

# IDENTIFICATION OF FUNGI AND MYCOTOXINS ASSOCIATED TO COFFEE BEANS (*Coffea* L.) IN CHIAPAS, MEXICO

## IDENTIFICACIÓN DE HONGOS Y MICOTOXINAS ASOCIADAS A GRANOS DE CAFÉ (*Coffea* L.) EN CHIAPAS, MEXICO

Garrido-Ramírez, E.R.<sup>1\*</sup>; Hernández-Gómez, E.<sup>1</sup>; Espinosa-Paz, N.<sup>1</sup>; Camas-Gómez R.<sup>1</sup>; Quiroga-Madriral, R. R.<sup>2</sup>; Rincón-Espinosa M.P.<sup>2</sup>; Farrera-Ruiz L. D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Centro de Chiapas, Ocozocoautla, Chiapas, México, km 3 Carretera Ocozocoautla-Cintalapa, Ocozocoautla de Espinoza, Chiapas, México. <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Chiapas. Campus V. Carretera Ocozocoautla-Villaflora, Chiapas, México. <sup>3</sup>Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, km 29020, Carretera Panamericana 1080, Boulevares, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

\*Autor de correspondencia: garrido.eduardo@inifap.gob.mx

### ABSTRACT

**Objective:** To identify the mycobiota associated to coffee beans (*Coffea* sp.) collected in the state of Chiapas, Mexico, as well as the incidence and levels of contamination by total aflatoxins and ochratoxin A.

**Design/methodology/approach:** To obtain representative samples of coffee beans, visits were made to the main producing and storage areas in seven regions of Chiapas, from March 2006 to December 2007. From each sample, 100 grains were taken, sterilized and sown in PDA medium. The isolated fungi were identified at genus or species level. The identification of mycotoxins was performed by ELISA and the Ridasoft Win Software version 1.45 was used for their quantification.

**Results:** Twenty-five genera/species of fungi were identified, with *Aspergillus* being the prevalent genus, followed by *Penicillium*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Rhizopus*, *Helminthosporium* and *Pestalotia*. *A. niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus* and *A. clavatum* were identified. There was a difference in the incidence of fungi between grain type and sampling regions. Regarding mycotoxins, there were differences according to type of grain and origin of the sample. Total aflatoxins were not found at high levels, but high levels were found for ochratoxin A.

**Study limitations/implications:** Total aflatoxins in coffee do not show levels of risk to health, but ochratoxin A is present in risky levels for human health.

**Findings/conclusions:** The incidence of fungi and contamination with mycotoxins is variable, depending on the type of coffee bean, region and year of sampling.

**Keywords:** Diagnosis, aflatoxins, ochratoxin A, food safety.

## RESUMEN

**Objetivo:** Identificar la microbiota asociada a granos de café (*Coffea* sp.) recolectados en Chiapas, México, así como la incidencia y niveles de contaminación por aflatoxinas totales y ocratoxina A.

**Diseño/metodología/aproximación:** Para obtener muestras representativas de granos de café, se realizaron recorridos por las principales zonas productoras y de acopio en siete regiones de Chiapas, de marzo del 2006 a diciembre del 2007. De cada muestra se tomaron 100 granos, se esterilizaron y sembraron en medio PDA. Los hongos aislados se identificaron a nivel de género o especie. La identificación de micotoxinas se realizó mediante ELISA y para su cuantificación se utilizó el Software Ridasoft Win version 1.45.

**Resultados:** Se identificaron 25 géneros y especies de hongos, siendo *Aspergillus* el género prevalente, seguido de *Penicillium*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Rhizopus*, *Helminthosporium* y *Pestalotia*. Se identificó a *A. niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus* y *A. clavatum*. Hubo diferencia en la incidencia de hongos entre tipo de grano y regiones de muestreo. Respecto a micotoxinas, hubo diferencias según tipo de grano y origen de la muestra. Las aflatoxinas totales no se encontraron en niveles altos, pero para ocratoxina A, se registraron niveles altos.

**Limitaciones del estudio/implicaciones:** Las aflatoxinas totales en café no muestran niveles de riesgo para la salud, pero la ocratoxina A, está presente en niveles de riesgo para la salud humana.

**Hallazgos/conclusiones:** La incidencia de hongos y la contaminación con micotoxinas es variable, dependiendo del tipo de grano de café, región y año de muestreo.

**Palabras clave:** Diagnóstico, Aflatoxinas, Ocratoxina A, Inocuidad alimentaria.

Los hongos del género *Aspergillus* pueden crecer en diferentes sustratos, incluyendo granos de café (*Coffea* sp.). Estos son susceptibles a la invasión de hongos en cualquier momento de su producción, procesamiento, transporte y almacenamiento. En los productos almacenados, los factores que determinan el crecimiento de *Aspergillus* y la producción de aflatoxinas son la humedad y temperatura de almacenamiento. Una humedad relativa de 80-85% frente a una humedad del grano cercana a 17% y temperaturas de 14 a 35 °C son las condiciones ideales para la producción de aflatoxinas (Osweiler *et al.*, 1985). Estas condiciones son similares a las que se presentan comúnmente en zonas tropicales como Chiapas, México, tanto en las zonas de producción como de almacenamiento del grano.

La Ocratoxina A (OTA) es una micotoxina nefrotóxica y carcinogénica, capaz de causar efectos adversos en la salud de animales y su productividad, (Leeson *et al.*, 1995). También juega un papel en algunas enfermedades de humanos y recientemente se ha clasificado en el grupo 2B por la Agencia Internacional de Investigación para el cáncer (IARC, 1993). La toxicología general de la OTA fue revisada por la Organización Mundial de la Salud, (WHO, 2001). La presencia de OTA en productos vegetales fue reportada por primera vez en 1969 en muestras de maíz (Shotwell *et al.*, 1969). Estudios posteriores han mostrado que esta micotoxina se puede encontrar a nivel mundial en granos de cereales, de café y otros productos (Krogh, 1987). En granos verdes de café se reportó por primera vez en 1974 y posteriormente se ha demostrado

## INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por cepas toxigenicas de varios géneros y especies de hongos. Los factores más importantes asociados con el crecimiento de los hongos y la producción de micotoxinas son la humedad ambiental relativa, humedad del grano, disponibilidad de agua en el grano, temperatura de almacenamiento, ventilación y niveles de oxígeno atmosférico, integridad de la cutícula del grano y presencia de material extraño en el grano (Lacey, 1989). Las aflatoxinas son el grupo de micotoxinas más importantes desde el punto de vista de salud pública, ya que se consideran agentes carcinogénicos potentes. Constituyen un grupo de metabolitos heterocíclicos sintetizados principalmente por los hongos *Aspergillus flavus* (Link) y *Aspergillus parasiticus* (Spear), (Smith y Ross, 1991). Aun cuando existen diversos tipos de aflatoxinas, la más frecuentemente sintetizada por estos hongos es la aflatoxina B1, que se caracteriza por ser la más tóxica. La exposición de animales a aflatoxinas, especialmente la aflatoxina B1, puede resultar en hepatotoxicosis, mutagenesis, inmunosupresión, teratogénesis o carcinogénesis (Leeson *et al.*, 1995).

su presencia en café tostado (Studer-Rohr et al., 1995) y café soluble (Pittet et al., 1996). En Chiapas, el cultivo del café es importante, tanto por la superficie plantada como por su papel en la generación de empleos (100,000 empleos al año). Anualmente se cosechan 235,761 ha, con una producción de 343,772 toneladas (Siap, 2017; Secretaria del Campo, 2010). Al igual que otros cultivos, el café está expuesto a la infección de una diversidad de hongos, tanto en el campo como en el almacén; algunos de estos hongos tienen el potencial de ser micotoxigenicos. Trabajos preliminares han puesto de manifiesto la presencia de hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium* así como de aflatoxinas y ocratoxinas (Garrido et al., 2007), lo cual puede constituirse en un problema de salud pública y de comercialización.

Los hongos que producen aflatoxinas y ocratoxinas son comunes en climas cálidos y húmedos (Beardall y Miller, 1994), sin embargo, existe poca información sobre la contaminación por estas micotoxinas en café en Chiapas, México, por lo que el objetivo del presente estudio fue identificar la microbiota asociada a granos de café recolectados en dicho estado, así como la incidencia y niveles de contaminación por aflatoxinas totales y ocratoxina A en dichos granos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras de granos de café

Para obtener muestras representativas de café (*Coffea arabica* L.; *Coffea canephora* L.), se realizaron recorridos por las principales zonas productoras y de acopio en el estado, seleccionando almacenes representativos, en las regiones Soconusco, Costa, Centro, Altos, Frai-

lesca, Selva, y Norte del estado de Chiapas. Se realizaron 19 recorridos en 21 municipios, obteniéndose un total de  $n=229$  muestras de grano de café.

Las fuentes de recolecta variaron desde productores individuales, que conservan su café para su consumo, hasta almacenes y comercializadoras, con una buena infraestructura de almacenamiento, lo que muestra la variación en las condiciones en que se acopia y comercializan el café. En relación con el tipo de grano recolectado (Cuadro 1), el mayor número de muestras fueron de café en pergamino convencional con  $n=108$ , y  $n=21$  de pergamino orgánico, lo cual representó el 56.2% del total recolectado. La siguiente presentación importante por su frecuencia fue de café en oro, en sus presentaciones de convencional, orgánico o robusta, las cuales representaron el 24.1%, y el resto fue de café en cereza.

### Aislamiento e identificación de hongos asociados a los granos de café

Las muestras recolectadas se conservaron en bolsas de papel, en el Laboratorio de Fitopatología, del Campo Experimental Centro de Chiapas (CECECH), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en Ocozocoautla, Chiapas, en donde se realizaron aislamientos de los hongos asociados a los granos de café colectados, con énfasis en hongos micotoxigénicos (*Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp.), para lo cual se siguieron técnicas estandarizadas (Agrios, 2001; Romero-

Cova, 1988); se tomó una muestra de 100 granos por muestra, previamente esterilizados y se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA). Las cajas se incubaron a temperatura ambiente durante una semana, al cabo de la cual se realizaron las observaciones de los hongos presentes; se realizaron transferencias y preparaciones temporales para hacer observaciones al microscopio y la identificación se realizó a nivel de género, usando claves taxonómicas y manuales especializados (Barnett y Hunter, 1998; Christensen, 1982; Farr et al., 1995; Klick y Pitt, 1988; Leslie y Summerell, 2006; Raper y Fennell, 1965). Se realizaron transferencias para purificar colonias, obteniéndose cultivos monospóricos de cepas representativas de *Aspergillus* spp., y *Penicillium* spp. Los cultivos monospóricos identificados se transfirieron a tubos con PDA en plano inclinado y tapados con algodón y parafilm, se incubaron por 8 d, después de lo cual se les agregó aceite mineral esterilizado, para su conservación a 4 °C.

### Identificación y cuantificación de micotoxinas

De los granos recolectados se tomó una submuestra para el análisis de aflatoxinas totales y ocratoxina A. La

**Cuadro 1.** Muestras de café (*Coffea* sp.) recolectadas.

Tipo	Tamaño de muestra	%
Cerezo	21	9.2
Cerezo borbón	1	0.4
Cerezo robusta	23	10.0
Oro	45	19.7
Oro Orgánico	8	3.5
Oro robusta	2	0.9
Pergamino	108	47.1
Pergamino orgánico	21	9.2
Total	229	100



técnica usada fue la de ELISA, mediante el uso de juegos de reactivos comerciales RIDASCREEN FAST para Aflatoxinas totales y para ocratoxina A, de la compañía R-Biopharm, siguiendo las instrucciones del fabricante. Debido a las características de los granos de café, fue necesario durante la extracción, emplear columnas de inmunoafinidad específicas para aflatoxinas totales o para ocratoxina A, de la compañía R-Biopharm antes de realizar la prueba de ELISA, para su clarificación (Pittet et al., 1996). Para la lectura de la absorbancia (a 450 nm), se uso un espectrofotómetro de micropozos marca BIOTEK modelo EL301. Para la determinación de la concentración de micotoxinas, se utilizó el Software Ridasoft Win version 1.45 de R-Biopharm.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento e identificación de hongos asociados a los granos de café

En general, se observó una amplia variabilidad de hongos asociados a los granos de café, de los cuales se aislaron 21 hongos diferentes en una primera fase, y 25 en una segunda, cuya diferencia entre fases fue de un año. El Cuadro 2 presenta los datos de frecuencia y porcentaje promedio de contaminación por muestra. Se registraron hongos como *Aspergillus niger* y *A. flavus* que son los mas frecuentes y con mayor contaminación en ambas fases, pero hay otros cuya presencia es variable según el

año, como, por ejemplo, *A. ochraceus* que en la primera fase se aisló en el 22% de las muestras con una contaminación del 1.1%; sin embargo, en la segunda fase no se logró aislar en las muestras recolectadas.

Los principales hongos asociados al grano del café son los del género *Aspergillus*, dentro de los que sobresalen *A. niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus* y *A. clavatum* (Figura 1). Asimismo, se aislaron otros tres tipos de *Aspergillus*, sin identificar la especie. Frecuentemente se aisló a hongos del género *Fusarium* y *Rhizopus* (en 44.2% y 38.1% de las muestras), aunque en niveles muy bajos (2.0% y 3.2% de contaminación del grano). Esto coincide con estudios sobre hongos micotoxigenicos en café, reportados por Rosas-Morales et al. (2003).

### Identificación y cuantificación de micotoxinas

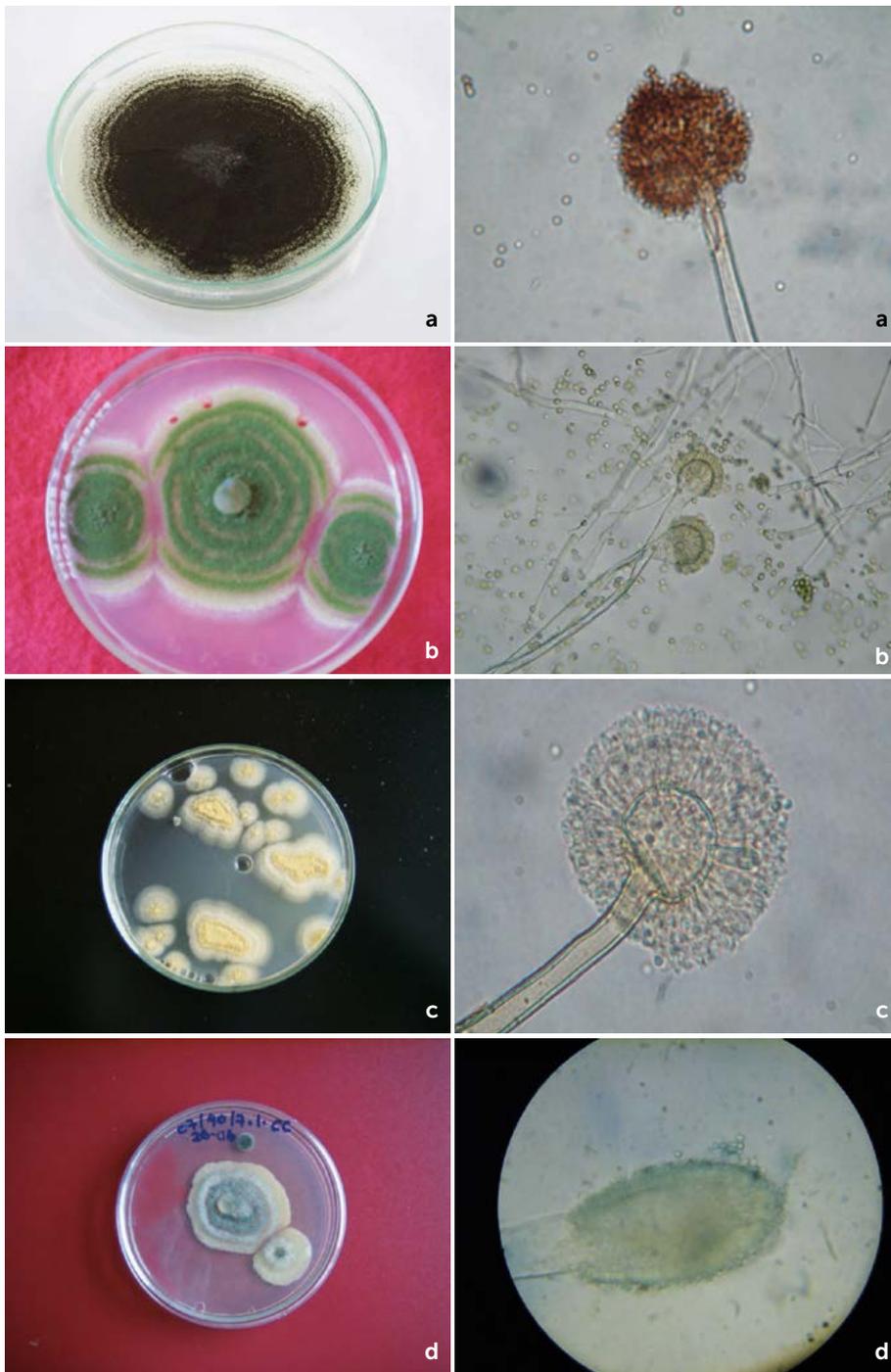
**Aflatoxinas totales.** A nivel general, 40 de las muestras analizadas no presentaron contaminación por aflatoxinas totales (Figura 2), y con la excepción de tres muestras que presentaron niveles altos (entre 15 y 45 ppb), la mayoría tiene valores bajos, siendo la mayor proporción las muestras con un contenido de aflatoxinas entre 1.7 y 5 ppb, lo cual es un nivel muy bajo de contaminación y no representa un riesgo a la salud. Al observar la contaminación del café por aflatoxinas totales por año (fase), en general se tuvo una mayor contaminación en

**Cuadro 2.** Frecuencia de hongos aislados en café y porcentaje promedio de contaminación por muestra colectada, durante dos años de observaciones.

Hongo	Primera fase		Segunda fase	
	% muestras <sup>1</sup>	% Contaminación <sup>2</sup>	% muestras <sup>1</sup>	% Contaminación <sup>2</sup>
<i>Aspergillus niger</i>	82.3	58.0	89.0	25.3
<i>Aspergillus flavus</i>	39.8	5.8	36.0	1.5
<i>Aspergillus ochraceus</i>	22.1	1.1	0.0	0.0
<i>Aspergillus clavatum</i>	11.5	0.4	5.0	0.15
<i>Aspergillus</i> sp. <sup>1</sup>	0.0	0.0	2.0	0.01
<i>Aspergillus</i> sp. <sup>2</sup>	0.0	0.0	4.0	0.01
<i>Aspergillus</i> sp. <sup>3</sup>	0.0	0.0	4.0	0.2
<i>Rhizopus</i> sp.	38.1	3.2	33.0	1.1
<i>Mucor</i> sp.	0.0	0.0	23.0	1.1
<i>Fusarium</i> sp.	44.2	2.0	28.0	0.6
<i>Penicillium</i> sp. <sup>1</sup>	4.4	1.7	30.0	1.1
<i>Penicillium</i> sp. <sup>2</sup>	14.3	1.3	0.0	0.0
<i>Curvularia</i> sp.	21.2	1.4	6.0	0.01
<i>Helminthosporium</i> sp.	4.4	0.2	1.0	0.01
<i>Monilia</i> sp.	0.0	0.0	2.0	0.12

<sup>1</sup> Porcentaje de muestras con este hongo, del total de muestras recolectadas.

<sup>2</sup> Porcentaje promedio de contaminación por muestra (en 100 granos por muestra).



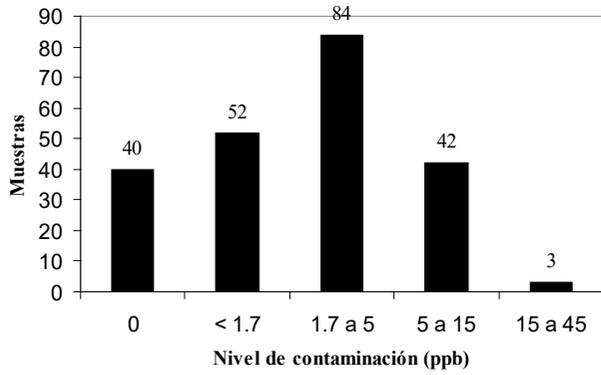
**Figura 1.** Colonia en medio PDA y microfotografías (40X) de conifóforos con cabezas de conidios de *Aspergillus niger* (a), *Aspergillus flavus* (b), *Aspergillus ochraceum* (c) y *Aspergillus clavatus* (d).

la primera fase que en la segunda (Figura 3). En la primera fase, se registró gran número de muestras con niveles de contaminación de 1.7 a 5 ppb de aflatoxinas, en comparación con el siguiente año; en los niveles de aflatoxinas menor a 1.7 ppb y de 15 a 45 ppb, el número de muestras fue muy similar para los dos años. Asimismo, al revisar la contaminación por región donde se recolectaron las muestras, se observó que la región del Soconusco fue donde las muestras tuvieron mayor contaminación (Figura 4), a diferencia de la Sierra, la Selva y los Altos, que presentaron los menores niveles de contaminación por estas toxinas.

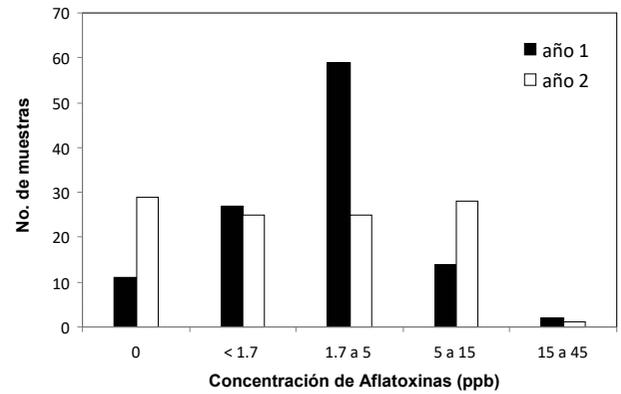
Un análisis más detallado se presenta en el Cuadro 3, en la cual se indica el nivel de contaminación por región y por año. En el primer año de muestreo, en el Soconusco se recolectaron las muestras con niveles más altos, dos de ellas fueron altas en su concentración de aflatoxinas totales. Esta situación se repitió para el segundo año, en el cual una muestra de esta región presentó los niveles más altos de contaminación, seguida por la región centro. Vale la pena destacar que, en la Frailesca, en la Selva y en los Altos se recolectaron las muestras más limpias, sin contaminación o con niveles muy bajos de aflatoxinas.

Respecto a la contaminación por tipo de grano y año de recolecta, el Cuadro 4 presenta los promedios de contaminación cuantificados, se puede ver que hubo diferencia entre los años, con más contaminación en el 2006 que en el 2007; asimismo hubo diferencia entre tipos de grano, con más contaminación en pergamino en el año 1, y en cerezo robusta en el año dos.

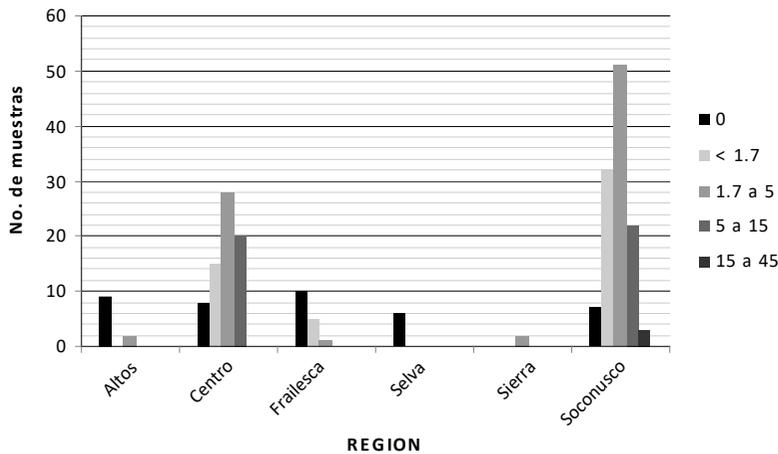
**Ocratoxina A.** En el caso de esta micotoxina, todas las muestras analizadas presentaron una contaminación mayor del estándar más alto del juego de reactivos (40 ppb) utilizado, lo cual debe ser motivo de investigación y confirmación con otras técnicas más precisas, ya que esto representa un factor de riesgo a la salud humana, así como de problemas en la comercialización. Estos resultados confirman lo observado en otras partes del mundo (Levy et al., 1974; Sotwell et al., 1969; y Studer-Rohr et al., 1995) o en México, (Garrido et al., 2007); Rosas-Morales et al., 2003), que manifiestan el riesgo de contaminación en granos de café con esta micotoxina y que ha



**Figura 2.** Contaminación con aflatoxinas totales en granos de *Coffea* sp., recolectados en Chiapas, México.



**Figura 3.** Niveles de contaminación por aflatoxinas en granos de *Coffea* sp., según año de muestreo.



**Figura 4.** Niveles de contaminación por aflatoxinas en granos de *Coffea* sp., según la región de muestreo.

mientras que el 78.35% de los aislamientos de *Aspergillus carbonarius* producen altas concentraciones de OTA (>25 ppb) (Tjamos *et al.*, 2004). Por otro lado, no se encontró una correlación entre la similaridad genética de cepas de *A. niger* y *A. carbonarius* estudiadas y el potencial de productor de OTA, aunque se considera a *A. carbonarius* uno de los principales agentes productores de OTA en café y uva (Schmidt *et al.*, 2004). Considerando que en este estudio se observó una frecuencia de 82 al 89% de muestras de café de las cuales se aisló *Aspergillus niger*, y las altas concentraciones de OTA observadas, es importante considerar este riesgo para la salud y proponer

medidas para reducir tanto la infección como la producción de OTA de café en Chiapas.

medidas para reducir tanto la infección como la producción de OTA de café en Chiapas.

Respecto a las especies de *Aspergillus* productoras de OTA, algunos estudios han mostrado producción en todas las especies evaluadas, independientemente del cultivo (Varga *et al.*, 1996), o solo en algunas especies de *Aspergillus*, dependiendo del hospedante del cual se aísla; así, por ejemplo, ninguna cepa de *Aspergillus niger* aislada de higo produce OTA (Medina *et al.*, 2005), mientras que en otros estudios mencionan que solo 8.29% de aislamientos de *A. niger* obtenidos de uva (*Vitis vinífera* L.) en Grecia producen altas concentraciones de OTA,

**Cuadro 3.** Niveles de contaminación por aflatoxinas en granos de café (*Coffea* sp.) según región y año de muestreo.

Fase/año	Región	AFLA (ppb)					Total
		0	< 1.7	1.7 a 5	5 a 15	15 a 45	
1	Altos	0	0	2	0	0	2
	Centro	0	5	23	2	0	30
	Frailesca	7	5	1	0	0	13
	Sierra	0	0	2	0	0	2
	Soconusco	4	17	31	12	2	66
	Subtotal por año	11	27	59	14	2	113
2	Altos	9	0	0	0	0	9
	Centro	8	10	5	18	0	41
	Frailesca	3	0	0	0	0	3
	Selva	6	0	0	0	0	6
	Soconusco	3	15	20	10	1	49
	Subtotal por año	29	25	25	28	1	108
Total	40	52	84	42	3	221	

## CONCLUSIONES

Existen diferencias en la incidencia de hongos entre tipos de grano de café, regiones y año de muestreo. Se aislaron 25 géneros diferentes de hongos, siendo *Aspergillus* el género más frecuente, seguido de: *Penicillium*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Rhizopus* y *Helminthosporium*. Existen diferencias en los niveles de micotoxinas observados. Las aflatoxinas totales no muestran niveles de riesgo para la salud en café, pero la ocratoxina A, está presente en niveles de riesgo a la salud en café.

## LITERATURA CITADA

- Agrios G.N. (2001) Fitopatología. 2ª. Ed. Trad. M. Guzmán Ortiz. Ed. Limusa. México. 838 p.
- Barnett H.L., and Hunter B.B. (1998) Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. APS Press, The American Phytopathological Society, St Paul, Minn, USA. 218 pp.
- Beardall J., and Millar J.D. (1994) Natural occurrence of mycotoxins other than aflatoxin in Africa, Asia and South America. *Mycotoxin Research*. 10: 21-40
- Christensen M (1982) The *Aspergillus ochraceus* group: two new species from western soils and a synoptic key. *Mycologia* 74:210–225.
- FAO. (2006) Enhancement of Coffee Quality through the Prevention of Mould Formation. Final Technical Report- Project CFC/ICO/06 - GCP/INT/743/CFC, FAO Roma, Italy, 336 pp. (disponible en [www.coffee-ota.org](http://www.coffee-ota.org))
- Farr D.F., Bills G.F., Chamuris G.P., and Rossman A.Y. (1995) Fungi of Plants and plants products in the United States. APS Press, The American Phytopathological Society, St Paul, Minn, USA. 1252 pp.
- Garrido-Ramírez E.R., Camas-Gomez R., Espinosa-Paz N., Quiroga-Madriral R., Hernández-Gómez E., Gómez B.R. y Farrera R.D. (2007) Micobiota toxigena de ocratoxina A y aflatoxinas asociada a granos de café en Chiapas, México. Memorias Congreso Latinoamericano y del Caribe de Fitopatología IX Congreso Internacional/XXXIV Congreso Nacional de Fitopatología, Soc. Mexicana de Fitopatología, Cancún, Q. Roo, p 43.
- IARC (1993) Some Naturally occurring substances: Foods Items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol 56, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 489-521.
- INEGI (2002) Anuario estadístico 2001. INEGI, México, DF. 300 pp.
- Klich M.A, and Pitt JI (1988) A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Division of Food Processing, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), Canberra, Australia.
- Klich, M.A, and J.I. Pitt. 1994. Laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Division of Foods Processing, North Ryde, Australia.
- Krogh P. (1987) Ochratoxins in food. In: Krogh, P. (ed) Mycotoxins in Food. Academic Press, London, pp. 97-121.
- Lacey J. (1989) Prevention of mould growth and mycotoxin production through control of environmental factors. In: Nattori, S., Hashimoto, K. and Ueno, Y. (Eds.), Mycotoxins and Phycotoxins'88. Elsevier. Amsterdam. Pp 161-169.
- Leeson S., Diaz G.J., Summers J.D. (1995) Ochratoxins. In: Poultry metabolic Disorders and Mycotoxins. University Books, Guelph, pp.227-248.
- Leslie J.F. and Summerell B.A. (2006) The Fusarium Laboratory Manual. First Edition. Blackwell Publishing, Iowa USA. 388 pp.
- Levy C.P., Trenck H.L., Mohr H.K. (1974) Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. *Journal of AOAC* 57:866-871.
- Medina A., Mateo R., Lopez-Ocaña L., Valle-Algarra F.M., and Jimenez M. (2005) Study of Spanish Grape Mycobiota and Ochratoxin A Production by Isolates of *Aspergillus tubingensis* and Other Members of *Aspergillus* Section Nigri. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8): 4696-4702.
- Oswell G.D., Carson T.L., Buck W.E. and Van Gelder G.A. (1985) Clinical and Diagnostic Veterinary Toxicology. 3er ed. Kendall/Hunt. Iowa USA. pp 409-450.
- Pittet A., Tornare D., Huggett A., and Viani R. (1996) Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44:3564-3569.

**Cuadro 4.** Niveles de contaminación por aflatoxinas en granos de café (*Coffea* sp.) según el año de muestreo y tipo de grano.

Fase/año	Grano	AFLA (ppb)					Total
		0	< 1.7	1.7 a 5	5 a 15	15 a 45	
1	Cerezo	2	6	5	0	1	14
	Cerezo robusta	0	1	4	2	0	7
	Oro	2	6	12	2	0	22
	Oro orgánico	0	1	3	0	0	4
	Pergamino	6	13	33	9	1	62
	Pergamino orgánico	1	0	2	1	0	4
	Subtotal por año	11	27	59	14	2	113
2	Cerezo	2	3	1	3	0	7
	Cerezo borbón	0	1	0	0	0	1
	Cerezo robusta	1	1	3	11	0	16
	Oro	5	7	5	3	1	21
	Oro robusta	1	0	1	0	0	2
	Oro orgánico	0	3	0	1	0	4
	Pergamino	15	9	8	8	0	40
	Pergamino orgánico	5	1	7	4	0	17
	Subtotal por año	29	25	25	30	1	108
	Total	40	52	84	44	3	221

- Raper K.B., and Fennell D.I. (1965) The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md. 686 pp.
- Romero-Cova, S. (1988) Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 347 p.
- Rosas-Morales M., Trejo-Estrada S.R., Cerezo-Figueroa M. (2003) Detección de hongos productores de ocratoxina A en granos de café verde almacenado. Memoria del I Simposium Panamericano de Micotoxinas para la industria. Sociedad Latinoamericana de Micotoxicología. México, D.F., p.50.
- Schmidt H., Taniwaki M.H., Vogel R.F. and Niessen L. (2004) Utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in green coffee samples. *Journal of Applied Microbiology* 97: 899–909
- Secretaría del Campo (2010) Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Consultado via internet [www.agrochiapas.gob.mx](http://www.agrochiapas.gob.mx) el 23 de septiembre del 2010.
- Shotwell OL, Hesseltine CW, Goulden ML (1969) Note on the natural occurrence of Ochratoxin A. *Journal of AOAC*. 52:818-83
- Smith J.E., and Ross K. (1991) The toxigenic Aspergilli. Pp. 101-118 in: Smith, J.E. and Henderson, R. S. (Eds). *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Studer-Rohr I., Dietrich D.R., Schlatter J., and Schaltter C. (1995) The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food and Chemical Toxicology*. 33:341-355
- Tjamos S.E., Antoniou P.P., Kazantzidou A., Antonopoulos D.F., Papageorgiou I., and Tjamos E.C. (2004) *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in Corinth Raisin and Wine-Producing Vineyards in Greece: Population Composition, Ochratoxin A Production and Chemical Control. *Journal of Phytopathology* 152, 250–255
- Varga J., Evei E., Rinyu E., Teren J., and Kozakiewicz Z. (1996). Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (12): 4461–4464
- WHO (2001) Safety Evaluation of certain mycotoxins in food. *Food Additives Series: 47*. World Health Organization, Geneva, pp. 281-415.

