

**EFFECTO DE FACTORES ABIÓTICOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA
BIOSÍNTESIS DE AFLATOXINAS Y OCRATOXINAS EN HONGOS
AISLADOS DE CAFÉ**

ANDREA ALEJANDRA ARRÚA ALVARENGA

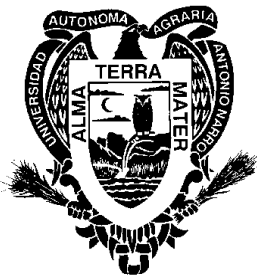
TESIS

Presentada como requisito parcial para

obtener el grado de:

Doctor en Ciencias

en Parasitología Agrícola



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Junio de 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

EFFECTO DE FACTORES ABIÓTICOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA
BIOSÍNTESIS DE AFLATOXINAS Y OCRATOXINAS EN HONGOS AISLADOS
DE CAFÉ
TESIS

POR

ANDREA ALEJANDRA ARRÚA ALVARENGA

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como requisito parcial
para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

EN

PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal:


Dr. Alberto Flores Olivas

Asesor:


Dr. Ernesto Moreno Martínez

Asesor:


Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo

Asesor:


Dr. Manuel Humberto Reyes Valdes

Asesor:


Dr. Gustavo Frías Treviño


Dr. Fernando Ruiz Zárate

Subdirector de Postgrado

Buena Vista, Saltillo, Coahuila, Junio de 2012

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por su apoyo a lo largo de estos 5 años que pasamos separados.

Al Gobierno Mexicano; por otorgarme la oportunidad de realizar mi Doctorado y desarrollarme como profesional y ser humano.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por haberme recibido y brindado la oportunidad de crecer.

Al Departamento de Parasitología Agrícola, por permitirme el uso de sus instalaciones y apoyarme en mis necesidades como estudiante.

Al Dr. Alberto Flores Olivas, por su apoyo, orientación y paciencia. A mi Comité de Asesoría; a mis Maestros que me transmitieron sus conocimientos y apoyaron en mi formación.

Al Dr. Ernesto Moreno Martínez, por la donación de materiales y reactivos, y las facilidades para el uso del laboratorio y equipos a su cargo.

A la Dra. Martha Quezada por orientarme y capacitarme en todo lo referente a aflatoxinas, por su paciencia y amistad.

Al Dr. Edmundo Rodríguez, la M. C. Marisol Cruz Requena, por su apoyo técnico en técnicas de RNA utilizadas en esta tesis.

Al Lic. Biol. Danilo Fernández Ríos, por su amistad y colaboración en la redacción de esta tesis.

DEDICATORIA

A mis amados padres, María Ynés y Vidal, a mis hermanos Patricia y Pablo, a mis sobrinas Ámbar y Zoe, por su apoyo a lo largo de estos 5 años que dejamos de compartir juntos....

Al Dr. Norman Borlaug, el fitopatólogo que me inspiró al estudio del maravilloso mundo de los patógenos

A los microorganismos fitopatógenos, inagotable fuente de conocimiento, emoción, sorpresa y trabajo.

“La ignorancia afirma o niega rotundamente, la ciencia, duda”

Voltaire

“If you desire peace, cultivate justice, but at the same time, cultivate the fields to produce
more bread; otherwise there will be no peace”

Norman Borlaug

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | Pág. |
|------------------------------------------------------------------|-------------|
| INDICE DE CONTENIDO..... | vii |
| INDICE DE TABLAS..... | x |
| INDICE DE FIGURAS..... | xi |
| COMPENDIO..... | xii |
| ABSTRACT..... | xvi |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| OBJETIVOS..... | 4 |
| REVISIÓN DE LITERATURA..... | 5 |
| El género <i>Aspergillus</i> | 5 |
| Características morfológicas del género <i>Aspergillus</i> | 10 |
| <i>Aspergillus</i> Sección <i>Flavi</i> | 11 |
| <i>Aspergillus</i> Sección <i>Nigri</i> | 13 |
| Ciclo de vida de <i>Aspergillus</i> | 15 |
| Micotoxinas..... | 16 |

| | Pág. |
|------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Aflatoxinas..... | 21 |
| Aflatoxinas en café..... | 25 |
| Ocratoxinas..... | 25 |
| Ocratoxinas en café..... | 28 |
| Biosíntesis de micotoxinas..... | 29 |
| Biosíntesis de aflatoxinas..... | 29 |
| Biosíntesis de ocratoxinas..... | 34 |
| Factores determinantes en la producción de micotoxinas de <i>Aspergillus</i> | 36 |
| Factores biológicos..... | 37 |
| Inóculo inicial y organismos asociados..... | 37 |
| Factores físicos..... | 38 |
| Temperatura..... | 38 |
| Luz..... | 40 |
| Actividad del agua..... | 40 |
| Factores químicos..... | 41 |
| pH..... | 41 |
| Gases..... | 43 |
| Agentes antifúngicos..... | 43 |
| Factores nutricionales..... | 43 |
| Reglamentación sobre micotoxinas..... | 44 |

| | Pág. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Detección de micotoxinas..... | 44 |
| Prevención de la contaminación por micotoxinas..... | 46 |
| Agentes antifúngicos..... | 47 |
| Ingeniería genética..... | 48 |
| Control de las condiciones de almacenamiento..... | 48 |
| Detoxificación de alimentos contaminados con micotoxinas..... | 49 |
| <i>Aspergillus</i> aflatoxigénicos: enfoque taxoómico actual | 51 |
| Micobiota asociada a cafés comerciales en Veracruz, México..... | 59 |
| Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying during milling process of coffee (<i>Coffea arabica</i> l.) Beans..... | 65 |
| Regulation of aflatoxin and ochratoxin production of <i>Aspergillus flavus</i> and <i>Aspergillus niger</i> , in relation of pH and water activity..... | 82 |
| Conclusiones..... | 98 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|--------------------------------------------------|-------------|
| Tabla 1. Especies productoras de AF..... | 18 |
| Tabla 2. Especies productoras de OTA..... | 19 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Figura 1. Filograma de la Sección <i>Flavi</i> y especies de <i>Petromyces</i> | 7 |
| Figura 2. Filograma de la Secciones <i>Nidulantes</i> y <i>Ochraceorosei</i> | 8 |
| Figura 3. Filograma de la Sección <i>Circundati</i> | 9 |
| Figura 4. Filograma de la Sección <i>Nigri</i> | 10 |
| Figura 5. Características morfológicas de <i>Aspergillus</i> | 11 |
| Figura 6. Ornamentación de las esporas de <i>Aspergillus</i> Sección <i>Flavi</i> | 13 |
| Figura 7. Morfología de <i>A.</i> Sección <i>Nigri</i> | 14 |
| Figura 8. Estructura química de las AF..... | 22 |
| Figura 9. Estructura tridimensional de AFB ₁ | 22 |
| Figura 10. Estructura química de la OTA..... | 26 |
| Figura 11. Estructura tridimensional de la OTA..... | 27 |
| Figura 12. Ruta de biosíntesis de las AF..... | 30 |
| Figura 13. Ruta de biosíntesis de la OTA..... | 35 |
| Figura 14. Países con y sin reglamentación para micotoxinas..... | 45 |

COMPENDIO

**EFFECTO DE FACTORES ABIÓTICOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA
BIOSÍNTESIS DE AFLATOXINAS Y OCRATOXINAS EN HONGOS AISLADOS
DE CAFÉ**

POR

ANDREA ALEJANDRA ARRÚA ALVARENGA

DOCTORADO EN CIENCIAS

EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, JUNIO DE 2012.

Dr. Alberto Flores Olivas-Asesor-

Palabras clave: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, aflatoxinas, ocratoxinas, café, pH, actividad del agua, genes, biosíntesis.

México es el octavo productor mundial de café; el gasto en hogares en café y derivados es de unos 4000 millones de pesos anualmente. El 90% de la producción está concentrada en Chiapas (38.8%), Veracruz (22.6%), Puebla (17.3%) y Oaxaca (11.4%). Entre los años 2008/9 las exportaciones subieron un 8.6% y las mismas van dirigidas principalmente a USA, Bélgica, Alemania, Japón y Canadá. Los sustratos alimenticios, se encuentran expuestos al ataque de hongos, entre ellos los que producen micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por ciertas especies de hongos, que tienen efectos negativos en la salud del hombre y los animales. Son neuro y nefro tóxicas, oncogénicas y teratogénicas, además, producen daño pulmonar y hepático. Las principales micotoxinas presentes en el cultivo del café son la ocratoxina A (OTA), las aflatoxinas, (AF) y la patulina (PAT). Existen factores que condicionan la producción de micotoxinas, siendo los principales la temperatura y la actividad del agua, tanto para el desarrollo del hongo como para la producción de la toxina, el pH condiciona la respuesta del hongo a estos factores. La síntesis de las AF ha sido bien estudiada y se conocen los genes implicados en su biosíntesis siendo, los más importantes *nor-1*; *ver-1*; *omt-A* y *aflR*. Para las OTA: PKSs. La vía de síntesis de OTA en los *Aspergillus* prácticamente desconocida. En cuanto a los factores que afectan la expresión de esos genes, muy poco se ha estudiado aún. Es por estas razones que se planteó verificar el efecto de los factores abióticos sobre la expresión de genes de la biosíntesis de OTA y AF en hongos del género *Aspergillus* de las Secciones *Flavi* y *Nigri* aislados de café. Se tomaron 25 muestras compuestas de 250 gramos cada una de la cosecha del día de café cereza de dos localidades en el estado de Veracruz, en Teocelo e Ixhuatlán del Café; el primero con manejo convencional, el segundo con manejo orgánico, ambos de la variedad Oro Azteca. Se realizó el proceso de beneficiado húmedo de las mismas y se obtuvieron

micobiotas en las etapas de café cereza, posterior al proceso de fermentación, a los 6 días del proceso de secado, a finalizar el proceso de secado, en café pergamino, oro y tostado; paralelamente se realizaron micobiotas en tres marcas de cafés comerciales reconocidas. Para la identificación se realizó la observación de características morfológicas macro y microscópicas en medios diferenciales. Se calculó la incidencia por medio de la frecuencia absoluta y la densidad relativa de los hongos presentes. Se detectaron hongos de los géneros *Acremonium sp.*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Fusarium spp.*, *Geotrichum sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Rhizopus sp.* y *Stemphillium sp.*. En el café manejado orgánicamente se detectó una mayor incidencia de hongos del género *Aspergillus* lo largo del proceso del beneficio. Los hongos pertenecientes al género *Aspergillus* fueron purificados; por medio de diluciones se realizaron cultivos monospóricos y se procedió a la identificación de los mismos por medio de claves taxonómicas mediante el uso de medios diferenciales a temperaturas pre establecidas. Se pre seleccionaron dos cepas, una de *Aspergillus* Sección *Flavi*, cepa 51, de café oro y la cepa 23 de *Aspergillus* Sección *Nigri*, de café pergamino; se tomó también como testigo una cepa de *Aspergillus flavus*, de referencia proveída por la Unidad de Investigación en Granos y Semillas, UNIGRAS de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM. Se realizó la reconfirmación de la identidad de las cepas pre seleccionadas y posteriormente se caracterizaron molecularmente las rutas de biosíntesis de AF y OTA presentes en las mismas. En la cepa 51 se detectó la presencia de los genes estructurales *nor-1*, *ver-1*, *omt-A* y el activador de la transcripción *aflR*, de la vía de síntesis de las AF. En la cepa 23, se detectó la presencia de los genes *Acarp450* y *AckS9* de la vía de síntesis de las OTA, por lo cual se consideró que las cepas pre seleccionadas son potencialmente productoras de

toxinas. A continuación, se determinaron el efecto del pH y de la actividad del agua sobre la expresión de los genes *aflR* de la biosíntesis de las AF y *Acarp450* de la biosíntesis de las OTA. Los rangos de pH considerados en el experimento variaron de 4.5 a 13.5 para la cepa 51 y de Referencia UNAM y de 4.5 a 11.5 en la cepa 23. A las 72 horas de crecimiento se activó la vía de síntesis de las AF en los testigos, tanto de la cepa Referencia como la 51 de café, a pH 7 y a_w 99 y bajo la condición pH 4.5 y a_w 0.99 en la cepa 51. A partir de las 48 horas de crecimiento se activó la vía de síntesis de las OTA en la cepa de *A. Sección Nigri* pre seleccionada bajo todas las condiciones propuestas en el experimento.

ABSTRACT

**EFFECT OF ABIOTIC FACTORS IN THE EXPRESSION OF GENES FOR THE
BIOSYNTHESIS OF AFLATOXINS AND OCHRATOXIN IN FUNGI ISOLATED
FROM COFFEE**

BY

ANDREA ALEJANDRA ARRUA ALVARENGA

DOCTOR IN SCIENCES

AGRICULTURAL PARASITHOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, JUNE 2012

Dr. Alberto Flores-Olivas-Advisor

Keywords: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, aflatoxins, ochratoxin, coffee, pH, water activity, genes, biosynthesis.

Mexico is the eighth largest producer of coffee, household spending on coffee and derivatives is about 4000 million dollars annually. 90% of production is concentrated in Chiapas (38.8%), Veracruz (22.6%), Puebla (17.3%) and Oaxaca (11.4%). Between 2008/9 exports increased in 8.6% and the same are intended mainly to USA, Belgium, Germany, Japan and Canada. Food substrates are exposed to attack by fungi, including those that produce toxins. Mycotoxins are secondary metabolites produced by certain species of fungi, which have negative effects on human health and animals. Are neuro and nephro toxic, oncogenic, teratogenic, cause lung damage and liver. The main mycotoxins in coffee cultivation are the ochratoxin A (OTA), the aflatoxins (AF) and patuline (PAT). Factors that influence the production of mycotoxins, are temperature and water activity for both fungal growth and for the production of the toxin, the pH affects the response of the fungus to these factors. The synthesis of aflatoxins has been well studied and known genes involved in its biosynthesis being the most important *nor-1*, *ver-1*, *omt-A* and *aflR*; for Ochratoxins: PKSs. The synthesis of OTA in *Aspergillus* is virtually unknown. As for the factors affecting the expression of these genes, very little has been studied yet. It is for these reasons that arose check the effect of abiotic factors on the expression of genes for the production of OTA and AF fungi *Aspergillus* Section *Flavi* and *Nigri* isolated from coffee, for which, 25 composite samples were taken 250 grams each one, of the day's harvest of coffee cherries of two points in the state of Veracruz, Ixhuatlán Teocelo and Coffee, the first with conventional management, the second organic management, both of Aztec Gold. We performed the wet milling process and conducted them in stages micobiotas coffee cherry, after fermentation, after 6 days of the drying process, to terminate the process of drying, parchment, gold and toasted micobiotas were performed in parallel in three coffee

trademarks recognized. To identify the observation was made morphologic features macro and microscopic differential media. The incidence was calculated by means of the absolute frequency and relative density of the fungi present. Fungi were detected in the genera *Acremonium sp.*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Fusarium spp.*, *Geotrichum sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Rhizopus sp.* and *Stemphylium sp.*. In organically managed coffee had a higher incidence of *Aspergillus* fungi during the process of profit. Fungi belonging to the genus *Aspergillus* were purified; by half of dilutions were performed monosporic cultures and we proceeded to the identification of them through taxonomic keys by using differential media at temperatures pre established. Two strains were pre selected, a Section *Flavi* *Aspergillus* strain 51, of green coffee and the strain of *Aspergillus* Section *Nigri* 23, of parchment, also as a witness took a strain of *Aspergillus flavus*, reference provided by the Unidad de Investigación en Granos y Semillas, UNIGRAS National Autonomous University of Mexico, UNAM. Was performed the reconfirmation of the identity of the strains pre selected and subsequently were molecularly characterized biosynthetic routes AF and OTA present in the same. In strain 51 was detected the presence of the structural genes *nor-1*, *ver-1*, *omt-A* and activator of transcription *afIR*, the route of synthesis of the AF. In strain 23, was detected the presence of genes *Acarp450* and *AckS9* of route of synthesis of the OTA, for which it was considered that pre select strains are potentially producing toxins. Were determined the effect of pH and water activity on the expression of genes *afIR* of the biosynthesis of AF and *Acarp450* of the biosynthesis of the OTA. pH ranges considered in the experiment ranged from 4.5 to 13.5 for strain 51 and Reference UNAM and 4.5 to 11.5 in strain 23. At 72 hours of growth was activated synthesis pathway FAs in the witnesses, both of the strain

reference as the 51 of coffee, at pH 7 and a_w 99; and under the condition pH 4.5 and a_w 0.99 in the strain 51. From 48 hours of growth was activated route of synthesis of OTA in strain of *A. Section Nigri* pre selected under all conditions proposed in the experiment.

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos, para los vertebrados y otros grupos de animales. Son sintetizados por ciertos hongos en productos agrícolas expuestos a la infestación fúngica. Su producción es inevitable y depende de diferentes factores ambientales en el campo y/o durante el almacenamiento. Dado su carácter inevitable e imprevisible, la contaminación por micotoxinas plantea un problema especial para la inocuidad de los alimentos. Son neuro y nefro tóxicas, oncogénicas, teratogénicas, producen daño pulmonar y hepático. Representan un problema de salud pública y económico debido a las legislaciones y restricciones que por su presencia se imponen. Las principales micotoxinas presentes en el cultivo del café son las Ocratoxinas (OTA) y Aflatoxinas (AF) (Lopez-Garcia *et al.*, 1999).

Las aflatoxinas se producen en una ruta de biosíntesis compleja, que comprende más de veinte pasos, subsiguientes a la síntesis del primer compuesto intermedio estable, el ácido Norsolínico (Payne y Brown, 1998).

La ruta de biosíntesis de OTA en especies de *Aspergillus* es, por el contrario, muy poco conocida y solamente se ha identificado un gen codificador de una proteína poliketido sintasa PKS, implicado con seguridad en la biosíntesis de OTA en la especie *A. ochraceus*. Posteriormente, han sido descritos dos genes más, pertenecientes a la superfamilia de citocromos P450, con elevada similitud a genes P450 fúngicos implicados en la ruta de biosíntesis de otras micotoxinas, y cuyos niveles de expresión

se correlacionaban positivamente con la producción de OTA, en particular en uno de ellos (*p450-B03*) (O'Callaghan *et al.*, 2003, 2006).

Los factores ambientales más significativos que afectan la síntesis de aflatoxinas y ocratoxinas, son las fuentes de carbono y de nitrógeno, el potencial de hidrógeno (pH), la temperatura, la actividad del agua (a_w) y ciertos metabolitos volátiles de las plantas (Giorni, 2007).

Se ha reportado la presencia de aflatoxinas en café verde (Nakajima *et al.*, 1997; Santos y Vargas, 2002; Martins *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2006); en granos de café secos (Juan *et al.*, 2007); en cafés comerciales tostados (Tsubouchi *et al.*, 1988), siendo cada vez mayor la cantidad de muestras positivas a medida que mejoran los métodos de detección. Cafés de las variedades Robusta y Arábica, de distintos países y regiones geográficas y procesados de manera húmeda o seca han sido reportados como contaminados (López y Soriano, 2007).

Los estudios para demostrar si el tostado destruye la OTA presentan resultados contradictorios; la reducción es heterogénea y mayor cuando más severas son las condiciones de tostado (Blanc *et al.*, 1998; Heilmann *et al.*, 1999; Van der Stegen *et al.*, 2001; Suárez-Quiroz *et al.*, 2005)

Es por estas razones que se propuso estudiar el efecto de factores abióticos sobre la expresión de genes de la producción de OTA y AF en hongos aislados de café. Para lo cual se planteó: Estudiar el efecto del pH y a_w sobre la expresión de genes de la biosíntesis de AF y OTA; Detectar e identificar hongos potencialmente micotoxigénicos

presentes en las etapas del proceso de beneficio húmedo del café; Caracterizar molecularmente las rutas biosintéticas de AF y OTA en las cepas seleccionadas para el estudio; Determinar el efecto del pH sobre la expresión de genes de la biosíntesis de AF y OTA; Determinar el efecto de la a_w sobre la expresión de genes de la biosíntesis de AF y OTA en hongos aislados de café.

El presente trabajo contribuye al conocimiento de la biodiversidad poblacional de *Aspergillus* de las Secciones *Flavi* y *Nigri* aislados de café en México, presentando una caracterización toxigénica y morfológica de los aislamientos de este patógeno, además del efecto del pH y la a_w in vitro sobre cepas seleccionadas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Estudiar el efecto del pH y a_w sobre la expresión de genes de la biosíntesis de AF y OTA en hongos aislados de café.

Objetivos específicos

- Detectar e identificar hongos potencialmente micotoxígenos presentes en las etapas del proceso de beneficio húmedo del café.
- Caracterizar molecularmente las rutas biosintéticas de AF y OT en las cepas seleccionadas para el estudio.
- Determinar el efecto del pH sobre la expresión de genes de la biosíntesis de AF y OT en hongos aislados de café.

- Determinar el efecto de la actividad del agua sobre la expresión de genes de la biosíntesis de AF y OT en hongos aislados de café.

REVISIÓN DE LITERATURA

El género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* es un género grande compuesto por más de 180 especies anamórficas aceptadas que presentan sus telomormos en 9 géneros diferentes. Se subdivide en 7 subgéneros que a su vez se dividen en grupos (Samson y Pitt, 2000; Rodrigues *et al.*, 2007).

La primera y más completa monografía acerca de este género fue escrita en 1965. En ella se reconocían 132 especies y 18 variedades, pero la designación de las especies, no se realizó de manera formal. Se dividieron las especies en 18 grupos informales basándose en el criterio de los autores, sobre las probables relaciones entre los grupos (Raper *et al.*, 1965).

Estos grupos fueron revisados formalmente 42 años después, las especies fueron tipificadas con el objetivo de adaptarla a la línea del Código Internacional de Nomenclatura Botánica (Geiser *et al.*, 2007).

Raper y Fennel, en 1965, describieron 150 taxas en su monografía; en la última compilación realizada y en uso actualmente, se listaron 182. Posteriormente se listaron otras 36 entre los años 1992 y 1999. Hasta el año 2007, se habían descrito aproximadamente 250 especies (Geiser *et al.*, 2007).

Actualmente para la identificación de especies de *Aspergillus* se recomienda el método polifásico, consistente en el uso de características morfológicas, fisiológicas y moleculares. Las características morfológicas pueden variar, al igual que las fisiológicas puesto que no se presentan en todos los aislados de una misma especie. En el caso de las características moleculares, no pueden tomarse como criterio único para el reconocimiento de especies, ya que la línea que separa las mismas no es clara y las mismas son potencialmente capaces de mezclarse entre sí y al mismo tiempo integrarse en un concepto coherente de especie (Geiser *et al.*, 2007).

Nuevas herramientas como la genómica comparativa, pueden ayudar a la taxonomía en el género *Aspergillus* ya que permiten la comparación de datos que permiten el establecimiento de diferencias biológicas entre cepas y especies (Rokas *et al.*, 2007).

El primer paso consiste en la comparación de características morfológicas, tanto macro como micro morfología. Por lo general, esto se combina con características fisiológicas y nutricionales, acompañadas del perfil de metabolitos secundarios, tanto volátiles como no volátiles, enzimas extracelulares, etc. y secuenciamiento de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) (Frisvad *et al.*, 2007).

En un extenso estudio filogenético del género *Aspergillus*, se obtuvieron varios dendrogramas de las diferentes secciones, elaborados a partir de cuatro secuencias genómicas diferentes: β -tubulina, calmodulina, ITS y genes del rADN, y Ácido Ribonucleico (ARN) polimerasa II Figuras 1, 2, 3 y 4 (Peterson, 2008).

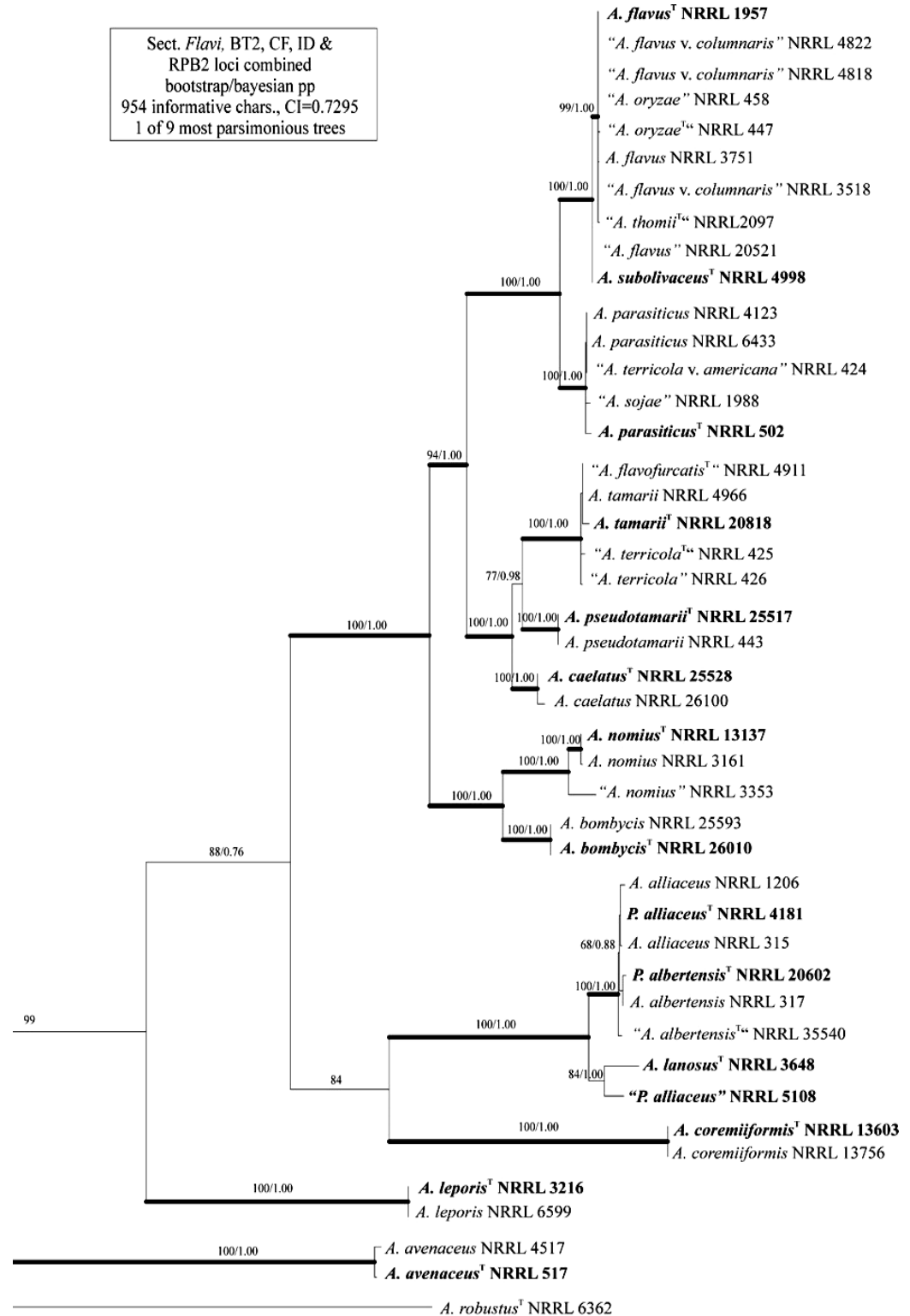


Figura 1. Filograma de la Sección *Flavi* y especies de *Petromyces*. Las especies aflatoxigénicas de mayor impacto para la humanidad se encuentran en esta Sección, *A. flavus* y *A. parasiticus* (Peterson, 2008).

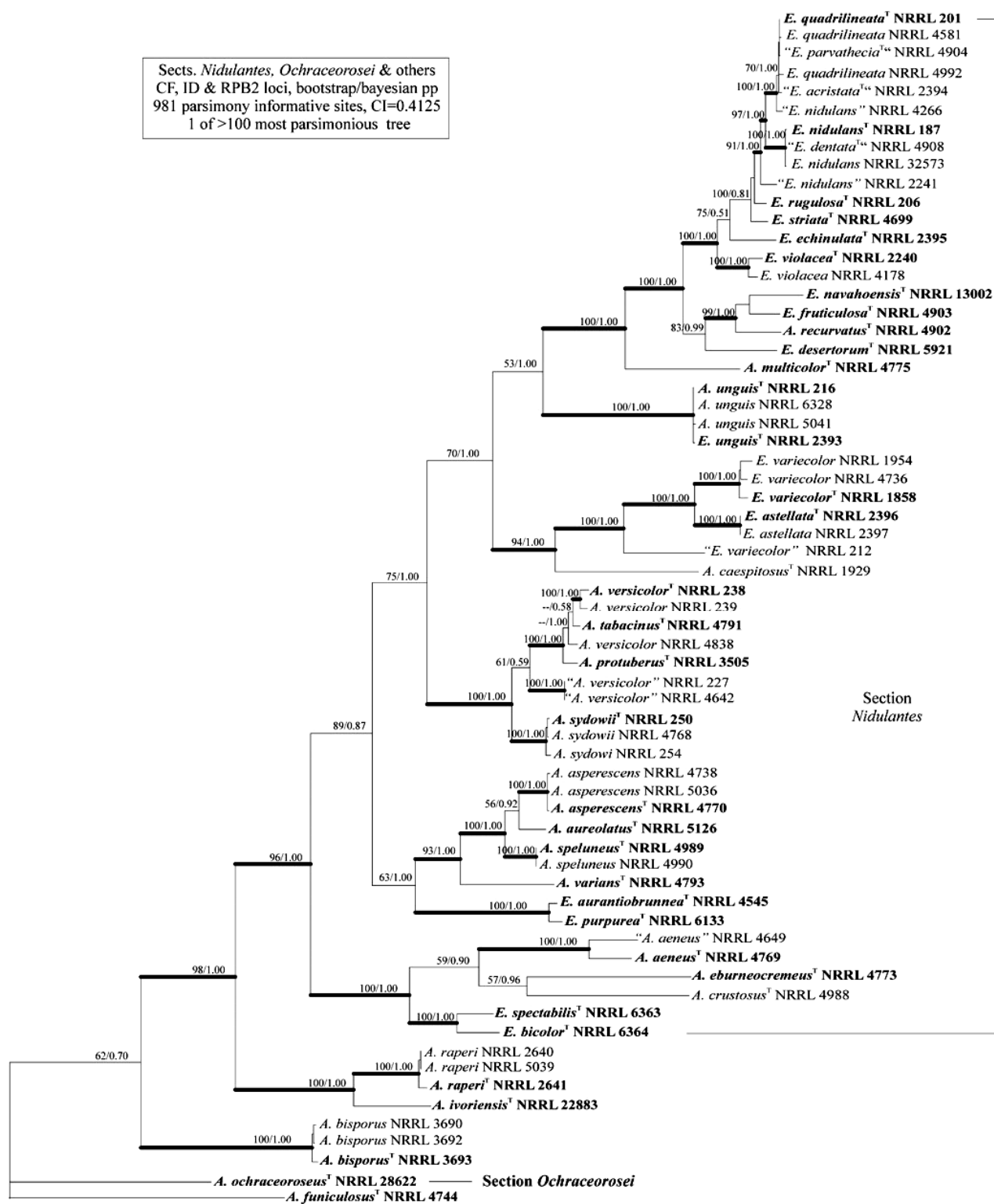


Figura 2. Filograma de la Secciones *Nidulantes* y *Ochraceorosei*, contiene a especies aflatoxigénicas de importancia (Peterson, 2008).

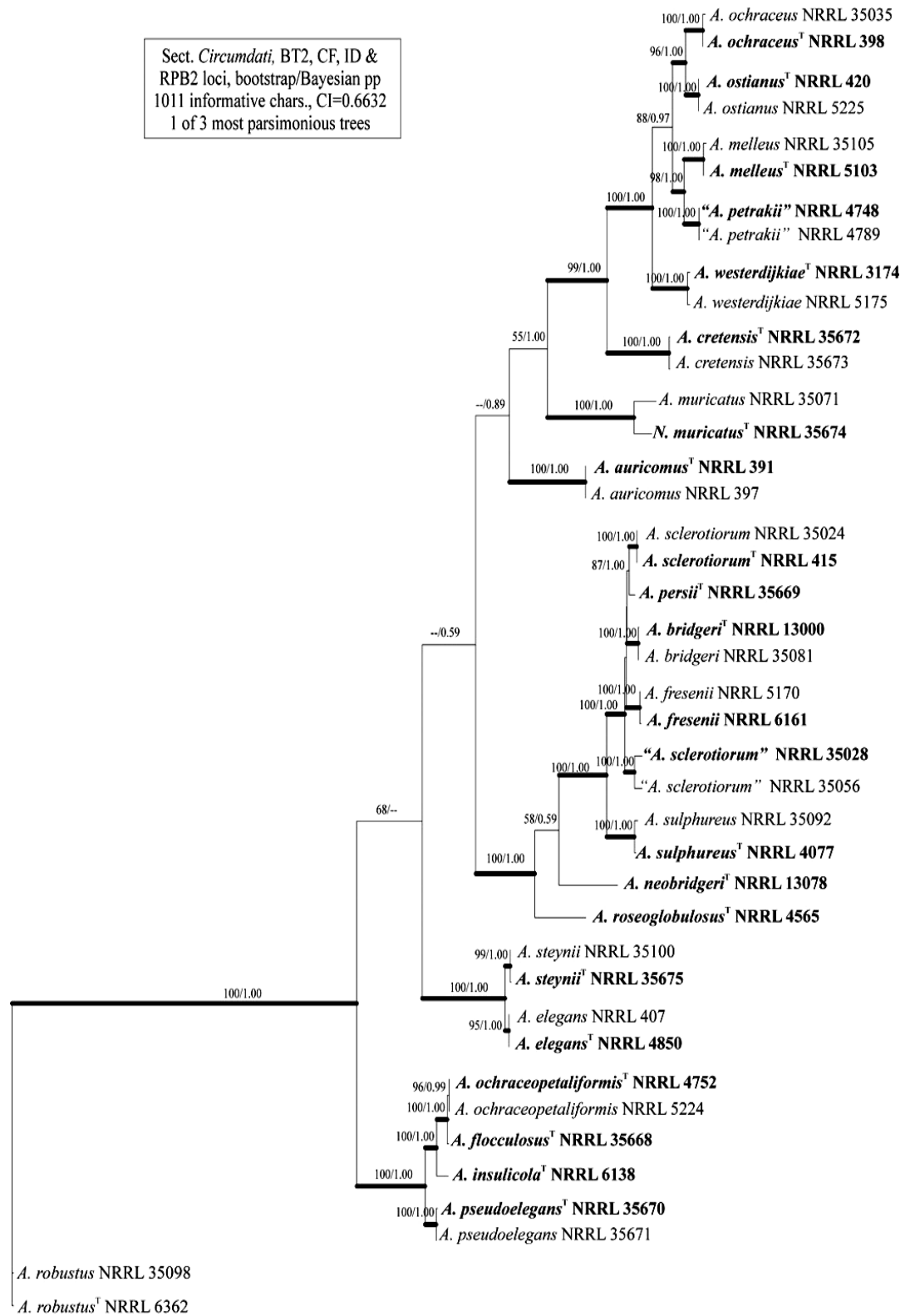


Figura 3. Filograma de la Sección *Circundati*, contiene a especies ocratoxigénicas de importancia (Peterson, 2008).

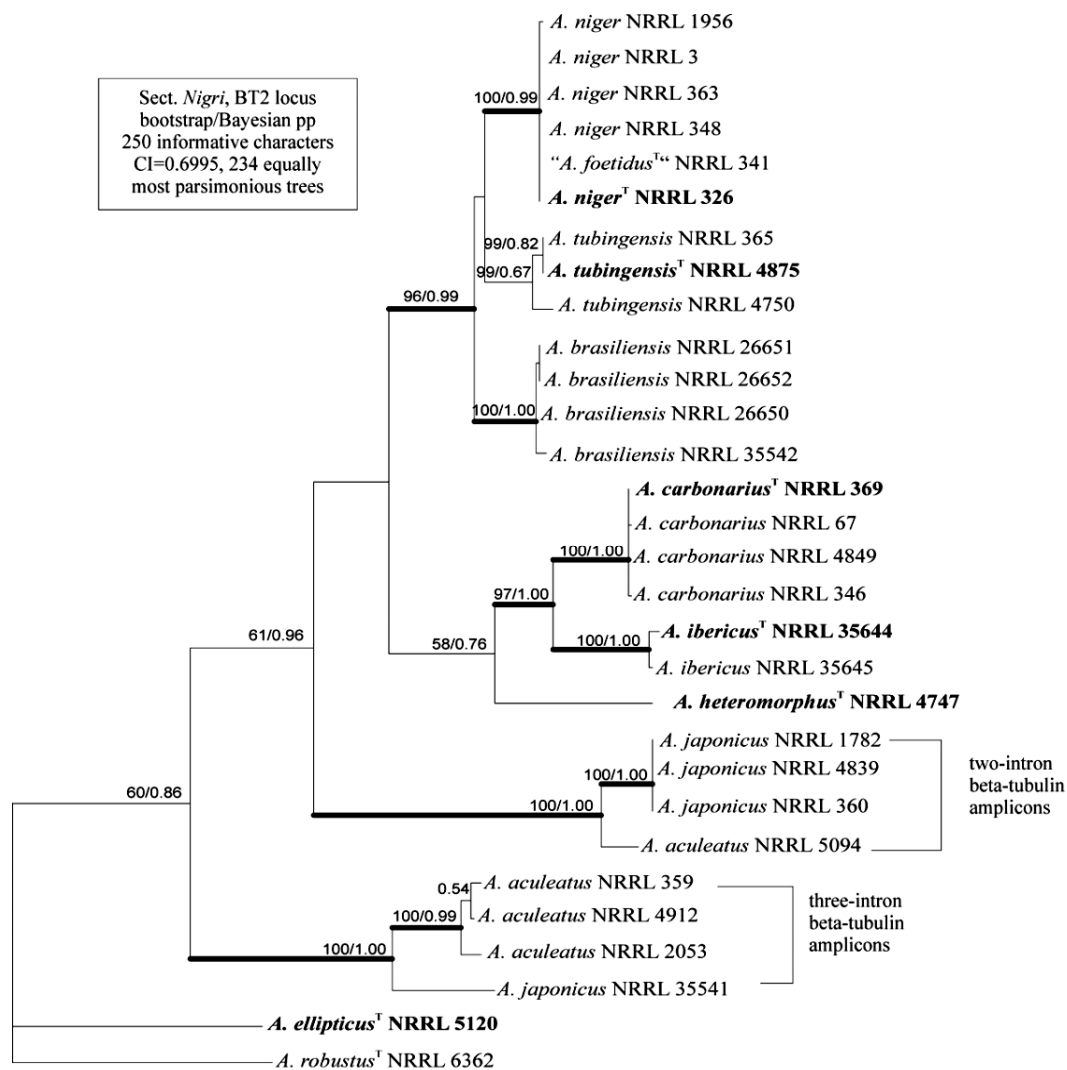


Figura 4. Filograma de la Sección *Nigri*, contiene a especies ocratoxigénicas de importancia (Peterson, 2008).

Características morfológicas del género *Aspergillus*

Aspergillus es un género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas especializadas llamadas conidióforos sobre las cuales se encuentran las células conidiógenas que originan las esporas asexuales o conidias (Abarca, 2000). El conidióforo característico de *Aspergillus*, posee tres partes bien diferenciadas: vesícula, estipe y célula pie. Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas

fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan un seriadas, y las que presentan fiálides y métulas, biseriadas (Figura 5) (Raper *et al.*, 1965; Abarca, 2000; Rodrigues *et al.*, 2007). Gracias a la facilidad de dispersión de sus conidias y a su pequeño tamaño, estos pueden permanecer en suspensión en el ambiente durante un largo periodo de tiempo (Abarca, 2000).

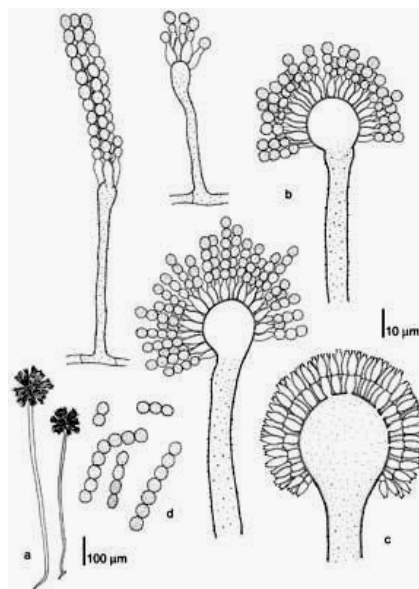


Figura 5. Características morfológicas de *Aspergillus*. (a) Célula pie, vesícula y estipe; (b) Conidióforo monoseriado; (c) Conidióforo biseriado; (d) conidias en cadenas (Crous *et al.*, 2004; Robert *et al.*, 2005).

Aspergillus Sección *Flavi*

Algunas especies de *Aspergillus*, son mitospóricas, entre ellas *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius*, considerados como los principales productores de aflatoxinas (Kurtzman *et al.*, 1987).

Se citan también como productores de aflatoxinas a *Aspergillus pseudotamarii* (Ito *et al.*) y a *Aspergillus bombycis* (Peterson *et al.*) pero esto no ha podido ser confirmado siempre a nivel laboratorial (Peterson *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2001; Cabañes *et al.*, 2007).

La identificación a nivel de género es sencilla, debido a las características de los conidióforos, pero a nivel especie es compleja debido a las similitudes presentes entre estos hongos. Para clasificarlos son utilizadas características macro y microscópicas como: *macroscópicas*: diámetro de las colonias; coloración del anverso y del reverso de las colonias; presencia de esclerocios; presencia de gotas de exudado; presencia de pigmento difusible; textura de las colonias y *microscópicas*: disposición de las métulas o fiálides sobre la vesícula; longitud y anchura de los estipes; forma y diámetro de las vesículas; longitud y anchura de las métulas y fiálides; forma, diámetro, ornamentación y color de las conidias; forma, tamaño y color de las células de Hülle; forma, tamaño y color de las ascosporas (Abarca, 2000; Rodrigues *et al.*, 2007). *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, se encuentran dentro del subgénero *Circundati*, en la sección *Flavi*, que incluye a los hongos no toxigénicos *A. tamarii*, *A. sojae* y *A. orizae*. Pertenecen a los Hyphomycetes, División-Forma Deuteromycota (Abarca, 2000; Rodrigues *et al.*, 2007). La separación de las especies de *A. flavus* y *A. parasiticus* se realiza por la presencia de métulas y fiálides. *A. parasiticus* presenta fiálides uniseriadas mientras que *A. flavus* presenta fiálides uni y biseriadas. Debido a que estas características se presentan muy variables dentro de las especies, actualmente se considera la ornamentación de la conidia como punto principal en la separación (Figura 6) (Rodrigues *et al.*, 2007). Las conidias de *A. flavus* tienen cabezuelas esféricas a elípticas y son finas a moderadamente ásperas,

mientras que *A. parasiticus* presenta cabezuelas mas esféricas y equinuladas a espinosas. La separación de *A. nomius* se complica, porque presenta características morfológicas similares a *A. flavus*, excepto que difiere en la producción de pequeños esclerocios en forma de bala, mientras que los de *A. flavus* son más globosos. Sin embargo no está claro si las cepas de *A. nomius* frescas produzcan esclerocios. La diferencia fundamental entre las tres especies se da en la producción de aflatoxinas B, G y ácido ciclopiazónico (Rodríguez *et al.*, 2007).

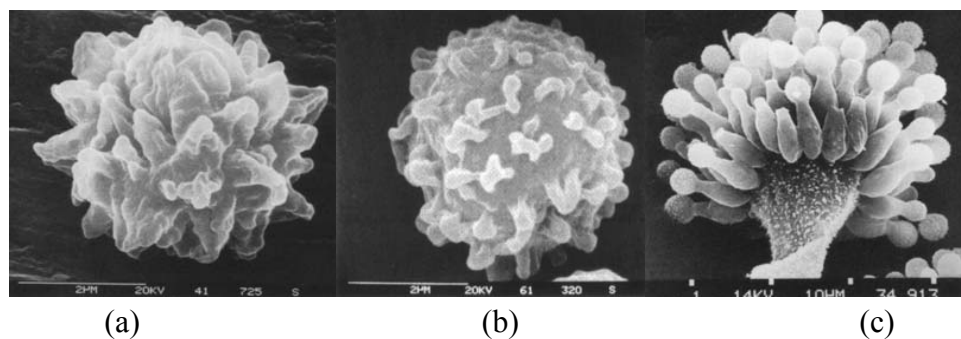


Figura 6. Fotografía al microscopio electrónico donde se muestra la ornamentación de las esporas de (a), *Aspergillus parasiticus*, (b), *Aspergillus flavus*, (c) y la cabezuela conidial de *Aspergillus parasiticus* (Rodríguez *et al.*, 2007).

Aspergillus Sección *Nigri*

Los *Aspergillus* negros u oscuros comprenden a las especies dentro de la Sección *Nigri*, que se encuentran distribuidas mundialmente y que tienen un impacto significativo en la sociedad actual. Varias especies causan deterioro en alimentos, otras son utilizadas en la industria, en procesos de fermentación o en la industria biotecnológica. Se ha reportado la presencia de las especies del complejo *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. japonicus/aculeatus* como frecuentes responsables de pudriciones a

campo y post cosecha en frutas: manzanas, peras, duraznos, cítricos, uvas, higos, berries, tomates, melones, etc. Y en algunos vegetales, especialmente cebollas, ajos y batatas. Además, es el hongo más comúnmente aislado de frutas secas (Perrone *et al.*, 2007). Los *Aspergillus* negros, son uno de los grupos más difíciles de clasificar e identificar, sobre todo debido a la existencia de numerosos métodos propuestos para este fin. Actualmente, se consideran 9 taxas aceptadas (Samson *et al.*, 2007). En 1965 Raper y Fennel, describieron al género colocando las cabezas conidiales negras en un mismo grupo. Fueron aceptadas 12 especies y 2 variedades, distinguiéndose cabezuelas monoseriadas y biseriadas, color de la colonia, ornamentación de las conidias y crecimiento de Czapek. Dentro de las grupo de los monoseriados se encuentran *Aspergillus japonicus* y *Aspergillus aculeatus*. Dentro de los biseriados, *Aspergillus carbonarius* y el agregado de *Aspergillus niger* (Abarca *et al.*, 2004).

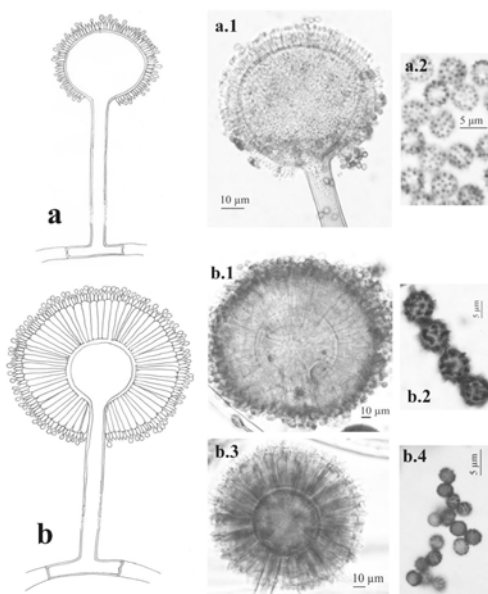


Figura 7. *Aspergillus nigria*. Conidióforo monoseriado; a.1 y a.2, Cabezuela y conidias de *A. japonicus* var. *aculeatus* cepa A-969, UAB Mycology group; . b. Conidióforo biseriado, *A. carbonarius* cepa A-1157, UAB Mycology group; b.1 y b.2 Cabezuela

conidial y conidias de *Aspergillus niger* cepa A-219, UAB Mycology group; b.3 y b.4, cabezuela conidial y conidias (Abarca *et al.*, 2004).

Ciclo de vida de *Aspergillus*

Al ser un hongo del suelo, que se reproduce mediante conidias asexuales, la principal fuente de inóculo es el suelo, pero la estructura predominante de resistencia es desconocida. Se ha sugerido que el hongo sobrevive en conidias, micelio y esclerocios (Diener *et al.*, 1987; Giorni, 2007).

Las conidias son las principales estructuras infectivas, capaces de colonizar a las plantas. *Aspergillus* puede desarrollarse en tejidos vegetales vivos, en descomposición o en restos animales. Su población tanto en la planta como en el suelo, depende de su capacidad de competir con la microbiota presente (Diener *et al.*, 1987; Giorni, 2007). En el maíz, donde el proceso ha sido ampliamente estudiado, los granos se colonizan por *A. flavus*, cuando entra por los estigmas o pelos de la mazorca tierna y penetra a los ovarios como si fuera polen. La contaminación puede continuar y aumentar durante toda la temporada. *Aspergillus flavus* puede invernar en el suelo como micelio, conidias o también puede producir esclerocios, capaces de germinar sobre el suelo (Diener *et al.*, 1987; Giorni, 2007).

Los dos principales factores que influyen en la población de este hongo en el suelo, son la temperatura y la humedad. Bajo condiciones de alta temperatura y baja actividad del agua, *Aspergillus* se vuelve muy competitivo y puede convertirse en una de las especies dominantes de hongos en el suelo. No se conoce la fase sexual de este hongo, pero se asume que la conidia es el inóculo primario (Diener *et al.*, 1987; Giorni, 2007). En cuanto a los *Aspergillus* de la Sección *Nigri*, el hongo, sobrevive en el suelo y

se disemina a temperaturas de 25 a 30°C y con corrientes de aire (Leong *et al.*, 2006a, b). Los *Aspergillus* “negros” poseen esporas negras que son altamente resistentes a los rayos solares. Los *Aspergillus* negros, fueron nombrados como sección *Nigri* debido al color negro de sus esporas, que son altamente resistentes a los rayos solares y a la sequía, aunque la exposición prolongada a estos factores disminuye la viabilidad de las esporas (Leong *et al.*, 2006a, b). La germinación de las esporas es muy rápida, en menos de 24 horas a temperaturas por encima de los 25°C y a_w de entre 0.90 y 0.99 (Mitchell, 2006). Las temperaturas óptimas para su desarrollo varían en un rango de 10 a 37°C; actividad del agua de entre 0.90 y 0.995 son óptimas para su desarrollo (Bellí *et al.*, 2004; Bellí *et al.*, 2006; Leong *et al.*, 2006b). En el caso de las OTA en vinos, las uvas son generalmente secadas por un periodo de tiempo de 7 a 14 días para disminuir su nivel de humedad. Durante este proceso los azúcares se concentran y esto resultando en un medio selectivo para los *Aspergillus* negros. La ocurrencia de lluvias durante el secado, incrementa el riesgo de contaminación por ocratoxinas (Drusch y Ragab, 2003)

Las micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos, para los vertebrados y otros grupos de animales, sintetizados por ciertos hongos en productos agrícolas expuestos a la infestación fúngica. Su producción es inevitable y depende de diferentes factores ambientales en el campo y/o durante el almacenamiento. Dado su carácter inevitable e imprevisible, la contaminación por micotoxinas plantea un problema especial para la inocuidad de los alimentos (Lopez-Garcia *et al.*, 1999). Estos compuestos que se sintetizan cuando la fase de crecimiento llega a su etapa final y durante la fase estacionaria, son a menudo relacionados con la diferenciación y la

esporulación (Goldblatt, 1972). La presencia de estas micotoxinas puede darse en forma individual o simultánea con otras, lo que puede provocar efectos sinérgicos en el organismo, aumentando su toxicidad (Soriano, 2007). La presencia de hongos potencialmente micotoxígenos no indica que el sustrato esté contaminado con micotoxinas. Los requerimientos fisiológicos y nutricionales relacionados a la producción de micotoxinas, son por lo general mucho más específicos que aquellos relacionados con el crecimiento del hongo. Además, en muchas especies, no todos los individuos son capaces de producir toxinas (Soriano, 2007).

Las aflatoxinas y ocratoxinas producidas por hongos del género *Aspergillus*, se consideran micotoxinas mayores o de importancia mundial debido al impacto que presentan en la salud humana y en la economía de una región y / o país (Bennett y Klich, 2003; Fokunang *et al.*, 2006). Cada micotoxina actúa sobre la salud humana y de los animales de una manera diferente. Actualmente se conocen más de 200 hongos productores de micotoxinas, siendo las AF producidas por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, principalmente, consideradas las más tóxicas e importantes desde el punto de vista sanitario (Soriano, 2007). Elevados niveles de micotoxinas presentes en los alimentos pueden causar efectos agudos o crónicos sobre la salud del hombre y los animales, afectando distintos órganos y sistemas (Ruíz y Font, 2007).

A pesar de no ser considerados como importantes hongos fitopatógenos, las especies de *Aspergillus* son responsables de varios desordenes en plantas y alimentos procesados (Perrone *et al.*, 2007). Estos hongos se comportan muchas veces como saprófitos en un amplio rango de sustratos, incluyendo alimentos, semillas, frutas, vegetales, etc. (Barkai-Golan, 1980; Snowdon, 2002). Contribuyen a los procesos de

descomposición de la materia orgánica y algunas especies son patógenas de insectos (Raper *et al.*, 1965). Las especies de *Aspergillus* producen una serie de metabolitos tóxicos, siendo los más importantes los del grupo de las aflatoxinas producidas por hongos de las Secciones *Flavi*, *Nidulantes* y *Ochraceorosei* (Tabla 1) y las Ocratoxinas, producidas por hongos de las Secciones *Nigri* y *Circundati* (Tabla 2).

Tabla 1. Especies productoras de aflatoxinas y micotoxinas relacionadas a la misma vía biosintética.

| Sección | Organismo | Nro. de Accesión al Mycobank | Micotoxinas reportadas | Fuente |
|--------------|--------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Flavi</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | MB 209842 | 3-nitropropionico Ácido; Aflatoxina B ₁ ; Aflatoxina B ₂ ; Aflatoxina B _{2a} ; Aflatoxina G ₁ ; Aflatoxina G ₂ ; Aflatoxina M ₁ ; Aflatrem; Asper toxina; Ácido ciclopiazónico; Gliotoxina; O- Metil-Sterigmatocistina; Sterigmatocistina; Versicolorin A | (Raper <i>et al.</i> , 1965) |
| <i>Flavi</i> | <i>Aspergillus parasiticus</i> | MB 191085 | Aflatoxina B ₁ ; Aflatoxina B ₂ ; Aflatoxina G ₁ ; Aflatoxina G ₂ ; Aflatoxina M ₁ ; O-Metil- Sterigmatocistina; Sterigmatocistina | (Kurtzman <i>et al.</i> , 1987)* |
| <i>Flavi</i> | <i>Aspergillus nomius</i> | MB 133892 | Aflatoxina B ₁ ; Aflatoxina B ₂ ; Aflatoxina G ₁ ; Aflatoxina G ₂ ; | (Peterson <i>et al.</i> , 2001)* |
| <i>Flavi</i> | <i>Aspergillus arachidicola</i> | MB 505189 | Aflatoxina B ₁ ; Aflatoxina B ₂ ; Aflatoxina G ₁ ; Aflatoxina G ₂ ; | (Pildain <i>et al.</i> , 2008) |
| <i>Flavi</i> | <i>Aspergillus minisclerotigenes</i> | MB 505188 | Aflatoxina B ₁ ; Aflatoxina B ₂ ; Aflatoxina G ₁ ; Aflatoxina G ₂ ; Ácido ciclopiazónico; Parasitilicolides; Paspalina; Aflavinina; Aflatrem; Aflavarina; Ácido kójico; | (Pildain <i>et al.</i> , 2008) |
| <i>Flavi</i> | <i>Aspergillus bombycis</i> | MB 474687 | Aflatoxina B ₁ | (Peterson <i>et al.</i> , 2001)* |

Tabla 1 cont.

| | | | | |
|----------------------|---------------------------------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Ochraceorosei</i> | <i>Aspergillus ochraceoroseus</i> | MB 309233 | Aflatoxina B ₁ | Klich <i>et al.</i> , 2003)(Klich <i>et al.</i> , 2003); (Bartoli & Maggi, 1978)* |
| <i>Flavi</i> | <i>Aspergillus pseudotamarii</i> | MB 466527 | Aflatoxina B ₁ ; Ácido ciclopiazónico | (Ito <i>et al.</i> , 2001)* |
| <i>Ochraceorosei</i> | <i>Aspergillus rambellii</i> | MB 501209 | Aflatoxina B ₁ ; Metil-Sterigmatocistina; Sterigmatocistina | (Frisvad <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>Nidulantes</i> | <i>Emericella venezuelensis</i> | MB 368546 | Aflatoxina B ₁ ; Sterigmatocistina; Terreina | (Frisvad & Samson, 2004)* |
| <i>Nidulantes</i> | <i>Emericella astellata</i> | MB110628 | Aflatoxina B ₁ | (Frisvad <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>Nidulantes</i> | <i>Apergillus zhaoqingensis</i> | MB130300 | AflatoxinaB ₁ | (Sun y Qi, 1991) |
| <i>Flavi</i> | <i>Aspergillus parvisclerotigenus</i> | MB500166 | Aflatoxina B ₁ ; Aflatoxina G ₁ ; Ácido ciclopiazónico; Ácido kójico; Ácido aspergílico | (Frisvad <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>Flavi</i> | <i>Aspergillus toxicarius</i> | MB309247 | Aflatoxina B ₁ ; Aflatoxina G ₁ ; Ácido kójico; Ácido aspergílico | (Frisvad <i>et al.</i> , 2005) |

*Listado de metabolitos secundarios por especie, disponible en www.aspergillus.uk/metabolites/list.

Tabla 2. Especies productoras de ocratoxinas y micotoxinas relacionadas a la misma vía biosintética.

| Sección | Organismo | Nro. de Accesión al Mycobank | Micotoxinas reportadas | Fuente |
|-------------------|--------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| <i>Circumdati</i> | <i>Aspergillus affinis</i> | MB 517245 | Ocratoxina A | (Davolos <i>et al.</i> , 2011) |
| <i>Circumdati</i> | <i>Aspergillus albertensis</i> | MB 105069 | Ocratoxina A; Ocratoxina B | (Tewari, 1985) |
| <i>Cirumdati</i> | <i>Aspergillus alliaceus</i> | MB 256402 | Ocratoxina A; Ocratoxina B | (Fennell & Warcup, |

| | | | | |
|-----------------------|-----------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| | | | | 1959) |
| <i>Circumdati</i> | <i>Aspergillus auricomus</i> | MB 119950 | Ocratoxina A; Ocratoxina B | (Hesseltine <i>et al.</i> , 1972) |
| Tabla 2. Cont. | | | | |
| <i>Nigri</i> | <i>Aspergillus carbonarius</i> | MB 100545 | Ocratoxina A; Ocratoxina B | (Abarca <i>et al.</i> , 2004) |
| <i>Nigri</i> | <i>Aspergillus citricus/foetidus</i> | MB 127748 | Ocratoxina A | (Samson <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>Nigri</i> | <i>Aspergillus fonsecaeus</i> | MB 284301 | Ocratoxina A | (Thom, 1945) |
| <i>Circumdati</i> | <i>Aspergillus lanosus</i> | MB 326640 | Ocratoxina A | (Christensen, 1982) |
| <i>Circumdati</i> | <i>Aspergillus melleus</i> | MB164593 | Ocratoxina A; Ácido penicilico; Viomelleina; Xanthomegnina | (Bayman <i>et al.</i> , 2002) |
| <i>Nigri</i> | <i>Aspergillus niger</i> | MB284309 | Ocratoxina A; Asnipyrona A; Asnipyrona B; Austina; Fumonisina B2; Fumonisina B4; Gliotoxina; Malformina C; Malformisina; Nigerapyrona A; Nigerapyrona B; Acido phthioico | (Abarca <i>et al.</i> , 2004)* |
| <i>Circumdati</i> | <i>Aspergillus ochraceopetaliformis</i> | MB292851 | Ocratoxina A; Ocratoxina B; Ácido penicilico | (Batista & Maia, 1957) |
| <i>Circumdati</i> | <i>Aspergillus ochraceus</i> | MB190223 | Ocratoxina A; Ocratoxina B; Ocratoxina C; Ácido penicilico; Ácido secalonico D; Viomelleina; Xanthomegnina | (Harris & Mantle, 2001)* |
| <i>Circumdati</i> | <i>Aspergillus ostianus</i> | MB179393 | Ocratoxina A; Ácido penicilico | (Abarca <i>et al.</i> , 2001)* |
| <i>Circumdati</i> | <i>Aspergillus petrakii</i> | MB292854 | Ocratoxina A | (Hesseltine <i>et al.</i> , 1972) |
| <i>Circumdati</i> | <i>Aspergillus sclerotiorum</i> | MB277707 | Ocratoxina A; Ocratoxina B; Ácido frandulico | (Hesseltine <i>et al.</i> , 1972)* |
| <i>Circumdati</i> | <i>Aspergillus sulphureus</i> | MB255001 | Ocratoxina A; Ocratoxina B; Xanthomegnina | (Abarca <i>et al.</i> , 2001) |

*Listado de metabolitos secundarios por especie, disponible en www.aspergillus.uk/metabolites/list.

Aflatoxinas

Son micotoxinas producidas por los hongos *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. El estudio de las mismas se inicio en 1960, debido a la muerte en Inglaterra de 100.000 pavitos a causa de la que en su momento se llamó enfermedad X del pavo. Esta enfermedad se manifestó con la pérdida de apetito, letargo y debilidad de los animales. Cuando las aves estaban por morir, el cuello se arqueaba, la cabeza se tiraba hacia atrás y las patas quedaban tendidas. Posteriormente se descubrió que la causa de la muerte de las aves se debió a una intoxicación producida por alimento contaminado *A. flavus* presente en pasta de cacahuete importada de Brasil (Butler y Barnes, 1963; Wogan, 1966; Butler, 1969; Rodrigues *et al.*, 2007).

Las aflatoxinas están estructuralmente relacionadas, químicamente son cumarinas sustituidas conteniendo anillos de bifurano y configuración tipo lactona. Son ópticamente activas, fluorescentes bajo luz ultravioleta y sus pesos moleculares varían de 312 a 350 kd; son poco solubles en agua pudiendo ser extraídas con solventes orgánicos moderadamente polares. Cuando se encuentran en estado puros son termo resistentes alcanzando sus puntos de fusión temperaturas superiores a 250°C y se funden entre 190 y 310°C; y rangos de pH entre 3 y 10. Son fotosensibles y tienden a descomponerse cuando están en solución sobre todo acuosa o metanólica. Se descomponen bajo la acción de agentes oxidantes o álcalis fuertes y hipoclorito de sodio. Se han identificado 18 tipos de aflatoxinas de las cuales seis son contaminantes de alimentos: las del grupo B (B₁ y B₂), G (G₁ y G₂) y M (M₁ y M₂). Las aflatoxinas,

pueden localizarse en el micelio de los hongos, en las esporas o ser excretadas como exotoxinas que se liberan en el medio donde crece el hongo (Juan *et al.*, 2007).

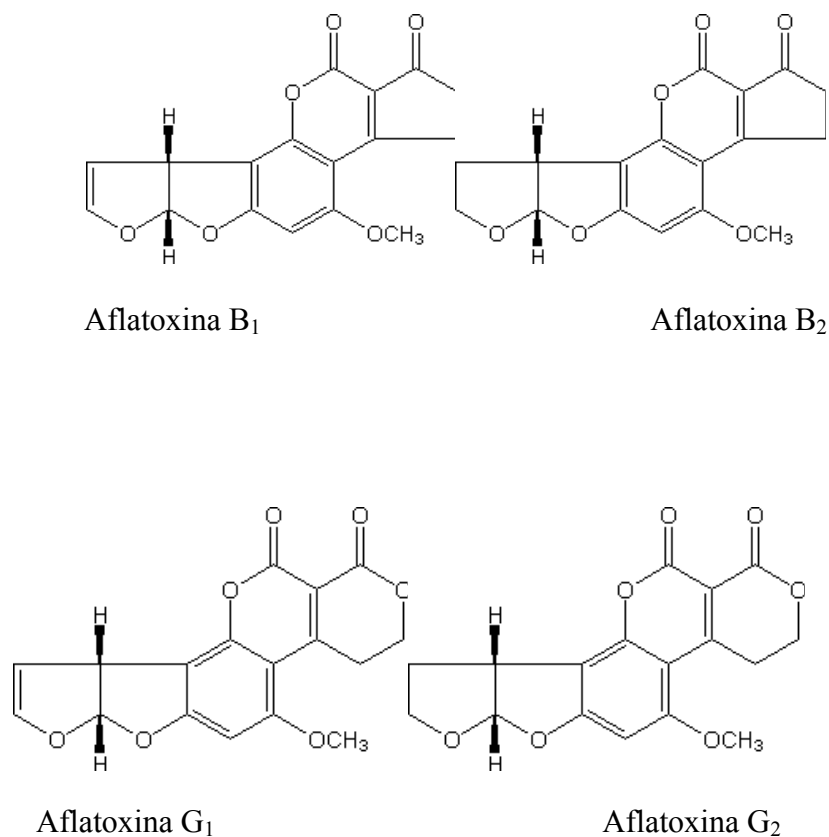


Figura 8. Estructuras químicas de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ (Juan *et al.*, 2007).

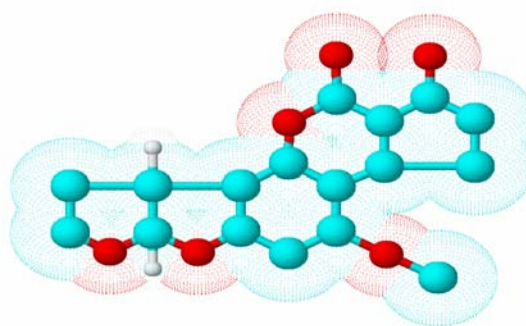


Figura 9. Estructura tridimensional de la AFB₁ (Atherton *et al.*, 2011).

Aspergillus flavus produce únicamente aflatoxinas B₁, B₂ y ácido ciclopiazónico o ambos o ninguna; *A. parasiticus* y *A. nomius*, producen aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂;

A. pseudotamarii, aflatoxinas B₁, B₂ y Ácido ciclopiazónico y a *A. bombycis* aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ (Ito *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2007; Juanet *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha reportado la producción de aflatoxinas de tipo G por cepas identificadas morfológicamente como pertenecientes a *A. flavus* (Vaamonde *et al.*, 2003).

Son las sustancias carcinógenas más potentes hasta ahora conocidas. Son además teratogénicas y mutagénicas. El principal órgano afectado es el hígado, donde producen daño hepático agudo, cirrosis; además inducen tumores, disminución de la eficiencia del sistema inmunitario, afecciones de los pulmones. Se acumulan en los tejidos y se excretan por la leche. La aflatoxina B₁ actúa también sobre el metabolismo de los lípidos y de los glúcidos. Se considera a la aflatoxina B₁ como la de mayor riesgo. La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer IARC, clasifica a las aflatoxinas dentro del grupo 1 en su sistema de clasificación, como agente altamente carcinogénico en humanos (Ruíz y Font, 2007).

Por lo general, la aflatoxina AFB₁ es la que se encuentra en mayores concentraciones, además es la más potente de todas. Cuando los animales ingieren en sus alimentos aflatoxinas B₁ y B₂, en lactancia, las mismas son excretadas por la leche en forma de aflatoxinas M₁ y M₂, formas alteradas pero aun tóxicas. La importancia de las aflatoxinas radica en el riesgo que representan para la salud pública, así como las pérdidas económicas por la baja calidad del grano, limitaciones en las exportaciones, costos de manejo, análisis y eliminación de material contaminado (Soriano, 2007).

La contaminación por aflatoxinas a nivel de campo ha sido reportada en varios países, y es bien conocido que las condiciones ambientales tienen una alta influencia en la dispersión de las esporas del hongo, la penetración y el establecimiento de las hifas en las plantas; además los tratamientos culturales y las condiciones agronómicas tienen una marcada influencia en la síntesis de aflatoxinas, además la presencia de insectos, altas temperaturas y humedad. En la zona centro de México, las condiciones ambientales son especialmente favorables para la síntesis de aflatoxinas en (Bucio-Villalobos *et al.*, 2001).

La habilidad para sintetizar aflatoxinas depende de las diferentes cepas afirman (Baird *et al.*, 2006), utilizando ácidos nucleicos para crear un perfil de diferenciación entre cepas productoras y no productoras de aflatoxinas. La síntesis ocurre en las hifas y conidias. Los máximos niveles de aflatoxinas se pueden hallar en el micelio o biomasa. El nivel de producción declina rápidamente cuando las hifas sufren auto lisis (Varma y Verma, 1987). Las aflatoxinas pueden ser también sintetizadas en esclerocios producidos por el hongo (Wicklow y Cole, 1982).

Datos epidemiológicos implican a la AFB₁ como el compuesto responsable de la ocurrencia de cáncer en humanos en ciertas regiones del mundo. Las aflatoxinas no solamente son carcinogénicas, también son tóxicas (Payne y Brown, 1998).

Las aflatoxinas se producen en una ruta de biosíntesis compleja, que comprende múltiples pasos, siguientes a la síntesis del primer compuesto intermedio estable, el ácido Norsolínico y en la cual hasta ahora han sido identificados 24 genes relacionados. Es un proceso complejo que comprende reacciones multienzimáticas (Payne y Brown,

1998). Los factores ambientales más significativos que afectan la síntesis de aflatoxinas, son las fuentes de carbono y de nitrógeno, el pH, la temperatura, la actividad del agua y ciertos metabolitos volátiles de las plantas (Giorni, 2007).

Las aflatoxinas ingeridas con los alimentos son absorbidas en la mucosa intestinal y pasan al torrente circulatorio, a través del cual llegan al hígado, riñones, canales biliares y sistema nervioso donde se acumulan. En los animales es evidente el daño al hígado y la disminución de la transformación de alimento en carne, huevo o leche. La AFB₁ se considera la aflatoxina más importante, no solo porque aparece con más frecuencia y en más abundancia, sino también porque es la más tóxica. La AFB₁ es absorbida en el intestino delgado y es transportada por los glóbulos rojos y las proteínas hasta el hígado, mayoritariamente por la vía portal. La toxina entra en la célula y es metabolizada en el retículo endoplasmático para ser hidroxilada y transformarse en varios compuestos como aflatoxinas P₁, M₁, Q₁. También puede darse la formación de aflatoxina B₁-8,9-epóxido que puede ser eliminado por la orina (Juan *et al.*, 2007).

Aflatoxinas en café

Se ha reportado la presencia de aflatoxinas en café verde (Nakajima *et al.*, 1997) en granos de café secos (Juan *et al.*, 2007). Se ha sugerido la influencia de la variedad, la localidad y el tiempo de procesamiento en la detección y determinación de aflatoxinas granos de café (Soliman, 2005). La presencia de *Aspergillus* de la Sección *Flavi* representa un riesgo real de contaminación por AF de café y sus derivados, tanto a nivel de campo como en pos cosecha.

Ocratoxinas

En 1965, Van der Merwe y colaboradores, aislaron cepas del hongo *Aspergillusochraceus* en alimentos elaborados a base de maíz contaminado que causó la muerte de ratas, ratones y pavos y consiguieron aislar una micotoxina hasta entonces desconocida a la que denominaron Ocratoxina A (OTA) (Van der Merwe *et al.*, 1965a, b). Cuatro años más tarde, (van Walbeek *et al.*, 1969) aislaron el mismo compuesto de un hongo que erróneamente fue identificado como *Penicillium viridicatum*, ya que esta especie no produce OTA.

La OTA, ha sido encontrada como contaminante en una serie de alimentos, tanto a campo como en postcosecha. Ha sido encontrada en cereales, cacao, café, uvas, vino, chocolate, cerveza, jugos de frutas, alimentos infantiles entre otros (Dirheimer, 1993; López y Soriano, 2007). La producción de OTA a climas fríos se asocia principalmente al género *Penicillium*, mientras que en climas cálidos al género *Aspergillus* (López y Soriano, 2007).

La OTA es la más tóxica dentro del grupo de las ocratoxinas y está formada por una dihidroisocumarina unida por el grupo 7-carboxilo a una molécula de L-β-fenilalanina mediante un enlace amida. Existen varios compuestos análogos a la OTA, como la OTB, la OTC, la OTA α y la OTA β , que difieren de la misma en su estructura y como consecuencia en su toxigenicidad (López y Soriano, 2007).

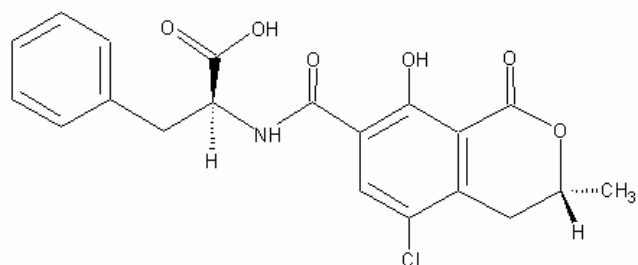


Figura 10. Estructura química de la OTA (Atherton *et al.*, 2011)

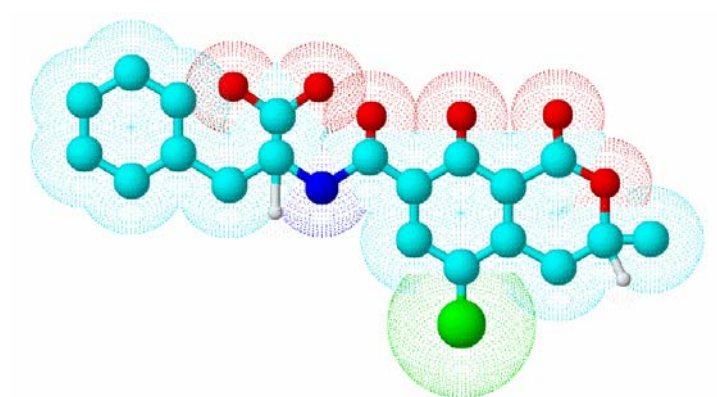


Figura 11. Estructura tridimensional de la OTA (Atherton *et al.*, 2011)

Las ocratoxinas se absorben rápidamente por el tracto gastrointestinal y se eliminan lentamente. Su biodisponibilidad en las especies de mamíferos es superior al 50%. La OTA presenta alta afinidad con las proteínas plasmáticas. Se excreta por las heces y orina y el principal metabolito es la OT- α (López y Soriano, 2007).

La toxicidad aguda de la OTA, es relativamente baja y muestra variaciones interespecíficas. Las especies más sensibles son los perros, cerdos y pollos. Los síntomas de la intoxicación aguda consisten en hemorragias multifocales en los principales órganos y trombos de fibrina en bazo, cerebro, hígado, riñón y corazón; nefrosis, necrosis hepática y del tejido linfoide (López y Soriano, 2007)

Los efectos crónicos de la OTA han sido ampliamente documentados. Está demostrado que produce nefropatía intersticial en animales de granja como pollos y cerdos (López y Soriano, 2007).

En el ser humano se ha relacionado con la nefropatía endémica de los Balcanes, debido a la gran semejanza histopatológica con los síntomas en animales y a la alta exposición de las personas a la OTA en esa región geográfica en comparación con otras. Esta enfermedad se caracteriza por una atrofia tubular y fibrosis peri glomerular entre otros síntomas; se acompaña a veces de tumores malignos muy agresivos en el tracto urinario superior (Krogh, 1992; Dirheimer, 1993; López y Soriano, 2007; Varga *et al.*, 2010). La OTA es también teratogénica, hepatotóxica, neurotóxica e inmunotóxica. Está clasificada como 2B por el IARC, lo que la postula como posible carcinógeno en humanos. En cuanto a los mecanismos de toxicidad, la OTA posee analogía estructural con el aminoácido fenilalanina, por lo cual la toxina inhibe de manera competitiva la tRNA fenilalanina sintetasa y, como consecuencia de ello se interrumpe la síntesis de proteínas (López y Soriano, 2007).

Ocratoxinas en café

Se ha demostrado la presencia de OTA en granos de café verde (Nakajima *et al.*, 1997; Santos y Vargas, 2002; Martins *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2006), en cafés comerciales tostados (Tsubouchi *et al.*, 1988), siendo cada vez mayor la cantidad de muestras positivas a medida que mejoran los métodos de detección.

Cafés de las variedades Robusta y Arábica, de distintos países y regiones geográficas y procesados de manera húmeda o seca han sido reportados como contaminados (López y Soriano, 2007).

Los estudios para demostrar si el tostado destruye la OTA presentan resultados contradictorios; la reducción es heterogénea y mayor cuando más severas son las condiciones de tostado (Blanc *et al.*, 1998; Heilmann *et al.*, 1999; Van der Stegen *et al.*, 2001; Suárez-Quiroz *et al.*, 2005).

Biosíntesis de aflatoxinas y ocratoxinas

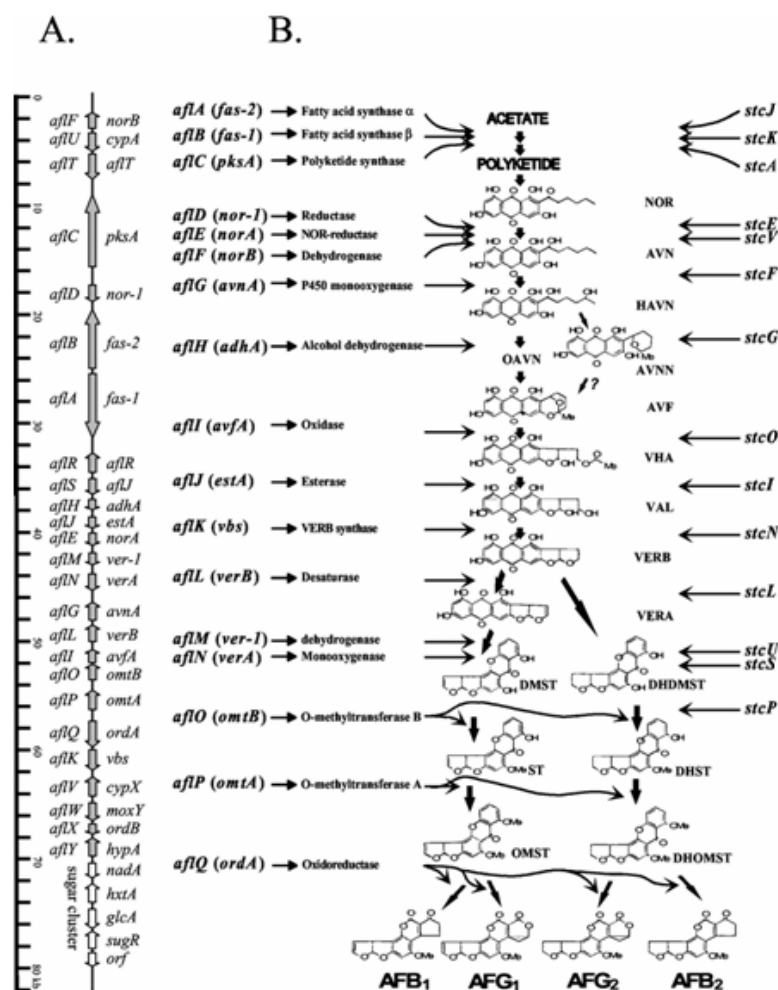
En la actualidad, se sabe que los genes involucrados en la biosíntesis de micotoxinas y otros metabolitos secundarios están frecuentemente organizados formando agrupaciones de genes o “clusters”. Los genes que codifican la síntesis de las enzimas relacionadas a la biosíntesis de aflatoxinas, se encuentran localizados en un cluster de 75kb de un fragmento de ADN.

Biosíntesis de Aflatoxinas

Las aflatoxinas son producidas intracelularmente y luego se excretan (Yabe *et al.*, 1999). Se ha reportado que en *A. parasiticus*, los endosomas juegan un papel fundamental en la síntesis y almacenamiento de las AF (Linz *et al.*, 2011). Se citan 24 genes involucrados en la síntesis, aunque algunos autores suponen que existen más de 26 involucrados en el grupo (Hong y Linz, 2008).

El primer gen de la biosíntesis clonado de *Aspergillus parasiticus* fue *nor-1* (Chang *et al.*, 1992). El nombre de este gen, como el de muchos otros genes en la vía, se

basa en el sustrato convertido por el producto del gen. Los genes nombrados de acuerdo a los sustratos incluyen: *nor-1* (ácido norsolínico [NOR]), *norA* (NOR), *norB* (NOR), *avnA* (averantin [AVN]), *avfA* (averufin [AVF]), *ver-1* (versicolorin A [VERA]), *verA* (VERA), y *verB* (versicolorin B) [VERB]). Otros genes fueron nombrados de acuerdo a sus funciones enzimáticas. Estos incluyen: *fas-2* (FAS sub unidad alfa), *fas-1* (FAS subunidad beta), *pksA* o *pksL1* (PKS), *adhA* (alcohol deshidrogenasa), *estA* (esterasa), *vbs* (VERB sintasa), *dmtA* (mt-I) (O-metiltransferasa I) o *omtB* (O-metiltransferasa B), *omtA* (O- metiltransferasa A), *ordA* (oxidoreductasa A), *cypA* (citocromo P450 monooxigenasa), *cypX* (citocromo P450 monooxigenasa), y *moxY* (monooxigenasa) (Yu *et al.*, 2004). Como ya se ha mencionado, las aflatoxinas son químicamente difuranocumarinas formadas por anillos heterocíclicos donde se relaciona a los furanos con la toxicidad y a la lactona con la fluorescencia de las partículas, además a la susceptibilidad de los compuestos a la hidrólisis alcalina. En su biosíntesis están involucradas la condensación de un acetyl con tres o más unidades de malonil con la pérdida de CO₂ (Buchi y Rae, 1969; Bennett *et al.*, 1979; Lillehoj, 1983; Yu *et al.*, 2002)



metiltransferasas, reductasas, ciclasas, estearasas, etc. Las enzimas implicadas y sus sitios de acción se muestran en la Figura 12. En la biosíntesis de las aflatoxinas están involucrados cuatro genes principales (*afl-R*; *nor-1*; *ver-1*; *omt-1*). Tales genes son responsables de la regulación biosintética de la producción de las mismas, así como otros genes homólogos. La biosíntesis de la aflatoxina B₁, ha sido dilucidada tanto a nivel bioquímico como a nivel genético. Las aflatoxinas son sintetizadas extra mitocondrialmente a partir de la Acetil coenzima A, derivada del catabolismo de carbohidratos simples. Los intermediarios glicolíticos estimulan la producción de aflatoxinas asociadas a la caída de niveles de piruvato y fosfoenol piruvato, los cuales son precursores de tres carbonos del acetato y malonato. En la primera fase de la biosíntesis de estas micotoxinas, el acetato y la malonil CoA, son convertidos a hexanoilo mediante una sintetasa de ácido graso. Este hexanoilo, es extendido por una policetido sintetasa hasta el decacétido ácido norsolorínico, NOR, primer precursor estable en la biosíntesis de las aflatoxinas. El policétido sufre posteriormente de 12 a 17 transformaciones enzimáticas a través de vías intermediarias, que se resumen en la Figura 12; la averantina, AVN; la hidroxiaverantina, HAVN; la averufina, AVF; la hidroxiversicolorina, HVN; el acetato hemiacetal versiconal, VHA; el versiconal, VAL; la versicolorina B, VERB; la versicolorina A, VERA; la dimetil esterigmatocistina, DMST; la esterigmatocistina, ST; la orto-metil esterigmatocistina, OMST, Aflatoxinas, B₁ o B₂; G₁ o G₂, al dividirse la vía en 2 ramas. Mediante estudios genéticos sobre el mecanismo molecular de biosíntesis de la aflatoxina B₁, se ha descrito, un fragmento de 70 pares de kilobases de longitud, conteniendo al menos 24 genes estructurales conocidos, incluyendo un gen de regulación positiva *aflR* como activador de transcripción (Yu *et al.*, 2002). Dichos genes estructurales codifican monooxigenasas del

citocromo P450, deshidrogenasas, oxidasas, metiltransferasas, una poliketido sintetasa y dos sintetasas de ácidos grasos exclusivas. Dos genes de la sintetasa de ácidos grasos (*fas-1* y *fas-2*) y una poliketido sintetasa (*pksA*) participan en la síntesis del decaetido de malonil CoA. Una vez formado, el decaetido cierra del anillo para formar un producto, norantrona que luego debe someterse a la oxidación para formar el primer producto estable, el ácido norsolorínico (NOR) (Yu *et al.*, 2002). En la conversión de norantrona supone involucrada una oxidasa. La conversión de la NOR a la AVN requiere una deshidrogenasa, codificada por el gen *norA* (Yu *et al.*, 2002, 2004) están en el grupo que codifican deshidrogenasas, que también pueden ser capaces llevar a cabo la conversión. Se confirmó más tarde que el próximo intermedio estable es dimetilsterigmatocistina que la citocromo P-450 monooxigenasa codificada por *verA* es necesaria para la conversión de VERA a DMST. Una citocromo P-450 monooxigenasa codificada por el gen *avnA* para la conversión de la AVN a HAVN, mientras que el gen que codifica un alcohol deshidrogenasa, ADHA se consideró esencial para la conversión de HAVN a AVF. El gen que codifica una *avfA* oxidasa es responsable para la conversión de AVF a VHA. El gen *vbs* codifica una deshidratasa que cataliza la cadena lateral de la ciclización VHA a VER (AB). En la última fase de la biosíntesis de la aflatoxina, una orto-metiltransferasa es necesaria para la conversión de la ST orto-metilsterigmatocistina (OMST). El *omtA* fue el primer gen confirmado en la biosíntesis de aflatoxinas. Otro gen que codifica una desmetilasa, llamado *omtB* es necesario para la conversión de DMST a y DHDMST a DHST. El paso final en la formación de aflatoxinas es la conversión de OMST o DHOMST a aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ medidas que requieren la presencia de un NADPH dependientes de una monooxigenasa (ORDA). Otro gen *aflT* codifica una proteína con homología a los

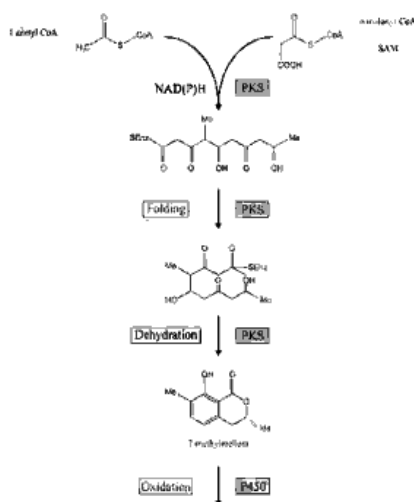
antibióticos. El flujo de proteínas, que podría ser necesario para el transporte de las toxinas a las células del hongo (Chang *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 2002, 2004).

aflR, es el principal regulador en la producción de aflatoxinas dentro de la vía biosintética. La proteína AFLR, se puede unir a la región promotora de cada gen de la producción de aflatoxinas y activar la expresión de genes. En adición a esto el gen *aflR*, posee función de autorregulación. La ausencia de este gen o su presencia anormal, es un fuerte indicador de que la cepa de *Aspergillus* no posee capacidad de sintetizar aflatoxinas (Yu *et al.*, 2002, 2004). *aflR*, tiene como función la de activar la transcripción en la vía. Otro gen relacionado a esto es *aflJ*. Tanto en la biosíntesis de aflatoxinas en *A. parasiticus* como en *A. flavus*, como en *A. nidulans* en el caso de las Esterigmatocistinas, *aflR* es regulador positivo de la transcripción, para la activación de los genes relacionados a la biosíntesis. El producto génico de *aflR* posee un dominio de unión al ADN, proteína polipeptídica binuclear de zinc tipo gal4 de 47 kDa requerida para la activación transcripcional, de la mayoría más no de todos los genes estructurales.

La transcripción de las aflatoxinas puede ser iniciada cuando la proteína AfIR, se une a la secuencia palindrómica 5'- TCGN₅CGA-3' (también llamado motivo de unión) en la región promotora de los genes estructurales. El otro gen envuelto en la regulación de la biosíntesis es *aflJ*, que se encuentra adyacente a *aflR* en el clúster de la biosíntesis de AF. Se ha demostrado que *aflJ* interactúa con *aflR* más no con otros genes estructurales (Chang *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 2002; Chang, 2003; Yu *et al.*, 2004).

Biosíntesis de Ocratoxinas

La ruta biosintética de OTA propuesta por(Huff y Hamilton, 1979), basada en algunos artículos publicados previamente, postula tres distintas etapas en la biosíntesis de OTA. La primera corresponde a la síntesis de un residuo poliquetido de ocratoxina a partir de acetilCoA y malonato. En un primer paso, una enzima poliquetido sintasa inicia la síntesis del residuo poliquetido a través de la vía del acetato-malonato, dando lugar a melleina como intermediario. A continuación, la melleina es metilada y oxidada, dando lugar a ocratoxina β , y una molécula de cloro es incorporada directamente para dar lugar a ocratoxina. En la segunda etapa se sintetiza el otro precursor, la fenilalanina, a partir de ácido shikímico, que se une a su vez a la ocratoxina. Por último, en la tercera etapa, una enzima sintetasa genera ocratoxina C, y una esterasa conduce finalmente a la formación de OTA (Ferreira y Pitout, 1969; Steyn *et al.*, 1970; Harris y Mantle, 2001; López y Soriano, 2007). La organización en un grupo de los genes de la ruta biosintética de OTA fue puesta de manifiesto por primera vez mediante la clonación de una secuencia que contenía tres genes adyacentes, implicados en la biosíntesis de OTA en *P. nordicum* (Karolewicz y Geisen, 2005).



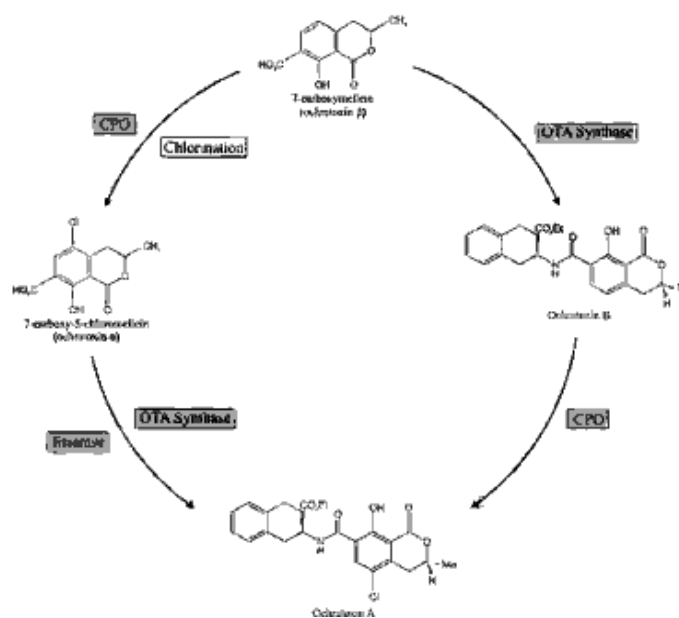


Figura 13. Ruta biosintética de la OTA

La ruta de biosíntesis de OTA en especies de *Aspergillus* es, por el contrario, muy poco conocida y solamente se ha identificado un gen codificador de una proteína poliquetido sintasa PKS, implicado con seguridad en la biosíntesis de OTA en la especie *A. ochraceus*. Posteriormente, han sido descritos dos genes más, pertenecientes a la superfamilia de citocromos P450, con elevada similitud a genes P450 fúngicos implicados en la ruta de biosíntesis de otras micotoxinas, y cuyos niveles de expresión se correlacionaban positivamente con la producción de OTA, en particular en uno de ellos (p450-B03). Sin embargo, su organización en un clúster no estaba confirmada (O'Callaghan *et al.*, 2003, 2006).

Factores determinantes en la producción de micotoxinas de *Aspergillus*

La contaminación por micotoxinas pueda darse a nivel de campo o bien en post cosecha. Los factores que determinan la producción de micotoxinas pueden agruparse de la siguiente manera (Sanchis *et al.*, 2007):

- a) Factores intrínsecos, relacionados con la composición química y las propiedades físicas o biológicas del alimento. Se incluyen la composición de alimento en sí, actividad del agua, pH entre otros.
- b) Factores extrínsecos o propios del ambiente donde se conserva el alimento. Entre estos se incluyen la temperatura de almacenamiento, humedad del ambiente, tensión de oxígeno, composición de la atmósfera de almacenamiento o del envase y la presencia o ausencia de luz.
- c) Factores relacionados a los tratamientos tecnológicos a los que ha estado sometido el producto. Estos tratamientos pueden ser físicos (principalmente térmicos), químicos y biológicos. Los primeros pueden tener efectos letales sobre los microorganismos, los segundos sobre la composición química del alimento.
- d) Factores implícitos, que se refieren a las relaciones de dependencia o competencia entre los diferentes microorganismos que se encuentran en un alimento.

Factores biológicos

Inóculo inicial y organismos asociados

Interacciones fúngicas; las plantas son susceptibles a las infecciones por diferentes hongos micotoxigénicos. La especie dominante está estrictamente relacionada a las condiciones meteorológicas del área o región. Este factor ha sido aprovechado en el

control biológico de estas especies por medio del uso de bacterias, levaduras, hongos y cepas no patogénicas de la misma especie (Wicklow *et al.*, 1980; Diener *et al.*, 1987; Nout, 1989; Cotty, 1994; Giorni, 2007).

Aspergillus es un hongo débil, y es mal competidor con otros hongos que crecen en el mismo sustrato bajo las mismas condiciones ambientales. En la competencia con la microbiota se puede alterar el metabolismo del hongo aflatoxigénico, por competencia por el sustrato o por la alteración de las condiciones ambientales de crecimiento. Lo que puede inhibir la producción de aflatoxinas o crear un efecto sinérgico en su producción (Moreno Martínez y Gutiérrez, 1991).

Insectos y daño al grano; uno de los factores de mayor relevancia en la epidemiología de *Aspergillus* es el daño físico resultado de la actividad de los invertebrados, el daño mecánico producido por la maquinaria agrícola, daño por aves y otros animales, etc. (Diener *et al.*, 1987; Giorni, 2007).

Los insectos pueden contribuir a la infección de 4 maneras: transporte del inóculo primario; movimiento de inóculo entre los granos; diseminación de esporas y propágulos; producción de daño que facilita la colonización de los hongos, proveyendo más sitios de infección y la subsecuente producción de micotoxinas (Mazzani *et al.*, 2004; Giorni, 2007).

Factores Físicos

Estos incluyen a la temperatura, la actividad del agua y la humedad relativa, tanto en campo como en postcosecha. Se han realizado una gran cantidad de estudios relacionados a múltiples combinaciones de temperaturas, actividades del agua, luz y

sustratos sobre cepas de *Aspergillus* de las Secciones *Flavi*, *Circundati* y *Nigri*, por muchos autores a lo largo de más de 40 años de investigación (Schindler *et al.*, 1967; Joffe y Lisker, 1969; Northolt *et al.*, 1976; Bennett *et al.*, 1981; Holmquist *et al.*, 1983).

Temperatura

Las temperaturas óptimas para el desarrollo de *Aspergillus* y la producción de micotoxinas son diferentes. *Aspergillus* tiene la capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas. A bajas temperaturas, las cantidades de AFB y AFG son aproximadamente iguales; a temperaturas más elevadas la producción de AFB es predominante (Moreno, 2004).

Aspergillus flavus y *A. parasiticus* crecen desde un mínimo de temperatura de 10 a 12 a 43°C a 48°C; con un óptimo de entre 32 y 33°C. Las AF se producen a temperaturas de entre 12 y 40°C, siendo el óptimo rango de producción de entre 25 y 30°C (Diener *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 1980; Northolt *et al.*, 1976; Sanchis *et al.*, 2007).

Se ha establecido la influencia de la temperatura sobre la vía de síntesis de las AF; los genes implicados en la biosíntesis de las AF se expresan más a 28°C que a 37°C, pero los genes *aflR* y *aflS* de la vía de síntesis no son afectados en su expresión a los 37°C, lo que indica que la inhabilidad de producir AF por *Aspergillus* a 37°C, no es causada por la no ocurrencia de la transcripción, sino probablemente a que a altas temperaturas *AFLR* no es funcional (OBrian *et al.*, 2007).

Yu *et al.*, 2011, para comprender mejor el efecto de la temperatura sobre la biosíntesis de las micotoxinas, estudiaron el transcrito de *Aspergillus flavus* bajo condiciones de temperaturas diferentes. Este enfoque permitió cuantificarla

abundancia de transcripción de más del 80% de los genes que son expresados diferencialmente a los 30 y 37 °C. En promedio, la abundancia de transcripción para los genes de la biosíntesis de aflatoxina fue 3300 veces mayor a 30 °C que a 37°C. Los resultados son consistentes con la opinión de que las altas temperaturas afectan negativamente a la producción de aflatoxinas bajando la transcripción de los dos principales reguladores de la transcripción, *aflR* y *aflS*.

En el caso de los *Aspergillus ochraceus*, crece a temperaturas de entre 8 y 37°C, con un óptimo de entre 24 y 37°C. La OTA, se produce entre 12 y 37°C, siendo su óptimo de 24 a 31°C. Los *Aspergillus* de la Sección *Nigri*, crecen entre un mínimo de 6 a 8°C y un máximo de 45 a 47°C, con un óptimo de 30 a 37°C (Panasenko, 1967; Sanchis *et al.*, 2007). *Aspergillus carbonarius* crece de 10 a 42°C; la producción de OTA por *Aspergillus carbonarius* es posible entre 8 y 37°C, con un óptimo a 20°C (Sanchis *et al.*, 2007). Otros autores afirman que *Aspergillus carbonarius* produce OTA en CYA en un rango de temperaturas de 15 a 20°C; mientras que *A. niger* de 20 a 25°C a los 30 días de incubación (Esteban *et al.*, 2004).

Luz

Bennett *et al.*, estudiaron el efecto de la luz blanca en la producción de aflatoxinas en PDA no encontrando diferencias significativas entre las cepas contrastadas bajo diferentes tiempos de exposición a la luz (Bennett *et al.*, 1978). Posteriormente los mismos autores estudiaron el efecto de la luz blanca sobre la producción de aflatoxinas, antraquinonas y esclerocios, y determinaron que la luz no tiene efecto sobre la síntesis de aflatoxinas pero que cepas expuestas a luz blanca

continua no produjeron esclerocios (Bennett *et al.*, 1978). Sin embargo otros autores afirman que la luz tiene efecto inhibitorio en la síntesis de aflatoxinas. Indican que en *A. parasiticus* la producción de AF está regulada en respuesta a la luz, pero que en el clúster de genes de las AF no se han determinado los genes responsables de la respuesta en cascada a la luz (Tisch y Schmoll, 2010).

En lo referente a la influencia de la luz en la producción de OT, los resultados son también contradictorios, (Aziz y Moussa, 1997), indican que la producción de OT en *Aspergillus ochraceus* fue considerablemente más alta en la luz que en la obscuridad, mientras que (Bellí *et al.*, 2006) afirman que en *Aspergillus ochraceus* no hubo efecto significativo de la luz sobre la producción de OTA.

Actividad del agua

Tiene un impacto significativo en el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas. El efecto de la actividad del agua está directamente relacionado con la temperatura. La humedad relativa mínima para el desarrollo de hongos aflatoxigénicos es de 85% no existiendo un límite superior de humedad para la producción de estas toxinas. En el caso de los ocratoxigénicos, la humedad necesaria es menor (Moreno Martínez y Gil, 1991; Moreno, 2004).

Aspergillus flavus y *A. parasiticus*, crecen óptimamente a 0.99 de a_w , la mínima para *A. flavus* es específicamente de 0.996 a_w siendo la a_w mínima para su crecimiento de 0.80 a 0.83, aunque se reporta hasta 0.88 para *A. flavus* a 33°C; 0.82 a 25°C, 0.81 a 30°C y 0.80 a 37°C. Las AF, se producen entre 0.95 a 0.99, aunque se han reportado valores de 0.82 de a_w para *A. flavus* (Ayerst, 1969; Pitt y Miscamble, 1995; Sanchis *et al.*, 2007).

Aspergillus ochraceus crece desde valores de 0.77 de a_w y produce OTA a una mínima de 0.80 de a_w . Para *A. carbonarius*, la óptima tanto para crecimiento como para producción de OTA está entre 0.93 a 0.98 de a_w , dependiendo de la cepa (Ramos *et al.*, 1998; Sanchis *et al.*, 2007). *Aspergillus niger* se crece desde 0.77 a_w a 35°C (Pitt y Hocking, 2009).

Factores químicos

pH

Los hongos son capaces de crecer en un amplio rango de pH, normalmente entre 3 y 8, siendo su óptimo de 5. El cambio del valor del pH de un sustrato puede alterar la respuesta del hongo a el resto de los factores. *Aspergillus* tolera mal los valores de pH muy bajos (2-3), y tolera mejor valores de pH alcalinos (Sanchis *et al.*, 2007). Esteban *et al.*, 2006, reportaron cepas de la Sección *Nigri* presentaron crecimiento desde pH 2 a 3 hasta pH 10, en CYA y YES. *A. ochraceus*, se desarrolla bien de pH 3 a 10 y desde valores tan bajos como 2.2 (Blackburn, 2006). La relación entre la producción de AFB₁/AFG₁, es de 3.0 a pH de 3.5 mientras que a pH de 5.5 es de 0.5 se ha encontrado que, por lo general, la expresión de seis genes implicados en la biosíntesis de aflatoxinas es inversamente proporcional al efecto del pH en la acumulación de aflatoxinas (Sanchis *et al.*, 2007).

Aspergillus flavus crece entre un rango de pH de 2.1 a 11.2, a 25, 30 y 37°C, con un crecimiento óptimo en un rango de 3.4 a 10. (Blackburn, 2006). La producción de AFG es más dependiente del pH que la AFB, no produciéndose a valores de pH de 2.5. Se ha establecido mediante QPCR la influencia del pH en la expresión de 6 genes de la

vía de síntesis de las AF, habiéndose encontrado que la expresión que la mayoría de estos genes es inversamente proporcional en la acumulación de AF (Sanchis *et al.*, 2007)

En hongos filamentosos, en el modelo, *Aspergillus nidulans*, la expresión de genes regulados por el pH del ambiente se clasifica en 3 categorías : los que participan en la secreción de enzimas, los que participan en las permeasas de codificación y los que codifican enzimas que participan en la síntesis de metabolitos exportados sea influenciada por el pH del ambiente y probablemente también en aquellos que participan en la homeostasis del pH interno .La regulación del pH es mediada principalmente por siete genes *pacC*, *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH*, y *pali*(Peñalva y Arst, 2002).

Los seis genes *pal* con excepción de *PalB*, donde el análisis de las secuencias de aminoácidos de sus productos da muy pocas pistas de las funciones moleculares, sugiriendo que la vía de señalización es aún novel (Peñalva y Arst, 2002).

Gases

Las especies de *Aspergillus* son aerobias, y a niveles de 1% de oxígeno en el ambiente se detiene su desarrollo y por ende la producción de toxinas. Concentraciones de CO₂ mayores a 20% inhiben la germinación de las esporas. Concentraciones de 10% suprimen la producción de aflatoxinas. Concentraciones de oxígeno menores a 20 y mayores a 90% también inhiben la concentración de aflatoxinas y ocratoxinas (Moreno Martínez y Gil, 1991; Moreno, 2004; Scussel *et al.*, 2010; Magan *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2011).

Agentes antifúngicos

Ácidos orgánicos y sus sales como el ácido propiónico o el sórbico, que son fungistáticos e inhiben el crecimiento de *Aspergillus* y la producción de toxinas. Aceites esenciales de plantas como *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Thymus vulgaris* han mostrado efecto fungistático sobre el hongo *A. flavus* (Moreno, 2004).

Factores nutricionales

La producción de AF y OTA ha sido estudiada con relación a diferentes sustratos en lo referente a fuentes de carbono, nitrógeno, metales, etc. Se ha demostrado la influencia de las fuentes de carbono y nitrógeno en la producción de AF y OT. Se ha descrito que para una determinada cepa de hongo micotoxigénico, la cantidad de toxina producida es función del sustrato. Se ha demostrado que la producción de OTA por *Aspergillus ochraceus* es superior en leguminosas que en cereales; en el mismo hongo se ha demostrado que no existe una influencia significativa entre el sustrato de origen de la cepa y la producción de OTA en medios sintéticos, en YES o en medios con café, cebada o uvas (Sanchis *et al.*, 2007).

Reglamentación sobre micotoxinas

En varias regiones y países del mundo se ha reglamentado el contenido máximo de micotoxinas permitido en alimentos, tanto frescos como procesados. Entre ellos se pueden citar el Reglamento de la Unión Europea que regula el contenido de aflatoxinas en alimentos (C.E, 2006); el reglamento mundial de micotoxinas, que regula el contenido de micotoxinas en alimentos y raciones (Van Egmond y Jonker, 2004), entre otros.

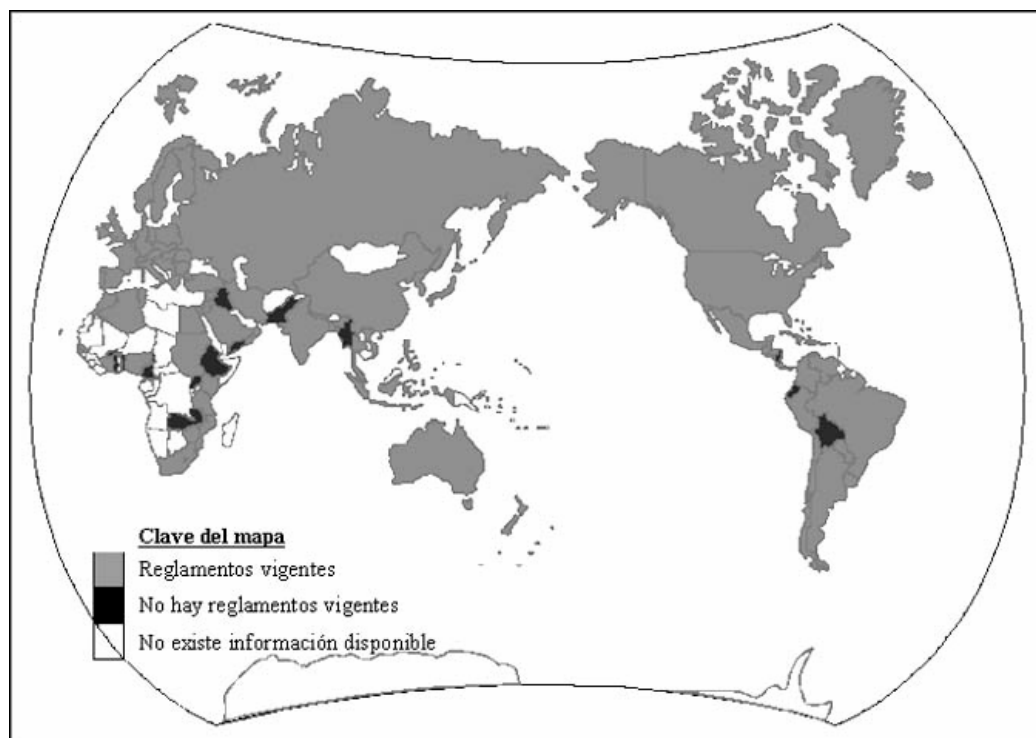


Figura 14. Países con y sin reglamentos para las micotoxinas

Mundialmente, al menos 99 países tenían reglamentos para las micotoxinas en los alimentos y/o en las raciones en el año 2003 (ver la Figura 14), un aumento de aproximadamente 30 por ciento comparado con 1995. La población total en estos países representa aproximadamente 87 por ciento de los habitantes del globo. La Figura 14 muestra la proporción de la población mundial que vive en regiones con reglamentos vigentes para las micotoxinas en 1995 y en el año 2003. En 1995, el 23 por ciento de la población mundial vivía en una región en la que no estaba vigente ningún reglamento conocido para las micotoxinas. Este porcentaje había disminuido al 13 por ciento en el año 2003, en razón de un ligero aumento en América Latina y Europa e incrementos más significativos en África y Asia/Oceanía (Van Egmond y Jonker, 2004).

El último reglamento propuesto por la Unión Europea para contenidos máximos de OTA permitidos en productos alimentarios es del año 2006. En la actualidad, se ha establecido una ingesta semanal tolerable de OTA de 120 ng/kg de peso corporal (C.E, 2006).

Detección de micotoxinas

Los métodos para el análisis de las micotoxinas han ido evolucionando en busca de una mayor precisión en la identificación de estas sustancias en alimentos, tejidos y fluidos orgánicos. En los primeros años que siguieron al descubrimiento de las aflatoxinas el hombre tuvo interés en los métodos rápidos que le permitiera inspeccionar en corto tiempo un gran volumen de granos. Fue así como se publicó el uso de la lámpara ultra violeta para detectar la fluorescencia. Luego surgió la utilización de los anticuerpos monoclonales para la detección rápida de aflatoxinas, en lotes sospechosos que posteriormente podrán ser sometidos al análisis cuantitativo. La cromatografía en capa delgada (TLC) se toma como una herramienta valiosa en el análisis semi cuantitativo o cuantitativo, adoptándose como métodos oficial establecido por la Association of Analytical Chemist hasta llegar hoy en día a métodos más sofisticados como la Cromatografía de Alta Precisión (HPLC) y la Reacción en Cadena de Polimerasas (PCR). Posteriormente comenzaron a utilizarse métodos basados en ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), pero es importante destacar que los ELISA utiliza anticuerpos policlonales que pueden dar "falsos positivos". La importancia de cada uno de estos métodos depende del medio en que se va a aplicar y se distinguen por el grado de sensibilidad en la detección de altas o bajas concentraciones presentes en las muestras problema. Por otra parte, debe considerarse el programa de muestreo por lo que

la FAO invita a tener en cuenta las siguientes consideraciones: La distribución de la concentración de las micotoxinas es un factor importante a considerar cuando se adoptan criterios reglamentarios de muestreo para los productos. La distribución puede ser muy heterogénea, como para las aflatoxinas del maní. La cantidad de granos de maní contaminados en un lote es habitualmente muy baja, pero el nivel de contaminación dentro del grano puede ser muy alto. De no tenerse los debidos cuidados para obtener una muestra representativa, la concentración de las micotoxinas en los lotes inspeccionados puede con facilidad estimarse erróneamente. Además, el consumo de maníes podría llevar a una única dosis accidental alta de aflatoxinas más que a una ingesta crónica a un nivel relativamente bajo (Requena *et al.*, 2005).

Prevención de la contaminación por micotoxinas

Las medidas de control de las micotoxinas son fundamentales y pueden ser clasificadas dentro de las categorías principales: prevención de la contaminación y del crecimiento fúngico y detoxificación de los compuestos tóxicos producidos por los hongos (Requena *et al.*, 2005).

Prevención de la contaminación y el crecimiento fúngico

La prevención de la contaminación por hongos toxigénicos y su crecimiento, puede ser manejada por medio de la mejora de las prácticas agrícolas. Muchas micotoxinas, en particular las aflatoxinas, pueden formarse durante el período de crecimiento de las plantas en el campo. Para prevenir esta contaminación, es necesario que mejoren las prácticas agrícolas, entre otras, usando semillas de calidad y libres de

hongos, impidiendo el ataque de los insectos y las enfermedades de las plantas (Requena *et al.*, 2005; Udagawa, 2005).

Durante el proceso de cosecha es importante que se evite al máximo lesionar físicamente el cereal, pues el daño mecánico está invariablemente asociado con una rápida invasión de hongos. Otro factor importante en el proceso de cosecha es la limpieza de los cereales, pues los residuos que quedan adheridos, pueden ser portadores de especies fúngicas micotoxigénicas. También, para prevenir la contaminación fúngica es importante implantar buenas prácticas de almacenamiento y buenas condiciones ambientales que impidan el ataque de los hongos (Requena *et al.*, 2005; Udagawa, 2005).

Agentes antifúngicos

La contaminación de las cosechas puede ser prevenida o disminuida usando ácidos como el benzoico, sórbico, propiónico, fórmico y acético. Pequeñas concentraciones de estos fungicidas en los alimentos deben ser efectivas a un pH levemente superior al del producto. Por el contrario, la utilización de estos ácidos en bajas concentraciones puede llevar al riesgo de que se produzca un incremento en la capacidad toxigénica de determinados hongos (Bhat y Miller, 1991; Fokunang *et al.*, 2006; Suttajit, 1999)

Ingeniería genética

El genoma de las plantas tiene influencia notable sobre las contaminaciones fúngicas y en la subsecuente biosíntesis de micotoxinas, por eso la importancia de desarrollar nuevas variedades, mediante la ingeniería genética, capaces de

resistir el ataque de los hongos o inhibir la producción de toxinas. El manejo de la llamada “resistencia” o tolerancia a ciertos hongos productores de micotoxinas se dificulta debido a que en muchos casos, como en *Aspergillus* o *Fusarium* la resistencia es poligénica y cuantitativa (Lin *et al.*, 2006; Christians *et al.*, 2011)

Control de las condiciones de almacenamiento

El almacenamiento de las cosechas tiene un papel importante en la calidad físico-química y microbiológica de las mismas. Las especies fúngicas que se desarrollan en un ambiente dado dependen de la humedad, la temperatura, la presencia de microorganismos competidores y de la naturaleza y el estado fisiológico del producto. Estos y otros factores influyen decisivamente en el metabolismo fúngico y en la capacidad para que los hongos utilicen los alimentos para el crecimiento y producción de sus metabolitos (Blackburn, 2006; Fokunang *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2011)

Detoxificación de los alimentos contaminados con micotoxinas

El mejor método para controlar la contaminación de los alimentos por micotoxinas es la prevención, pero cuando el producto ya está contaminado y va a ser usado como alimento, es necesario eliminar o disminuir esta contaminación. Un programa para evitar la producción de micotoxinas incluye la prevención de biosíntesis y metabolismo de toxinas en el campo y en el almacenamiento; la descontaminación después de la producción de micotoxinas se refiere al tratamiento poscosecha para remover, destruir o reducir el efecto tóxico. Es difícil impedir la formación de micotoxinas en el campo o en las bodegas, mientras que el monitoreo puede impedir que las micotoxinas se vuelvan una fuente significativa de riesgos para la salud, pues el

conocimiento de la contaminación permite la adopción de medidas estratégicas para minimizar el riesgo. Las estrategias adoptadas en la pre o poscosecha serán apropiadas y dependerán principalmente de las condiciones climáticas de cada año en particular. El comprender los factores ambientales que promueven la infección, crecimiento y producción tóxica es un paso importante para un plan efectivo que busque minimizar la ocurrencia de micotoxinas en alimentos y en raciones. La FAO estableció una serie de criterios para determinar si el proceso de descontaminación es apropiado o no; dentro de estos se deben tener en cuenta (López *et al.*, 1999; Suttajit, 1999):

- Destruir, inactivar o eliminar la toxina.
- No producir residuos tóxicos o carcinogénicos en los productos finales o en alimentos obtenidos a partir de animales que se alimentaron de una dieta detoxificada.
- Mantener el valor nutritivo y la aceptabilidad del producto.
- No alterar las propiedades tecnológicas importantes de forma significativa.
- Destruir todas las esporas y micelios fúngicos para que no puedan, en condiciones favorables, proliferar y producir nuevas micotoxinas.

***Aspergillus* AFLATOXIGÉNICOS: ENFOQUE TAXONÓMICO ACTUAL**

AFLATOXIGENIC *Aspergillus*: CURRENT TAXONOMIC APPROACH

Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga¹, Ernesto Moreno Martínez², Martha Yolanda Quezada Viay², Josefina Moreno Lara², Mario Ernesto Vázquez Badillo³ y Alberto Flores Olivas¹

1. Dpto. de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro No. 1923, Buenavista, Saltillo, Coah. C.P. 25315. Tel. (844)11-02-26. 3. Dpto. de Semillas, UAAAN. Dpto. de Semillas, UAAAN. 2. Unidad de Investigación en Granos y Semillas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Dr. Jorge Jiménez Cantú S/N, Colonia Atlamica, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, Tel.: (55)58809316. Correspondencia: aflooli@uaaan.mx

RESUMEN

Aspergillus es un género estudiado desde hace siglos debido a sus propiedades industriales, de deterioro y efectos en la salud. Su identificación a nivel de género es relativamente sencilla, pero a nivel de especies se complica debido a las similitudes existentes entre las mismas. Debido a esto, actualmente, los taxónomos recomiendan un enfoque polifásico que comprende no solo características morfológicas, sino también bioquímicas y moleculares. El presente trabajo se realizó con el objetivo de presentar los aspectos básicos concernientes a la identificación polifásica de estas especies.

Palabras clave:*Aspergillus*, identificación, enfoque polifásico

ABSTRACT

Aspergillus is a genus studied for centuries for its industrial properties, deterioration and effects on health. Their identification at the genus level is relatively simple, but at the species level is complicated by the similarities present between them. Because of this, today, taxonomists recommend a polyphasic approach that includes not only morphological but also biochemical and molecular features. This work was carried out during 2010, with the aim of presenting the basic aspects of polyphasic identification of this species.

Keywords:*Aspergillus*, identification, polyphasic approach.

Debido a la presencia de patógenos con potencial micotoxígeno, ocurren año tras año, importantes pérdidas, directas e indirectas, de productos alimentarios, a nivel de campo, de post cosecha y de anaquel, con las consecuentes restricciones en exportación, destrucción de productos contaminados, muerte de animales y en casos extremos de seres humanos. Según FAO (**Food and Agriculture Organization** of the United Nations), las pérdidas mundiales de

productos alimenticios debidas a micotoxinas son del orden de 1000 millones de toneladas al año (AGNS, 2010). Dentro de las micotoxinas, se destacan las aflatoxinas (AF) por su toxicidad y potencial cancerígeno. Por estas razones el estudio de los hongos aflatoxígenos adquiere cada vez mayor importancia. Es imperioso adquirir herramientas para la correcta identificación de los mismos, dado el riesgo que su presencia implica.

***Aspergillus* y aflatoxinas**

Aspergillus se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, pudiéndose aislar de una extensa gama de sustratos; ha sido estudiado desde hace siglos debido a sus propiedades industriales, de deterioro, biotecnológicas y efectos negativos en la salud humana y animal. La identificación a nivel de género es sencilla mediante características morfológicas; sin embargo a nivel de especies se complica. La taxonomía de *Aspergillus*, se basó hasta el siglo pasado, en características fenotípicas. En la actualidad se recomienda el llamado enfoque polifásico, basado en la utilización de caracteres morfológicos en combinación con características bioquímicas y moleculares para dar perfiles de especies mucho más detallados (Klich y Samson, 2007). Aproximadamente 50 nuevas especies de *Aspergillus* fueron descritas a partir del año 2000, basándose en características morfológicas y moleculares siendo muchas de ellas imposibles de diferenciar morfológicamente (Klich, 2009). Numerosas especies importantes de *Aspergillus* se hallan descritas en bases de datos como Mycobank.org o Index Fungorum. Las principales especies productoras de aflatoxinas son *Aspergillus flavus*, *A. parasiticu* y *A. nomius*, aunque se conocen otras. La aflatoxina B₁ es la sustancia con potencial cancerígeno más elevado que existe en la naturaleza (Perrone et al.,2007), siendo *A. flavus* la especie más común asociada a su contaminación.

Diversidad de *Aspergillus* y producción de toxinas

La diversidad genética dentro de poblaciones de *A. flavus* ha sido ampliamente estudiada en relación con su potencial de producción de aflatoxinas y su relación con las variantes morfológicas L (400µm o más) y S (menores a 400µm) denominadas así de acuerdo al tamaño de los esclerocios que producen (Perrone et al., 2007). En laboratorio, en medios de cultivo, los aislamientos de suelo de cepas tipo S, producen niveles más altos de aflatoxinas (Perrone et al., 2007). La síntesis de aflatoxinas y sus metabolitos precursores se asocia también a una mayor producción de conidios (Wilkinson et al., 2004). Estudios sobre la biodiversidad de las especies de *Aspergillus* toxigénas son útiles para aclarar molecular, bioquímica y ecológicamente las características de las diferentes especies en relación con su adaptación a diferentes condiciones ambientales y geográficas, así como su potencial de toxigenicidad (Samson et al., 2007). Cinco de los seis subgéneros de *Aspergillus* incluyen una o más especies que producen un teleomorfo, y muchos más que no lo hacen (Samson et al., 2007). Las relaciones teleomorfo - anamorfo de *Aspergillus* son complejas. La evidencia molecular hasta la fecha indica que todas estas están filogenéticamente relacionadas (Peterson, 2000). Sin embargo, los teleomorfos y anamorfos de *Aspergillus* son muy distintos entre sí, tanto en la morfología como en la fisiología (Samson et al., 2007). La presencia de un teleomorfo es un importante indicador de la fisiología, capacidad de descomposición y potencial para la producción de micotoxinas. En aquellas especies cuyos teleomorfos no se conocen, las mismas son llamadas por sus anamorfos (Pitt y Samson, 2007).

Identificación de los *Aspergillus*- enfoque polifásico

En 1965, Rapper y Fennell, publicaron el libro, “The genus *Aspergillus*”, básico para la identificación de estos hongos durante la mayor parte del siglo pasado, fundamentado en el uso de características morfológicas en medios diferenciales a temperaturas establecidas. Dicha publicación, aceptaba 132 especies subdivididas en 18 grupos. Actualmente, se consideran más de 180 especies anamórficas aceptadas, que presentan teleomorfos en 9 géneros diferentes. *Aspergillus* se subdivide en 7 subgéneros que a su vez se dividen en grupos (Samson y Pitt,

2000). La forma de encarar la taxonomía de estos hongos ha variado hasta el punto de que la sola morfología, tradicional, ni las herramientas moleculares, tan actuales, utilizadas de manera independiente son suficientes, es necesario combinarlas tomando también en cuenta la fisiología y bioquímica de cada una, para realizar perfiles detallados, sobre todo si se considera describir nuevas especies. A pesar de que los datos de secuencias de ADN son extremadamente útiles para el reconocimiento de límites de las especies, no existen criterios estrictos en cuanto a dónde trazar la línea entre las especies filogenéticas y de poblaciones que son potencialmente capaces de cruzarse (Geiser et al., 2007). En el caso de *Aspergillus*, para identificar especies, actualmente, se recomienda examinar varias secuencias de genes (ITS, calmodulina, β -tubulina, actina) y posteriormente comparar los resultados obtenidos con secuencias almacenadas en bases de datos reconocidas. Sin embargo, los ITS con frecuencia muestran poca o ninguna variación entre especies estrechamente relacionadas. En cuanto a metabolitos producidos por estos hongos, se recomienda el análisis de 4-8 compuestos en lugar de una sola molécula. Lo más adecuado sería no utilizar micotoxinas como criterio de separación de especies, porque las mismas pueden o no ser producidas por estos hongos (Samson et al., 2007).

Características morfológicas utilizadas en la identificación de especies

Los criterios morfológicos utilizados para la clasificación de las especies del género *Aspergillus* y sus telomorfos, se basan en la utilización de medios de cultivo diferenciales y temperaturas de incubación que permitan el desarrollo de características útiles en su identificación (Rodríguez et al., 2007). Las principales características macro y microscópicas utilizadas en la clasificación a nivel de especie en estos hongos incluyen el diámetro de las colonias; coloración del anverso y reverso de las colonias; presencia de esclerocios, gotas de exudado y pigmento difusible; textura de las colonias, disposición de las métulas o fiálides sobre la vesícula; medidas de los estipes, vesículas, métulas y fiálides; ornamentación y color de las conidias, de las células de Hülle y de las ascosporas (Rodríguez et al., 2007).

Características bioquímicas utilizables en la identificación de especies

Los perfiles de metabolitos secundarios pueden ser estudiados por medio de Cromatografía Gaseosa (GC), Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), Cromatografía en Capa Fina (TLC), Espectrometría de Masas; las proteínas de interés pueden ser separadas por Electroforesis de Gel 2D o Electroforesis Capilar. Como los perfiles de crecimiento y proteínas requieren infraestructura de baja tecnología estas características podrían ser muy útiles para determinar la identidad de un aislado (Frisvad et al., 2007). Hay información disponible en www.aspergillus.uk/metabolites/list que cita metabolitos secundarios producidos por especies potencialmente micotoxigénas y que podrían utilizarse en su identificación.

Criterios moleculares a ser tomados en cuenta en la identificación de especies de *Aspergillus*

Existen técnicas realmente prometedoras para la caracterización molecular de *Aspergillus*. Entre ellas se encuentran los MLP (Polimorfismos de la Longitud de Microsatélites); los STR (Repeticiones Cortas en Tándem) (De Valk et al., 2005); AFLP (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados) (De Valk et al. 2007); los MLST (Tipificado de secuencias de multilocus) (Bain et al., 2007) y los CTR (Codificación de Repeticiones de Tándem) (Balajee et al., 2007). Se recomienda la selección del método de análisis de acuerdo a la razón exacta de la caracterización de las cepas y a los recursos técnicos disponibles (Frisvad et al., 2007). Para la identificación polifásica de los *Aspergillus*, a nivel de especie, pueden utilizarse además las regiones del DNA que se encuentran dentro del rDNA, específicamente ITS1 e ITS2, y las regiones variables del extremo 5' del gen 28S (región D1-D2) y los genes de la vía de biosíntesis de las AF han sido estudiados y secuenciados y los mismos también pueden utilizarse en procesos de identificación.

Dado el peligro que representan estos patógenos para la salud humana y las pérdidas económicas que las toxinas derivadas de los mismos pueden causar, es de suma importancia el conocimiento de las pautas marcadas para su correcta identificación. Actualmente, se recomienda un enfoque polifásico para la identificación y caracterización de especies de *Aspergillus* incluyendo características moleculares, morfológicas, ecológicas y datos fisiológicos, especialmente si se describen nuevas especies.

LITERATURA CITADA

Bain, J.M.; Tavanti, A.; Davidson, A.D.; Jacobsen, M.D.; Shaw, D.; Gow, N.A. y Odds, F.C. 2007. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology (USA)* 45: 1469–1477.

Balajee, S.A.; Tay, S.T.; Lasker, B.A.; Hurst, S.F. y Rooney, A.P. 2007. Characterization of a novel gene for strain typing reveals substructuring of *Aspergillus fumigatus* across North America. *Eukaryotic Cell (USA)* 6: 1392–1399.

De Valk; H.A.; Meis, J.F.G.M.; De Pauw, B.E.; Donnelly, P.J. y Klaassen, C.H.W. 2007. Comparison of two highly discriminatory molecular fingerprinting assays for analysis of multiple *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology (USA)* 45: 1415–1419.

De Valk, H.A.; De Meis, J.F.G.M.; Curfs, I.M.; Muehlethaler, K.; Mouton, J.W. y Klaassen, C.H.W. 2005. Use of a novel panel of nine short tandem repeats for exact and high-resolution fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology (USA)* 43: 4112–4120.

Frisvad, J.C.; Larsen, T.O.; De Vries, R.; Meijer, M.; Houbraken, J.; Cabañes, F.G.; Ehrlich, K. y Samson, R. A. 2007. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. *Studies in Mycology (NL)* 59: 31–37.

Geiser, D.M.; Klich, M.A.; Frisvad, J.C.; Peterson, S.W.; Varga, J. y Samson, R.A. 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology (NL)* 59: 1–10.

Klich, M.A. y Samson, R.A. 2007. *Aspergillus* reference cultures. International Commission on *Penicillium* and *Aspergillus* (ICPA). Disponible en: <http://www.aspergilluspenicillium.org/ASPREFINTRO.htm>

Klich, M. 2009. Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicol Ind Health*. 2009 25:657-667.

Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Erlich, K., Varga, J., Frisvad, J.C., Meijer, M., Noonim, P., Warapa M. y Samson, R.A. 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. 2007. *Studies in Mycology (UK)* 59: 53–66.

Peterson, S.W. 2000. Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. En: *Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification*. (Samson RA, Pitt JI, eds.) Amsterdam (NL): Harwood Academic Publishers: 323–355.

Pitt, J.I. y Samson, R.A. 2007. Nomenclatural considerations in naming species of *Aspergillus* and its teleomorphs. *Studies in Mycology (UK)* 59: 67–70.

Rodríguez, P.; Soares, C.; Kozakiewicz, Z.; Paterson, R.; Lima, N.; Venâncio, A. 2007. Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. *Communicating Current*

Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Mendez-Vilas (Eds.) p 527-534.

Rodríguez, P.; Venancio, A.; Kozakiewicz, Z. y Lima, N. 2007. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section Flavi isolated from Portuguese almonds. International Journal of Food Microbiology (UK) 129: 187–193.

Samson, R.A.; Varga, J.; Witiak, S.M. y Geiser, D.M. 2007. The species concept in *Aspergillus*: recommendations of an international panel. Studies in Mycology (UK) 59: 71–73.

Samson, R. y Pitt, J. 2000. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. CRC PRESS (USA). 510 p.

Servicio de Calidad de los Alimentos y Normas Alimentarias (AGNS) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2010. Micotoxinas. Disponible en: http://www.fao.org/ag/agn/agns/chemicals_mycotoxins_es.asp

Wilkinson, H.; Ramaswamy, A.; Sim, S.C. y Keller, N.P. 2004. Increased conidiation associated with progression along the sterigmatocystin biosynthetic pathway. Mycologia (USA) 96: 1190–1198.

Arrúa Alvarenga, A. A.¹; Flores Olivas, A.¹, Dpto. de Parasitología Agrícola, ¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. Quezada Viay, M.Y.²Unidad de Investigación de Granos y Semillas, ²Universidad Nacional Autónoma de México. Centro de Asimilación Tecnológica "C.A.T." Cuautitlán Izcalli, Estado de México. México. aflooli@uaaan.mx; aaarrua@gmail.com

Introducción

El consumo mundial de café se calcula que sea superior a seis millones de toneladas al año, y la venta minorista, principalmente en Europa, los Estados Unidos y el Japón, ronda los 70 000 millones de dólares al año. (FAO 2006). Las aflatoxinas (AF) y ocratoxinas (OTA) son micotoxinas producidas por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Se encuentran mundialmente distribuidas y se consideran uno de los principales problemas emergentes en la industria del café. Las AF son oncogénicas, teratogénicas, afectan al sistema inmunológico y respiratorio (Juan et al. 2007). La OTA se considera la toxina de mayor importancia en café y su presencia ha sido ampliamente estudiada (López y Soriano 2007). Es imperioso que todos los involucrados con el beneficio, almacenamiento, acondicionamiento, venta y consumo del producto, cuenten con herramientas de laboratorio para el control de las micotoxinas y en especial de la OTA, siendo una de ellas la correcta identificación de los hongos potencialmente micotoxigénicos.

Metodología

Se colectaron muestras de cafés comerciales de los municipios de Xalapa y Coatepec, del Estado de Veracruz, México, tres de cafés tostados de marcas comerciales reconocidas, una de café oro y una de café oro para exportación a Europa. Para la observación del crecimiento fúngico, los granos se sembraron en cajas de Petri con PDA (Papa Dextrosa Agar) y MSA (Malta Sal Agar) al 6%, con 10 granos por caja durante 7

días a $27^{\circ}\text{C} \pm 1$. Se realizaron las resiembras necesarias en PDA para la obtención de cultivos puros y posterior identificación de los mismos por observación de características morfológicas macro y microscópicas por medio del uso de claves taxonómicas (Barnett y Hunter 1998, Klich 2002, Crous et al. 2004). Los hongos del género *Aspergillus* fueron seleccionados, por medio de diluciones se realizaron cultivos monospóricos y los mismos fueron re sembrados en CYA (Czapeck Extracto de Levadura Agar) y MEA (Malta Agar) para su identificación a nivel de especies por medio de la clave taxonómica de Klich (2002) Se calculó la densidad relativa de los hongos presentes en las muestras. El resultado de las micobiotas se expresó como porcentaje de patógenos presentes en las muestras (Marasas et al. 1988).

Resultados y Discusión

De granos de café verde se aislaron *Aspergillus flavus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *Penicillium spp.*, *Geotrichum sp.*, *Fusarium spp.*, *Podosphaera sp.*, *Cladosporium sp.* y *Rhizopus stolonifer*. En la Marca A, correspondiente a café verde, calidad de exportación a Europa, el hongo predominante fue *Aspergillus glaucus*, ubicándose en segundo lugar los hongos potencialmente productores de toxinas *Aspergillus flavus* y *Penicillium spp.* representando al 25% de los patógenos presentes. En la Marca B, correspondiente a café oro de consumo en el mercado local, el hongo predominante fue *Rhizopus*, lo que indica probablemente un proceso de secado defectuoso y malas condiciones de almacenamiento, seguido de *Penicillium spp.* con 25%. En lo que respecta a las marcas comerciales de grano tostado en dos de ellas *Penicillium spp.* fue el hongo con mayor incidencia, mientras que en una de ellas no se detectó la presencia de microorganismos, en PDA (figura 1). En MSA, se obtuvieron resultados similares,

destacándose en café oro de las Marcas A y B, una alta incidencia de *Rhizopus*, *Penicillium spp.* y *Aspergillus flavus*, siendo los dos últimos potenciales productores de OTA y AF. En cafés tostados, el hongo con más alta incidencia fue *Penicillium spp.*, con 100% en una de las marcas analizadas.

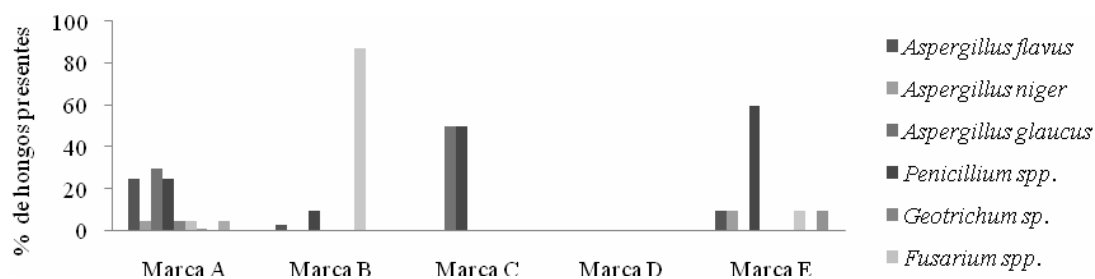


Figura 1. Densidad relativa de hongos presentes en PDA en marcas comerciales de café en el Estado de Veracruz, México, 2011.

En la marca comercial B, se detectó en igual porcentaje *Penicillium spp.* y *Aspergillus niger*, siendo ambos potenciales productores de OTA (figura 2). El medio MSA, siendo menos nutritivo y presentando una menor disponibilidad de agua debido a la retención de por el NaCl, permite el crecimiento de los llamados hongos de almacenamiento, de tal manera que los mismos no quedan enmascarados ante hongos que presentan un acelerado crecimiento en medios más nutritivos y con mayor disponibilidad de agua como el PDA. En este estudio existe coincidencia entre hongos aislados en ambos medios, lo que confirma que los mismos fueron los predominantes.

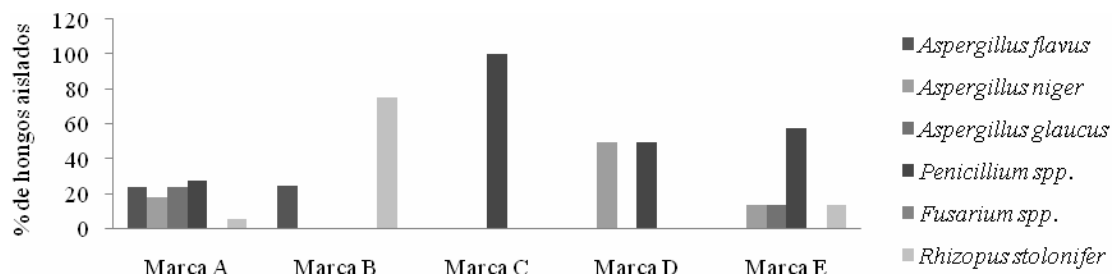


Figura 2 . Densidad relativa de hongos presentes en MSA en marcas comerciales de café en el Estado de Veracruz, México, 2011.

Existe coincidencia en cuanto a los hongos identificados, pero no en cuanto a la incidencia de los mismo en muestras de café con trabajos realizados con anterioridad por (Magnani et al. 2005), quienes en granos de café de diferentes orígenes, obtuvieron un 31% de *Aspergillus flavus* y 24% de *A. niger*; con (Pardo et al. 2004) quienes encontraron en muestras de café verde un 67% de *Aspergillus* de la Sección *Nigri*, 21% de *A. flavus*, 3.8% de *Rhizopus* y 3.6% de *Penicillium* y con Luna et al. (2010) que identificaron hongos de los géneros *Rhizopus*, *Penicillium* y *A. flavus*. En cuanto a la incidencia de los patógenos aislados no existe correspondencia, lo que podría indicar que la predominancia de los géneros *Rhizopus* y *Penicillium* se debe principalmente a las condiciones de manejo de las muestras durante el almacenamiento. *Penicillium* y *Aspergillus flavus* se consideran hongos de almacenamiento, mientras que *Aspergillus niger*, *A. glaucus* y *Rhizopus stolonifer*, indican que los granos han estado almacenados por un largo periodo de tiempo en condiciones de alta humedad y que otras especies los han antecedido en la sucesión microbiana ya que son considerados como hongos de deterioro avanzado (Moreno-Martínez y Gil 1991). La susceptibilidad del café a la contaminación por estos hongos (Peraica et al. 1999) es debida a que por razones

económicas, permanece almacenado durante largos periodos, generalmente sin control de la humedad y la temperatura. Debido a que se trata de un alimento de amplio consumo, la población tiene una elevada probabilidad de ser contaminada por esta toxina, ya que el tostado de café no es un proceso que asegure su total destrucción. Una taza de café podría contener cantidades elevadas de ocratoxinas (Carrillo 2003, Luna et al. 2010), las cuales, por presentar gran afinidad con las proteínas plasmáticas, aseguran su persistencia en el organismo (López y Soriano 2007, Luna et al. 2010).

Conclusión

En marcas comerciales analizadas tanto de café verde como tostados, comercializadas en Xalapa y Coatepec se detectó la presencia de hongos micotoxigénicos, *Penicillium*, *Aspergillus flavus* y *A. niger*, los cuales representan un riesgo para la salud humana como potenciales productores de AF y OTA.

Referencias bibliográficas

- Barnett, H.; Hunter, B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Mineapolis, USA. APS press. v.3340.
- Carrillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Salta, Argentina. Universidad Nacional de Salta. Salta. 126 p.
- Crous, P.; Gams, W.; Stalpers, J.; Robert, V.; Stegehuis, G. 2004. MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. *Studies in Mycology*. 50:19–22.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2006. Un café más sano. *Enfoques*. Julio: 2.
- Juan, C.; Soriano, J.; Burdaspal, P. 2007. Aflatoxinas del grupo B y G. Micotoxinas en alimentos. In: Soriano, J. Madrid, España. Ediciones Díaz de Santos. 201p. -218 p.

- Klich, M. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Louisiana, USA. Centraalbureau voor Schimmelcultures. 116 p.
- Luna, M.; Lozada, Y.; Trigos, A. 2010. Aislamiento de cepas de *Aspergillus niger*, productoras de ocratoxina A, en café verde (*Coffea arabica*) almacenado. Revista Mexicana de Micología. 32:63-68.
- López, A.; Soriano, J. 2007. Ocratoxina A. Micotoxinas en alimentos. In: Soriano, J. Madrid, España. Ediciones Díaz de Santos. p.201-p.218.
- Magnani, M.; Fernandes, T.; Prete, C. 2005. Molecular identification of *Aspergillus spp.* isolated from coffee beans. Scientia Agricola. 62:45-49.
- Marasas, W.; Burgess, L.; ANelich, R.; Lamprecht, S.; Schalkwyk, D. Van. 1988. Survey of *Fusarium* species associated with plant debris in South African soils. South African Journal of Botany. 54:63–71.
- Moreno-Martínez, E.; Gil, M. 1991. La biología de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas. México DF., México. Coordinación de la Investigación Científica. Programa Universitario de Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México. 42p.
- Pardo, E.; Marin, S.; Ramos, A.; Sanchis, V. 2004. Occurrence of Ochratoxigenic Fungi and Ochratoxin A in Green Coffee from Different Origins. Food Science and Technology International. 10:45-49.
- Peraica, M.; Domijan, A.; Fuchs, R.; Lucić, A.; Radić, B. 1999. The occurrence of ochratoxin A in blood in general population of Croatia. Toxicology Letters. 110:105-112.

**INCIDENCE AND DISTRIBUTION OF FILAMENTOUS FUNGI DURING
FERMENTATION, DRYING DURING MILLING PROCESS OF COFFEE
(*COFFEA ARABICA* L.) BEANS**

Alejandra Arrúa Alvarenga; Alberto Flores Olivas, Gustavo Frías Treviño Dpto. de
Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Carretera a

Zacatecas, Buenavista, Saltillo, Coah. C.P. 25315. Tel. (844)11-02-26. **Ernesto Moreno Martínez; Martha Yolanda Quezada Viay** Unidad de Investigación de Granos y Semillas, Universidad Nacional Autónoma de México. Centro de Asimilación Tecnológica "C.A.T." Av. Dr. Jorge Jiménez Cantú S/N, Col. San Juan Atlamica. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. **Mario Ernesto, Vázquez Badillo** Dpto. de Semillas, UAAAN. Dpto. de Semillas, UAAAN. **Humberto Reyes Valdés** Dpto. de Fitomejoramiento, UAAAN. **Danilo Fernández Ríos** Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, FACEN, Universidad Nacional de Asunción, Campus San Lorenzo, Paraguay. Correspondencia: aflooli@uaaan.mx; aaarrua@gmail.com

INTRODUCTION

Coffee is one of the most traditional beverages around the world and is an ingredient in a number of foods. Its quality is evaluated by key factors including variety, climatic conditions, processing methods and storage conditions; The main aim of coffee processing is removal of the pulp, mucilage, parchment and silver skin surrounding the coffee beans, which leaves the so called 'green' coffee beans (Ferreira *et al.*, 2008). Microbial contamination can occur in cherries and during harvesting, fermentation, drying and storage coffee beans (Silva *et al.*, 2000). Microbial action detrimental the quality and safety of the final product will depend on environmental conditions as well as crop and product management (Batista *et al.*, 2003). Bacteria, yeasts and filamentous fungi have been already reported in the pulp and beans of coffee processed in Brazil, India, Hawaii, Congo, Argentina, Colombia, Costa Rica, Ethiopia and Mexico. Filamentous fungi predominate at the end of the processing and during storage, and may affect the quality and safety of the final product due to production of mycotoxins

(Ferreira *et al.*, 2008). Neither storage nor processing conditions of coffee are strictly controlled, thus fungi contamination is possible at many critical points in the coffee production chain. The beans are susceptible to fungal spoilage in field, during and after fermentation during drying and storage. Mexico is the eighth largest producer of coffee. Spending on coffee and derivatives is about 400 million dollars annually. 90% of production is concentrated in Chiapas (38.8%), Veracruz (22.6%), Puebla (17.3%) and Oaxaca (11.4%). In the period 2008/9, exports increased by 8.6%. The main markets were: USA, Belgium, Germany, Japan and Canada. Mycotoxins are secondary metabolites produced by certain species of fungi, which have negative effects on human health and animals. The mycotoxin has neuro and nephrotoxic effects; are oncogenic, teratogenic, cause damage lung and liver. The main problems of coffee mycotoxins are ochratoxin A (OTA), the aflatoxin (AF) and patulin (PAT). Factors that influence the production of mycotoxins, being the maintenance of temperature and water activity for both the development of fungus for the production of the toxin. During the beneficiation process, the grain coffee is converted through a series of stages in which is exposed to different conditions of temperature and humidity that predispose to appearance of different pathogenic fungi. Fungal species belonging to the genera *Aspergillus* including *A. niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *Penicillium*, have been observed. *Aspergillus* species were the most frequently isolated fungi from samples (Urbano *et al.*, 2001; Martins & Gimeno, 2003; Noonim *et al.*, 2008a; Campos *et al.*, 2009). Many fungi, especially species from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, produce mycotoxins that can cause acute or chronic intoxication and damage to humans and animals after ingestion of contaminated food and feed (Moss, 1996; Marasas & Nelson, 1987). Among the mycotoxins, aflatoxins (AFs) and ochratoxin A (OTA) are of special interest, given their

high occurrence and toxicity. All AFs are regulated in different products in most countries worldwide (Sánchez-Hervás *et al.*, 2008). AFs are hepatotoxic, teratogenic, mutagenic and carcinogenic mycotoxins produced by members of *Aspergillus* section *Flavi* mainly *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. The most potent of the four naturally occurring AFs (B1, B2, G1 and G2) is aflatoxin B1 (AFB1), which is listed as a group I carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (Sánchez-Hervás *et al.*, 2008) because of its demonstrated carcinogenicity to humans (Castegnaro & Wild, 1995). Besides AFs, some *A. flavus* strains together with strains belonging to the species *Aspergillus tamarii*, also included in the section *Flavi*, are reported to produce cyclopiazonic acid (CPA) (Horn, 2007). This mycotoxin is a specific inhibitor of calcium-dependent ATPase, which is toxic to animals and humans (Riley & Goeger, 1992). Ochratoxin A (OTA) is mainly a mycotoxin with nephrotoxic effects and has been associated with Balkan Endemic Nephropathy (Krogh, 1978; Kuiper-Goodman & Scott, 1989; Abouzied *et al.*, 2002). Recently, black *Aspergillus* species (section *Nigri*), such as *Aspergillus carbonarius* and species belonging to the *Aspergillus niger* aggregate, have been described as the main source of OTA contamination in coffee, grapes and other agricultural products (Battilani & Pietri, 2002; Abarca *et al.*, 2003; Iamanaka *et al.*, 2005; Magnoli *et al.*, 2006, 2007). OTA occurrence in coffee, roasted coffee, powder and coffee marketed products has been reported in different countries. Taking all this information into account, it would seem relevant to determine the mycoflora of cocoa and the potential ability of the isolated fungi to produce mycotoxins. In order to detect and identify fungi associated with potentially mycotoxigenic coffee milling process is conducted in this paper. The aim of this work was to detect the occurrence of filamentous fungi present in the different

stages of coffee production by natural method including harvest, fermentation, drying and storage of beans.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Fungi were isolated from twenty five subsamples of two growing sites of Veracruz State, Teocelo (conventional management) and Ixhuatlán del Café (organic management), in México. The coffee cherry (*Coffea arabica* var Oro Azteca) of day's harvest, was subsequently processed, performing the wetmilling process of the samples.

Isolation and identification of filamentous fungi

Were studied the absolute frequency and relative density of fungi in: coffee cherry, after fermentation, after 6 days of drying at 12 days of drying, gold and roasted. Ten beans were picked from each sample and ground into parts at each stage of processing and were placed on plates with PDA. In order to avoid skin contamination from the beans, their surface was first decontaminated using a 3% chlorine solution for 1 min followed by two rinses with sterile-distilled water. Ten small pieces were taken randomly from each bean and directly plated onto plates of PDA (Potato Dextrose Agar) and MSA (Malt Salt Agar), 6% salt. Plates were incubated at 27°C for 7 days. All fungi considered to represent different species were isolated and transferred to Malt Extract Agar (MEA) and Czapek Yeast Extract (CYA) plates for identification. Fungus to represent characteristic of genus *Aspergillus*, were transferred to AFPA (*Aspergillus Flavus Parasiticus* Agar) to confirm the pertinence of them to the Section Flavi. Isolates were

identified through macroscopic and microscopic observation, with the aid of published guidelines (Samson & Pitt, 2000b; Klich, 2002; Abarca *et al.*, 2004; Samson *et al.*, 2007b).

Fungal isolates used to evaluate toxigenic potential

All identified *Aspergillus* isolates belonging to the *Flavi* section were tested for their aflatoxigenic potential. For the first screening of the production of aflatoxins in the isolates of *Aspergillus* Section *Flavi*, were used ACY (Agar Coconut Agar), to observe fluorescence under light UV. (Lin & Dianese, 1976; Davis *et al.*, 1987). For the quantification of the toxins were used Aflatest and Ochratest of Vicam Technologies. The results of the mycobiota were expressed in percent of pathogens present. Were quantified AF and OTA in samples of coffee of the wet milling process in: coffee cherry, after fermentation, after 6 days of drying at 12 days of drying, gold and roasted. (Vicam, 2011a, b).

For this work it considered the following fractions: cherry, exocarp, mesocarp, endocarp, endosperm, of the freshly harvested cherry; grain after the fermentation of 24 hours in water; half of the drying process (6 days), parchment, endocarp and endosperm and after the drying process green coffee endocarp and endosperm (12 days).

Statistic design

The statistic model was completely randomized. Were calculated the medium of de fungus present in every one of the steps of the wet milling process and the results of the mycobiota were expressed in percent of pathogens present. Were calculated the

correlation between origin of the sample and pathogens present, step of the wet milling process and pathogens present and management of the coffee and pathogens present, with the Pearson coefficient. The analyses was performed with the statistic package Graphpad Prism 8.(Motulsky, 2003).

RESULTS AND DISCUSION

Analyses were conducted at the Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Antonio Narro, in Saltillo, Coahuila, México, en el Laboratorio de Parasitología Molecular and in UNIGRAS, UNAM, in Cuautitlán Izcalli, Edo. México.

Contamination of Coffee beans

The Table 1 summarize the fungus isolated from Teocelo, with conventional management and Ixhuatlán, with organic management. Coffee cherries and beans are subjected to contamination and consequent colonization by microorganisms during different phases of development, harvesting, preparation, transport and storage.

In the milling process in the conventional management, predominant mycobiota belonged to *Rhizopus stolonifer*, 279 strains and *Penicillium*, 146 strains; *Aspergillus* Section *Flavi* 98 strains, and *Aspergillus* Section *Nigri*, 75 strains. In the organic management, predominant mycobiota belonged to *Rhizopus stolonifer*, 256 strains, *Penicillium sp.*, 154 strains and *Fusaium spp.*, 134 strains. *Aspergillus* Section *Flavi*, belonged 114 strains and Section *Nigri* 62 strains.

Table 1. Mycobiota of milling wet process and green coffee in Teocelo and Ixhuatlán del Café.

| Patógeno | Teocelo | Teocelo | Ixhuatlán | Ixhuatlán |
|--------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | Nro. de aislados Beneficio | Nro. de aislados Café verde | Nro. de aislados Beneficio | Nro. de aislados Café verde |
| <i>Acremonium sp.</i> | 100 | 2 | 96 | 0 |
| <i>Alternaria alternata</i> | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Aspergillus flavus</i> | 98 | 32 | 114 | 4 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 72 | 78 | 62 | 14 |
| <i>Aspergillus carbonarius</i> | 3 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Aspergillus glaucus</i> | 12 | 14 | 49 | 2 |
| <i>Aspergillus tamaraii</i> | 0 | 0 | 1 | 0 |
| <i>Cladosporium sp.</i> | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Colletotrichum gloesporioides</i> | 60 | 0 | 62 | 0 |
| <i>Fusarium spp.</i> | 60 | 0 | 134 | 0 |
| <i>Geotrichum sp.</i> | 70 | 32 | 36 | 0 |
| <i>Penicillium sp.</i> | 146 | 50 | 154 | 6 |
| <i>Rhizoctonia sp.</i> | 18 | 0 | 52 | 0 |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> | 279 | 240 | 256 | 54 |
| <i>Stenphyllum sp.</i> | 1 | 12 | 0 | 0 |

One of main goals of this study was to identify *Aspergillus* strains belonging to sections *Flavi* and *Nigri*, given the high frequency of isolation and potential for producing mycotoxins, such as AFs, CPA and OTA (Abarca *et al.*, 2004; Horn, 2007). All *Aspergillus* strains belonging to the aforementioned sections were identified at species level, based on morphological characteristics such as colony morphology, morphology of the conidial head and conidial size and shape, as well as published reference

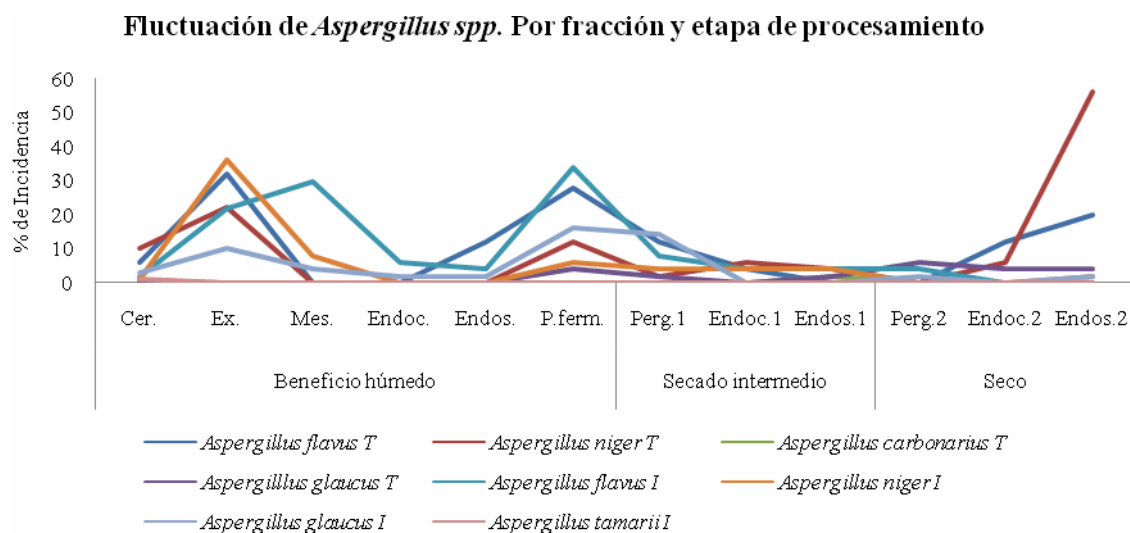
guidelines (Samson & Pitt, 2000a; Klich, 2002; Abarca *et al.*, 2004; Samson *et al.*, 2007a; Pitt & Hocking, 2009).

In green coffee, the predominant fungus was *Rhizopus stolonifer* in both cases, 240 strains in Teocelo and 54 strains in Ixhuatlán. Regarding of mycotoxigenic fungi on green coffee, in Teocelo, *Aspergillus* Section *Nigri*, was the predominant, with 78 strains, and *Aspergillus niger* was predominant with 72 strains. *Aspergillus flavus* 32 strains and *Penicillium* 50 strains. In the organic management in Ixhuatlán, *Aspergillus niger*, 14 strains; *Aspergillus flavus* 4 strains and *Penicillium* 6 stains. It's important to note the mayor proportion of potential ochratoxigenic and aflatoxigenic fungi in green coffee with conventional management. There was a qualitatively uniform distribution of filamentous fungi in samples from Teocelo and Ixhuatlán. This result may simply reflect the high incidence and ubiquity of the filamentous fungal species and does not suggest substantive differences in either environmental conditions or in crop management practices. The surface sterilisation approach revealed that although contamination levels in the interior of the bean were less than one-third that of the surface, the proportions of the major species were the same, suggesting opportunistic invasion, coinciding with (Batista *et al.*, 2003).

Incidence of *Aspergillus* spp. In the different coffee fractions

Figure 1 summarizes the incidence of *Aspergillus* spp. in the different coffee fractions, during the wet milling process. In Teocelo, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*, had a high incidence in the cherry exocarp freshly harvested and after the fermentation process. In the green coffee, the predominant fungi was *Aspergillus niger*. In Ixhuatlán,

Aspergillus niger was the predominant in the exocarp of the cherry and has a high incidence after the fermentation process. In green coffee, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* has the same incidence.



Although part of the contamination level may have occurred in the field, it can also be inferred that type and conditions of the coffee yard where these samples were collected may have significantly influenced the fungi contamination and OTA and AF concentration. The coffee beans collected at the cherry which were adequately post-harvest processed using the wet method, fermented and dried may have their risk of fungi contamination reduced and, consequently, at present no or very low levels of OTA. In the cherry fruits, the skin particles generated after drying and processing containing mycotoxigenic fungus may be mixed with the healthy beans, compromising the final quality of the coffee (Batista *et al.*, 2009).

Of the species of the *Nigri* *A. niger* was the most common, coincident with (Martins *et al.*, 2003; Noonim *et al.*, 2008), where *Aspergillus* Section *Nigri* was the predominant in

green coffee. This species has been identified in other coffee fruit and bean studies (Mislivec *et al.*, 1983; Silva *et al.*, 2000; Batista *et al.*, 2001, 2003; Suárez-Quiroz *et al.*, 2004). The remainder *Aspergillus* species identified were also observed in coffee beans, such as *Aspergillus flavus*, *A. glaucus*, *A. carbonarius* and *A. tamarii* (Mislivec *et al.*, 1983; Silva *et al.*, 2000; Batista *et al.*, 2001, 2003; Suárez-Quiroz *et al.*, 2004).

The ochratoxigenic species of *Aspergillus* are neither phytopathogenic nor endophytes; thus, contamination by OTA in healthy fruits would not be possible. (Batista *et al.*, 2009). These fungi are saprophyte and opportunistic and the presence of OTA in this type of sample may be due to injuries, this is very notable in the Graphic 1, because *A. niger* present a peak of incidence in the exocarp of the cherry. One possibility is the coffee berry borer attacks the coffee fruits at any stage of maturation, carrying in its body conidia of *Aspergillus* and its feces along with the coffee components, turning the environment favorable to fungi development and OTA synthesis in fruits at different stages of maturation (Batista *et al.*, 2009). Another possibility is toxigenic fungi colonization of cherry fruits is damaged by phytopathogenic fungi such as *Colletotrichum*, *Rhizoctonia* and *Fusarium*, and mechanical damages that expose the pulp and mucilage to fungi development. In the samples processed the results showed that the removal of coffee husk (cherry dehusking) or of the husk and mucilage (cherry despulping) reduced bean contamination, thus indicating that fungi Graphic 1 .

Coffee bean skin is the main substrate for the development of ochratoxigenic fungi. Besides eliminating a number of OTA-producing microorganisms, skin removal accelerates drying, decreasing the risk of fungi development and OTA production (Batista *et al.*, 2009). However, the initial quality of the fruits harvested, the presence of

OTA-producing fungi as well as the processing site conditions can certainly contribute to the formation of OTA in coffee processing by wet method (Bucheli & Taniwaki, 2002; Batista *et al.*, 2009).

Presence of AF and OTA in coffee samples

The present study showed that harvesting and preprocessing operations generate fractions (product with differentiated characteristics) and coffee types presenting different risks of exposure to contamination by toxigenic fungi and AF and OTA. The adoption of the Danger and Critical Control Points Analysis System (APPCC) and Good Agricultural Practices (BPA) will significantly influence not only the reduction of microorganism contamination risk under the conditions of coffee fruit and bean deterioration but also the reduction of OTA.

References

- Abarca, M., Accensi, F., Bragulat, M., Castellá, G. & Cabañes. (2003). *Aspergillus carbonarius* as the Main Source of Ochratoxin A Contamination in Dried Vine Fruits from the Spanish Market. *Journal of Food Protection* 66, 504–506.
- Abarca, M., Accensi, F., Cano, J. & Cabañes, F. (2004). Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek* 86, 33–49.
- Abouzied, M., Horvath, A., Podlesny, P., Regina, N., Metodiev, V., Kamenova-Tozeva, R., Niagolova, N., Stein, A. D., Petropoulos, E. & Ganev, V. (2002). Ochratoxin A concentrations in food and feed from a region with Balkan Endemic Nephropathy. *Food Additives and Contaminants* 19, 755–764.

- Batista, L., Chalfoun, S. & Prado, G.(2001).Identificação de espécies toxigênicas de *Aspergillus* associadas aos grãos de café armazenados. *Revista Brasileira de Armazenamento*3, 11–16.
- Batista, L., Chalfoun, S., Prado, G., Schwan, R. & Wheals, A.(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. & Schwan, R. F.(2009).Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. *Food Control*20, 784–790.
- Battilani, P. & Pietri, A.(2002). Ochratoxin A in grapes and wine. *European Journal of Plant Pathology*108, 639–643.
- Bucheli, P. & Taniwaki, M. H.(2002). Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. *Food Additives and Contaminants*19, 655–665.
- Campos, R., Freitas-Silva, O., Cunha, F., Souza, M. & Freitas, S.(2009).Fungos micotoxigênicos e ocratoxina a em cafés com permanência prolongada na planta e no solo, colhidos nas regiões do cerrado mineiro e baiano. *CSci*4, 136–148.
- Castegnaro, M. & Wild, C.(1995). IARC activities in mycotoxin research. *Natural Toxins*3, 327–331.
- Davis, N., Iyer, S. & Diener, U.(1987). Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Appl Environ Microbiol*53, 1593–1595.

- Ferreira, C., Batista, L. & Freitas, R.(2008).Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans. *Brazilian Journal of Microbiology*39, 521–526.
- Horn, B.(2007). Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in the United States: a review. *Food additives and contaminants*24, 1088–1101.
- Iamanaka, B. T., Taniwaki, M. H., Menezes, H. C., Vicente, E. & Fungaro, M. H. P.(2005). Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. *Food Additives and Contaminants*22, 1258–1263.
- Klich, M.(2002).*Identification of common Aspergillus species*. Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Krogh, P.(1978). Casual associations of mycotoxic nephropathy. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica Supplement* 1–28.
- Kuiper-Goodman, T. & Scott, P.(1989). Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and environmental sciences : BES*2, 179–248.
- Lin, M. & Dianese, J.(1976). A coconut agar medium for rapid detection of anatoxin production by *Aspergillus* spn. *Phytopathology*66, 1466–1469.
- Magnoli, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Fernández-Juri, M., Chiacchiera, S. & Dalcero, A.(2006).Ochratoxin A and the occurrence of ochratoxin A-producing black aspergilli in stored peanut seeds from Córdoba, Argentina. *Journal of the Science of Food and Agriculture*86, 2369–2373.

- Magnoli, C., Astoreca, A., Ponsone, M., Fernández-Juri, M., Barberis, C. & Dalcero, A.(2007). Ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in peanut seeds at different months of storage in Córdoba, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*119, 213–218.
- Marasas, W. & Nelson, P.(1987).*Mycotoxicology: introduction to the mycology, plant pathology, chemistry, toxicology, and pathology of naturally occurring mycotoxicoses in animals and man*. Pennsylvania State University Press.
- Martins, H. & Gimeno, A.(2003). Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). *Food additives and contaminants*20, 1127–1131.
- Martins, M. L., Martins, H. M. & Gimeno, A.(2003). Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). *Food Addit Contam*20, 1127–1131.
- Mislivec, P., Bruce, V. & Gibson, R.(1983). Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. *Journal of Food Protection*46, 969–973.
- Moss, M.(1996). Mycotoxic fungi. In *Microbial food poisoning*, pp. 75–93. Edited by A. Eley.
- Motulsky, H.(2003). Prism 4 statistics guide—statistical analyses for laboratory and clinical researchers. *GraphPad Software Inc, San Diego, CA* 122–126.
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K., Frisvad, J. & Samson, R.(2008a). Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing

- Aspergillus species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *Int J Food Microbiol*128, 197–202.
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C. & 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, 197–202.
- Pitt, J. & Hocking, A.(2009).*Fungi and Food Spoilage*. Springer.
- Riley, R. & Goeger, D.(1992). Cyclopiazonic acid: speculations on its function in fungi. *Handbook of applied mycology*5, 385–402.
- Samson, R. & Pitt, J.(2000a).*Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. CRC.
- Samson, R., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J. & Varga, J.(2007a). Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology*59, 129 –145.
- Samson, R. & Pitt, J.(2000b).*Integration of modern taxonomic methods for penicillium and aspergillus classification*. Harwood Academic.
- Samson, R. a., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J. c. & Varga, J.(2007b). Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology*59, 129 –145.
- Sánchez-Hervás, M., Gil, J., Bisbal, F., Ramón, D. & Martínez-Culebras, P. V.(2008). Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*125, 336–340.

Silva, C., Schwan, R., Sousa Dias, E. & Wheals, A.(2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*60, 251–260.

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

Urbano, G., Taniwaki, M., Leitão, M. & Vicentini, M.(2001).Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. *J Food Prot*64, 1226–1230.

Vicam. (2011a). Aflatoxin Test Kits from VICAM.

Vicam. (2011b). Ochratoxin Test Kits from VICAM.

**REGULATION OF AFLATOXIN AND OCHRATOXIN PRODUCTION OF
Aspergillus flavus AND *Aspergillus niger*, IN RELATION OF pH AND WATER
ACTIVITY**

INTRODUCTION

Aflatoxins and ochratoxins are produced by *Aspergillus* Section *Flavi* and *Aspergillus* Section *Nigri* mainly. AF, are one of the most cancerous substances known, and OT, are now considered as the most important emerging mycotoxins. The aflatoxin biosynthesis gene cluster has been completely elucidated (Yu *et al.*, 2004). Cited 24 genes involved in the synthesis, though some authors assume that there are more than 26 involved in the cluster (Hong & Linz, 2008). aflR, is the principal regulator in the

production of aflatoxins in the biosynthetic pathway. AFLR protein, can bind to the promoter region of each gene in the production of aflatoxin and activate gene expression. In addition to this the aflR gene possesses self-regulatory function. The absence of this gene or the abnormal presence is a strong indicator that the *Aspergillus* strain is not capable of synthesizing aflatoxins. aflR, whose function is to activate transcription in the road (Yu *et al.*, 2002, 2004). The organization in a cluster of genes of the biosynthetic pathway of OTA was shown first by cloning a sequence containing three adjacent genes, involved in OTA biosynthesis in *P. nordicum* (Karolewicz & Geisen, 2005). The biosynthetic pathway of OTA in *Aspergillus* species, however, only little known and have identified a gene encoding a protein polyketide synthase PKS, safely involved in the biosynthesis of OTA in the *A. ochraceus*. Subsequently, two genes have been described but belonging to the superfamily of cytochromes P450, with high similarity to fungal P450 genes involved in the pathway of biosynthesis of other mycotoxins, and whose expression levels were positively correlated with the production of OTA in particular one (p450-B03). However, your organization in a cluster was not confirmed (O'Callaghan *et al.*, 2003, 2006). *A. flavus* usually produces only aflatoxin B1 and B2. Not all of the strains of *A. flavus* isolated from the natural habitat are able to produce these metabolites at least under laboratory conditions (Schmidt-Heydt *et al.*, 2010). *A. niger* is an important producer of OTA (Abarca *et al.*, 2004). The biosynthesis of mycotoxins, as all secondary metabolites, is strongly dependent on growth conditions such as substrate composition or physical factors like pH, water

activity, temperature or modified atmospheres . Depending on the particular combination of external growth parameters the biosynthesis of mycotoxins can either be completely inhibited, albeit normal growth is still possible or the biosynthesis pathway can be fully activated (Ramos *et al.*, 1998; Sorensen *et al.*, 2009; Schmidt-Heydt *et al.*, 2010; Oviedo *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2011; Giorni *et al.*, 2011). Several authors were studied the effect of abiotic factors under the expression of the genes of the aflatoxin cluster. Schmidt-Heydt *et al.*, 2010, studied the complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature by microarray and real time PCR and concluded (25 °C/0.95 and 0.99; 30 °C/0.95 and 0.99; 35 °C/0.95 and 0.99) a reduced basal level of cluster gene expression occurred. In 2010 (González Salgado, 2010), studied the biosynthesis of ochratoxins in strains of *Aspergillus* Section *Nigri* isolated on grapes, and the effect of abiotic factor on the production of the toxin. Knowledge about these relationships enables an assessment of which parameter combinations can control mycotoxins biosynthesis or which are conducive to micotoxins production. In the current work the influence of the important physical parameters, pH and aw, on the regulation of the aflatoxin and ochratoxin biosynthesis genes of *A. flavus* and *A. niger* were analysed. This type of study is required to elucidate the pivotal role of environmental factors in the activation of the aflatoxin and ochratoxin biosynthesis genes.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Fungi were isolated from twenty five subsamples of two growing sites of Veracruz State, Teocelo (conventional management) and Ixhuatlán del Café (organic management), in México. The coffee cherry (*Coffea arabica* var Oro Azteca) of day's harvest, was subsequently processed, performing the wetmilling process of the samples.

Isolation and identification of filamentous fungi

Were studied the absolute frequency and relative density of fungi in: coffee cherry, after fermentation, after 6 days of drying at 12 days of drying, gold and roasted. Ten beans were picked from each sample and ground into parts at each stage of processing and were placed on plates with PDA. In order to avoid skin contamination from the beans, their surface was first decontaminated using a 3% chlorine solution for 1 min followed by two rinses with sterile-distilled water. Ten small pieces were taken randomly from each bean and directly plated onto plates of PDA (Potato Dextrose Agar) and MSA (Malt Salt Agar), 6% salt. Plates were incubated at 27°C for 7 days. All fungi considered to represent different species were isolated and transferred to Malt Extract Agar (MEA) and Czapek Yeast Extract (CYA) plates for identification. Fungus to represent characteristic of genus *Aspergillus*, were transferred to AFPA (*Aspergillus Flavus Parasiticus* Agar) to confirm the pertinence of them to the Section Flavi. Isolates were identified through macroscopic and microscopic observation, with the aid of published guidelines. Were isolated 27 strains of *Aspergillus niger* and 69 strains of *Aspergillus flavus* (Samson & Pitt, 2000; Klich, 2002; Abarca *et al.*, 2004; Samson *et al.*, 2007).

Screening of AF and OTA production

All the strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* were screened for OTA and AF production in agar coconut medium. AF and OTA production on coconut agar medium. The plates were illuminated with UV light and transformants without a blue fluorescent halo were selected as atoxigenic (Lin & Dianese, 1976; Heenan *et al.*, 1998; O'Callaghan *et al.*, 2003). After the screening the toxin were selected two strains, one of *A. flavus* and one of *A. niger* in basis of the fluorescence for the next part of the experiment. Pre-selected strains, we performed DNA extraction to verify the presence of genes synthesis routes AF and OTA. The DNA was extracted using the DNA kit multisourse of Axygen. The strains were left for 2 days grow in potato extract (200g potato / L of sterile distilled water) at 27 °C in triplicate. They then verified the quality and integrity, and was amplified by PCR for biological duplicates.

For the synthesis pathway of OTA primers were used Acarp450 y AckS9 (González Salgado, 2010) and for AF were used nor, ver, omt and aflR (Criseo *et al.*, 2001).

Growth conditions and assessment

For expression and toxin analysis the agar plates a single point inoculated centrally by applying 10 µl of a spore suspension (10^6 spores in TWS (0.5% tween 80). The water activity of the media was adjusted with glycerol by using glycerol/water mixtures. The following amounts were used per litre (339.1 for 0.88; 302.9 for 0.90; 253.4 for 0.92; 197.3 for 0.94; 132.3 for 0.96 and 59.1 for 0.98) (Schmidt-Heydt *et al.*, 2010) in Czapek. For the pH analysis were used HCl (4; 4.5; 5.5; 6.5; 7; 9.5; 10.5; 11.5; 12.5; and 13.5). The temperature of growth was in all cases 27°C (OBrian *et al.*, 2007).

Isolation of RNA from samples

The RNA was extracted by the Kit RNA Multisource Axygen. La calidad e integridad del RNA se verificó por espectrometría y electroforesis en geles de agarosa. TBE 0.5X, 60 volts, 1 hour. For AF were used the primers nor, ver, omt and aflR (Criseo *et al.*, 2001) and for OTA was used Acarp450 (González Salgado, 2010). cDNA synthesis was performed using Super Script kit from Invitrogen. The PCR product was verified by agarose gel 2% in TBE. RNA extractions were performed at 48 hours, 72 hours and one week.

RESULTS AND DISCUSSION

Of mycobiotas made during the wet milling process of coffee were isolated 27 strains of *Aspergillus niger* and 69 strains of *Aspergillus flavus*, of these isolates were selected two strains, one belonging to *Aspergillus* Section *Flavi*, the other *Aspergillus* Section *Nigri*, based on the fluorescence under UV light in ACY. The strain of *A. flavus* was isolated from green coffee and the strain of *A. niger* was isolated from green coffee, both showed the highest fluorescence compared with other isolates obtained from the process of benefit. In the strain selected strain of *A. niger*, was detected the presence of two genes of the biosynthetic pathway of OTA, the Ask9 and Acarp450, positively related to the synthesis of this toxin, so it was determined that potentially producing OTA, coincident with that reported by González Salgado, 2010. In the *A. flavus* strain was detected the genes nor, ver, omt and aflR, of the biosynthetic pathway of the AF, so this strain it was determined that potentially producing AF (Criseo *et al.*, 2001; Schmidt-Heydt *et al.*, 2010).

In order to analyse the influence of the external parameters a_w and pH on aflatoxin and ochratoxin gene activation *A. flavus* was and *A.niger*, grown for 7 days on CZ medium adjusted to the respective a_w and pH at 27°C. After this time the activation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster was determined by RT-PCR analysis. The growth optimum for *A. flavus* strain was at pH 4.5 and a_w 0.98 at 27°C; the growth optimum of *A. niger* strain was at pH 10.5 and 0.98 a_w at 27°C. The biosynthesis pattern of toxin followed the growth rate and was high at 0.99 a_w and low at 0.88 a_w .

The expression profiles of the aflatoxin and ochratoxin cluster genes selected, were coordinately changed in response to the environmental conditions and were partly inversely related to the growth of the fungi. The involvement of abiotic stress in the activation of mycotoxin biosynthetic genes have been described in several studies (Jayashree & Subramanyam, 2000; Ochiai *et al.*, 2007; Jurado *et al.*, 2008; Schmidt-Heydt *et al.*, 2008; Kohut *et al.*, 2009).

Table 1 summarizes the analysis of gene expression of Acarp450 and Ask9, under different conditions of pH and a_w in *A. niger* after 48 hours of growth.

| a_w | Acarp450 | Ask9 | pH | Acarp450 | Ask9 |
|-------|----------|------|------|----------|------|
| 0.88 | - | - | 4 | - | - |
| 0.90 | + | + | 4.5 | + | + |
| 0.92 | + | + | 5.5 | + | + |
| 0.94 | + | + | 6.5 | + | + |
| 0.96 | + | + | 7 | + | + |
| 0.98 | + | + | 9.5 | + | + |
| | | | 10.5 | + | + |
| | | | 11.5 | + | + |
| | | | 12.5 | - | - |

After 48 hours of growth of the fungus, activity was detected in the synthesis pathway of ochratoxins in a range of water activity from 0.90 to 0.99 and in a pH range of 4.5 to 11.5, in *Aspergillus niger* (Table 1). Both at 48 and at 72 hours of growth of the fungus, *acp450* and *ask9* genes were expressed positively. The OTA biosynthetic pathway in *Aspergillus* species is poorly known and only identified a gene encoding a protein PKS polyketide synthase, involved with secondary metabolism in OTA biosynthesis in the *A. ochraceus*. Subsequently, two genes were described but belonging to the superfamily of cytochromes P450, with high similarity to fungal P450 genes involved in the pathway of biosynthesis of other mycotoxins, and whose expression levels were positively correlated with the production of OTA (O'Callaghan *et al.*, 2003, 2006). In this experiment, the results agree with those obtained by (González Salgado, 2010), who studied a *Section Nigri* isolated from grapes in Spain and OTA producing strains obtained positive amplification of the gene *acp450*. Although *Aspergillus Section Nigri*, has a wide range of growth in terms of a_w , of between 0.77 to 0.99 (Pitt & Hocking, 2009), OTA production requires much more specific values of between 0.93 to 0.99 (Ramos *et al.*, 1998). In the strain used in this experiment was detected gene activity a_w *acp450* and *ask9* to 0.90, and consequently the route of synthesis of OTA, this could be that the selected strain was isolated from the wet milling process of the coffee which suggests that it would be adapted to high humidity conditions of this process, not only for growth but also to produce toxins when the temperature condition is optimal. In relation to pH, (Esteban *et al.*, 2006) reported in *Section Nigri* strains showed growth from pH 2 to pH 3 to 10, in CYA and YES in isolates of coffee, in the strain of *A. niger* used in this experiment, the growth yield from pH 3.5, and genes *acp450* *ask9* and the route of synthesis of the OTA is expressed from

4.5 to 11.5, indicating that it is able to develop and produce toxins in a wide pH range when the temperature is optimal. It has demonstrated the presence of OTA in green coffee beans (Nakajima *et al.*, 1997; Santos & Vargas, 2002; Martins *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2006), in commercial roasted coffees (Tsubouchi *et al.*, 1988), with an increasing number of positive samples as detection methods improve. Robusta coffees and Arabica varieties from different countries and geographical regions and forwarded to wet or dry contaminated have been reported (López & Soriano, 2007), but indicated that the main responsible for the production of this toxin are *A. carbonarius*, *A. ochraceus* and *Penicillium*, but indicated that in cold climates, *Penicillium* is primarily responsible for OTA production in cold climates and *Aspergillus* Section *Nigri* in temperate and warm, in the region of Coatepec (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Veracruz, 2005), the climate is temperate humid, leading to assume that the production of OTA, would be mainly involved the fungi *Aspergillus*.

In the *A. flavus* strain, at 48 hours, mold growth was insufficient and therefore could not be obtained for RNA expression analysis. Table 2, summarizes the analysis of gene expression for genes *nor*, *ver*, *omt* and *aflR* of the biosynthetic pathway of the AF under different conditions of a_w and pH at 72 hours.

| pH | nor | ver | omt | aflR | a_w | nor | ver | omt | aflR |
|-----|-----|-----|-----|------|-------|-----|-----|-----|------|
| 4 | - | - | - | - | 0.88 | - | - | - | - |
| 4.5 | + | + | + | + | 0.90 | - | - | - | - |
| 5.5 | + | + | + | - | 0.92 | + | + | - | - |

| | | | | | | | | | |
|------|---|---|---|---|------|---|---|---|---|
| 6.5 | + | + | + | + | 0.94 | + | + | - | - |
| 7 | + | + | + | + | 0.96 | + | + | + | + |
| 9.5 | + | + | - | - | 0.98 | + | + | + | + |
| 10.5 | + | + | - | - | | | | | |
| 11.5 | + | + | - | - | | | | | |
| 12.5 | + | + | - | - | | | | | |
| 13.5 | + | + | - | - | | | | | |

After 72 hours, the genes of the biosynthetic pathway were expressed in pH 4.5 and pH 6.5 and 7; *Aspergillus flavus* grows between a pH range of 2.1 to 11.2, 25, 30 and 37°C with an optimum growth in a range from 3.4 to 10 (Blackburn, 2006), which coincides with the results obtained in this experiment; in respect to a_w , the activity of the genes of the biosynthetic pathway was detected from 0.92, but the transcriptional activator, aflR, it was expressed from 0.96 coincident with (Schmidt-Heydt *et al.*, 2010), that detected the expression of the transcriptional activator from 0.95 a_w . aflR, is the principal regulator in the production of aflatoxins in the biosynthetic pathway. AFLR protein encoded by this gene can bind to the promoter region of each gene in the production of aflatoxin and activate gene expression (Yu *et al.*, 2002, 2004, 2011).

In conditions favourable for growth of *A. flavus* the cluster genes are expressed at a basal level with the strain producing high amounts of aflatoxin. In the Patulin production authors showed that mild stress imposed by abiotic factors induced patulin production, but higher stress was inhibitory (Baert *et al.*, 2007). Similar effects were also reported by Schmidt-Heydt *et al.*, 2008, 2010 and Jurado *et al.*, 2008 for mycotoxigenic *Fusarium* and *Penicillium* species. It may be that although the gene cluster is expressed

above the basal level other post-transcriptional mechanisms impair aflatoxin biosynthesis. This mechanism might act at the stage of translation, e. g. a reduction of translation or at the protein level, e. g. an inhibition of enzyme activity by some kind of protein modification. Alternatively at the metabolic level the concentration of precursors or other metabolites required might be suboptimal (Schmidt-Heydt *et al.*, 2008; Sorensen *et al.*, 2009; Schmidt-Heydt *et al.*, 2010).

REFERENCIAS

- Abarca, M., Accensi, F., Cano, J. & Cabañes, F.(2004).Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*86, 33–49.
- Baert, K., Devlieghere, F., Flyps, H., Oosterlinck, M., Ahmed, M., Rajković, A., Verlinden, B., Nicolaï, B., Debevere, J. & De Meulenaer, B.(2007). Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology*119, 170–181.
- Blackburn, C.(2006).*Food spoilage microorganisms*. Cambridge, UK: Woodhead.
- Criseo, G., Bagnara, A. & Bisignano, G.(2001).Differentiation of aflatoxin-producing and non-producing strains of *Aspergillus flavus* group. *Letters in Applied Microbiology*33, 291–295.
- Esteban, A., Abarca, M., Bragulat, M. & Cabañes, F.(2006).Effect of pH on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. *Food Addit Contam*23, 616–622.

- García, D., Ramos, A., Sanchis, V. & Marín, S.(2011). Is intraspecific variability of growth and mycotoxin production dependent on environmental conditions? A study with *Aspergillus carbonarius* isolates. *International Journal of Food Microbiology*144, 432–439.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A. & Battilani, P.(2011). Growth and aflatoxin production of an Italian strain of *Aspergillus flavus*: influence of ecological factors and nutritional substrates. *World Mycotoxin Journal*4, 425–432.
- González Salgado, A.(2010).*Diagnóstico y control de especies de ‘ Aspergillus’ productoras de ocratoxina A*. Universidad Complutense de Madrid.
- Heenan, C., Shaw, K. & Pitt, J.(1998). Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *Journal of Food Mycology*1, 67–72.
- Hong, S. & Linz, J.(2008). Functional expression and subcellular localization of the aflatoxin pathway enzyme Ver-1 fused to enhanced green fluorescent protein. *Applied and environmental microbiology*74, 6385.
- Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Veracruz. (2005). Veracruz - Coatepec.
- Jayashree, T. & Subramanyam, C.(2000). Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radical Biology and Medicine*29, 981–985.

- Jurado, M., Marín, P., Magan, N. & González-Jaén, M.(2008).Relationship Between Solute and Matric Potential Stress, Temperature, Growth, and FUM1 Gene Expression in Two *Fusarium Verticillioides* Strains from Spain. *Appl Environ Microbiol*74, 2032–2036.
- Karolewicz, A. & 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.
- Klich, M.(2002).*Identification of common Aspergillus species*. Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Kohut, G., Ádám, A., Fazekas, B. & Hornok, L.(2009). N-starvation stress induced FUM gene expression and fumonisin production is mediated via the HOG-type MAPK pathway in *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology*130, 65–69.
- Lin, M. & Dianese, J.(1976). A coconut agar medium for rapid detection of anatoxin production by *Aspergillus* spn. *Phytopathology*66, 1466–1469.
- López, A. & Soriano, J.(2007). Ocratoxina a. In *Micotoxinas en alimentos*. Edited by J. Soriano. Ediciones Díaz de Santos.
- Martins, M. L., Martins, H. M. & Gimeno, A.(2003).Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). *Food Additives and Contaminants*20, 1127–1131.

- Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M. & Ueno, Y.(1997).Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. *Food and Agricultural Immunology*9, 77–83.
- O’Callaghan, J., Caddick, M. & Dobson, A.(2003). A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology*149, 3485–3491.
- O’Callaghan, J., Stapleton, P. & Dobson, A.(2006). Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genetics and Biology*43, 213–221.
- O’Brian, G., Georgianna, D., Wilkinson, J., Yu, J., Abbas, H., Bhatnagar, D., Cleveland, T., Nierman, W. & Payne, G.(2007). The effect of elevated temperature on gene transcription and aflatoxin biosynthesis. *Mycologia*99, 232–239.
- Ochiai, N., Tokai, T., Nishiuchi, T., Takahashi-Ando, N., Fujimura, M. & Kimura, M.(2007). Involvement of the osmosensor histidine kinase and osmotic stress-activated protein kinases in the regulation of secondary metabolism in *Fusarium graminearum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*363, 639–644.
- Oviedo, M., Ramirez, M., Barros, G. & Chulze, S.(2011). Influence of water activity and temperature on growth and mycotoxin production by *Alternaria alternata* on irradiated soya beans. *International Journal of Food Microbiology*149, 127–132.

- Pitt, J. & Hocking, A.(2009).*Fungi and Food Spoilage*. Springer.
- Ramos, A., Labernia, N., Marín, S., Sanchis, V. & Magan, N.(1998). Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. *International Journal of Food Microbiology*44, 133–140.
- Samson, R. & Pitt, J.(2000).*Integration of modern taxonomic methods for penicillium and aspergillus classification*. Harwood Academic.
- Samson, R. a., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J. c. & Varga, J.(2007). Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology*59, 129 –145.
- Santos, E. & Vargas, E.(2002). Immunoaffinity column clean-up and thin layer chromatography for determination of ochratoxin A in green coffee. *Food Additives and Contaminants*19, 447–458.
- Schmidt-Heydt, M., Rüfer, C., Abdel-Hadi, A., Magan, N. & Geisen, R.(2010). The production of aflatoxin B1 or G1 by *Aspergillus parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of aflS to aflR expression. *Mycotoxin Research*26, 241–246.
- Schmidt-Heydt, M., Magan, N. & Geisen, R.(2008). Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiology Letters*284, 142–149.
- Sørensen, L., Lametsch, R., Andersen, M., Nielsen, P. & Frisvad, J.(2009). Proteome analysis of *Aspergillus niger*: Lactate added in starch-containing medium can

increase production of the mycotoxin fumonisin B2 by modifying acetyl-CoA metabolism. *BMC Microbiology*9, 255.

Tsubouchi, H., Terada, H., Yamamoto, K., Hisada, K. & Sakabe, Y.(1988).Ochratoxin A found in commercial roast coffee. *J Agric Food Chem*36, 540–542.

Vargas, E., Whitaker, T., Dos Santos, E., Slate, A., Lima, F. & Franca, R.(2006).Design of a sampling plan to detect ochratoxin A in green coffee. *Food Additives and Contaminants*23, 62–72.

Yu, J., Bhatnagar, D. & Ehrlich, K.(2002).Aflatoxin biosynthesis. *Revista iberoamericana de micología*19, 191–200.

Yu, J., Chang, P., Ehrlich, K., Cary, J., Bhatnagar, D., Cleveland, T., Payne, G., Linz, J., Woloshuk, C. & Bennett, J.(2004). Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*70, 1253 –1262.

Yu, J., Fedorova, N., Montalbano, B., Bhatnagar, D., Cleveland, T., Bennett, J. & Nierman, W.(2011). Tight control of mycotoxin biosynthesis gene expression in *Aspergillus flavus* by temperature as revealed by RNA-Seq. *FEMS Microbiology Letters*322, 145–149.

CONCLUSIONES

- Las cepas de *Aspergillus* sección Nigri aisladas son potencialmente toxigénicas puesto que se detectó la presencia de los genes *acarp450* y *AckS9*, de la vía de síntesis de las OT en las mismas.
- Las cepas de *Aspergillus* sección Flavi aisladas son potencialmente toxigénicas puesto que se detectó la presencia de los genes *nor*, *ver*, *omt* y *aflR* de la vía de síntesis de las AF en las mismas.

- La cepa 23 de *Aspergillus* sección Nigri tiene un amplio rango de crecimiento bajo condiciones extremas de pH y a_w , por lo tanto posee potencial de ser utilizada en la industria.
- A partir de las 48 horas de crecimiento se activó la vía de síntesis de las OT en la cepa de *A.* sección Nigri pre seleccionada bajo todas las condiciones propuestas en el experimento.
- A las 72 horas de crecimiento se activó la vía de síntesis de las AF en los testigos, tanto de la cepa Referencia como la 51 de café, a pH 7 y a_w 99%; y bajo la condición pH 4.5 y a_w 0.99% en la cepa 51.
- Debido a que se considera sumamente difícil evitar la síntesis de OT y AF sin alterar seriamente el proceso de beneficio del café, se deben buscar alternativas de control anteriores a este proceso y realizar investigaciones concernientes al proceso de infección de *Aspergillus* en el cultivo de café.

