con métulas	21
	Colonias en CYA menores de 15 mm de diámetro; cabezas sólo con fialides	22
21(20)	Conidia verde	<i>A. versicolor</i>
	Conidia azul	<i>A. sydowii</i>
22(20)	Colonias en CYA y MEA de 6 mm o más de diámetro; conidia cilíndrica, nacen en columnas	<i>A. restrictus</i>
	Colonias en CYA y MEA no mayores de 6 mm de diámetro; conidia subesfereidal a elipsoidal, nacen en cabezas radiadas.	<i>A. penicillioides</i>