

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**TESIS PARA OBTENER
EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERA AGROINDUSTRIAL**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS CON
POTENCIAL MICOTOXIGÉNICO EN GRANOS DE
CACAO**

Autora: Bach. Dani Baca Maldonado

Asesores:

M.Sc. Aline Camila Caetano

PhD. Pedro Javier Mansilla Córdova

Registro: (.....)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2022

DEDICATORIA

A MIS PADRES: IRMA Y SEGUNDO ABELARDO

Por todo el amor incondicional y guiar mi camino en todo momento, por inculcarme el deseo de superación, apoyarme en mis éxitos y equivocaciones, por darme de su máximo esfuerzo para poder cumplir mis sueños. A mi padre por todas las ocasiones que me ayudó, a mi madre mi más grande apoyo e inspiración ya que sin ella no lo habría logrado, estoy más que agradecida con ustedes.

A MIS HERMANOS:

Llenner Baca Maldonado, Toni Baca Maldonado, Percy Baca Maldonado, Quevin Baca Maldonado, Elmer Baca Maldonado e Irlandelly Baca Maldonado por su respaldo y su amistad. Me siento orgullosa de todos ustedes y muy bendecida de tenerlos como hermanos.

AGRADECIMIENTO

A Dios por darnos la salud y la vida y permitirnos seguir cumpliendo nuestros sueños propuestos a pesar de las adversidades.

Al Proyecto Concytec – Banco Mundial “Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica” 8682-PE, a través de su unidad ejecutora ProCiencia [contrato número 031-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV], con el cual se ejecutó el subproyecto "Implementación de técnicas de diagnóstico de enfermedades en Pitahaya (*Hylocereus* spp.), Tara (*Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze) y Azucena (*Lilium* spp.) como parte de la creación de la Clínica Fitopatológica en la región Amazonas”, también conocido como “Clínica Fitopatológica” y que hizo posible el financiamiento de la tesis, así como el incentivo recibido durante 12 meses.

Al Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDESCES), por el apoyo de todos los que lo conforman, incluyendo a su director, el Dr. Segundo Manuel Oliva Cruz, así como por la infraestructura que hizo posible la ejecución de este trabajo.

A la M.Sc. Aline Camila Caetano y el PhD. Pedro Javier Mansilla Córdova, por su asesoría y apoyo incondicional con conocimientos y apoyo emocional durante el desarrollo del trabajo.

A Llunely Yaselit Guimac Cedillo y a Miguelina Zayda Silva Zuta, por todo apoyo brindado, principalmente en los trámites administrativos dentro del proyecto de la Clínica Fitopatológica.

A los profesores de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, de la UNTRM, por su conocimiento brindado durante los años de estudio.

A Esteffany Grandez Yoplac y Fiorela Gaslac Culqui por su amistad por todos los años compartidos durante la formación profesional y a todos los amigos(as) conquistados que ayudaron en la ejecución de este trabajo.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ
DE MENDOZA DE AMAZONAS**

**Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI
Rector**

**Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN
Vicerrector Académico**

**Dra. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN
Vicerrectora de Investigación**

**Dr. ERICK ALDO AUQUIÑIVÍN SILVA
Decano de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias**

VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-K

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (x)/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Aislamiento e Identificación de Hongos con Potencial Mitotóxico en Granos de Cacao del egresado Dani Baca Maldonado de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de esta Casa Superior de Estudios.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 21 de octubre del 2021

Aline Carrila Castano
Firma y nombre completo del Asesor
Aline Camila Castano

VISTO BUENO DEL COASESOR DE LA TESIS



ANEXO 3-K

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (X), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada.....

*aislamiento e Identificación de Hongos con
Potencial Micotoxigénico en Granos de Cacao* ;
del egresado *Dani Baca Maldonado*.....

de la Facultad de *Ingeniería y Ciencias Agrarias*.....

Escuela Profesional de *Ingeniería Agroindustrial*.....

de esta Casa Superior de Estudios.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

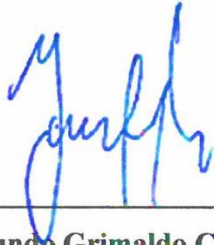
Chachapoyas, *21* de *Octubre* del *2021*

Pedro Javier Mansilla Condora

Firma y nombre completo del Asesor



JURADO EVALUADOR DE LA TESIS



M.Sc. Segundo Grimaldo Chavez Quintana
PRESIDENTE



M.Sc. Grobert Amado Guadalupe Chuqui
SECRETARIO



Ms. Robert Javier Cruzalegui Fernández
VOCAL

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL

PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-O

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS CON POTENCIAL TOXIGÉNICO EN GRANOS DE CACAO

presentada por el estudiante ()/egresado (x) DANI BACA MALDONADO

de la Escuela Profesional de INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

con correo electrónico institucional 7729944642@untrm.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- La citada Tesis tiene 9 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (x) / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- La citada Tesis tiene % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.

Chachapoyas, 09 de NOVIEMBRE del 2021



SECRETARIO
GROBERT AMADO GUADALUPE CHUQUI

VOCAL
ROBERT JAVIER CRUZALEGUI FERNÁNDEZ

PRESIDENTE
SEGUNDO G. CHAVEZ QUINTANA

OBSERVACIONES:

.....
.....

ÍNDICE O CONTENIDO GENERAL

Dedicatoria	ii
Agradecimiento.....	iii
Autoridades de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas	iv
Visto Bueno del Asesor de la Tesis	v
Visto Bueno del Coasesor de la Tesis	vi
Jurado Evaluador de la Tesis	vii
Constancia de Originalidad de la Tesis	viii
Acta de Sustentación de la Tesis	ix
Índice o Contenido General.....	x
Índice de Tablas.....	xii
Índice de Figuras.....	xiii
Resume.....	xiv
Abstract.....	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	16
II. MATERIAL Y MÉTODOS	18
2.1 Lugar de estudio	18
2.2 Procedimiento	18
2.2.1 Obtención de las muestras	18
2.2.2 Siembra directo de las muestras	18
2.2.3 Aislamiento e identificación por microscopía de las especies fúngicas de las muestras.....	19
2.2.4 Evaluación de las características macro y micro morfológicas	19
2.2.5 Realización del microcultivo	20
2.2.6 Inoculación en el medio agar coco (CAM) para evaluar la producción de extrolitos	20
III. RESULTADOS	22
3.1 Porcentaje hongos aislados en granos de cacao.....	22
3.2 Ocurrencia de los aislados de granos de cacao evaluados por etapa	22
3.3 Codificación de los aislados	23
3.4 Crecimiento de aislados en medio MEA y CYA.....	24
3.5 Clave dicotómica para identificación de cepas.....	27

3.6	Detección de hongos con capacidad potencial para producir toxinas con el medio CAM	29
IV.	DISCUSIÓN	31
V.	CONCLUSIONES	34
VI.	RECOMENDACIONES	35
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
	ANEXOS	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Porcentaje de granos infectados en 5 etapas del procesamiento de cacao.....</i>	22
Tabla 2. <i>Porcentaje de aislados obtenidos de 5 etapas del procesamiento de cacao ...</i>	23
Tabla 3. <i>Distribución de códigos para cada aislado obtenido</i>	24
Tabla 4. <i>Detección de la capacidad de producción de toxinas en medio CAM por aislados obtenidos de granos de cacao en 5 etapas de postcosecha</i>	29
Tabla 5. <i>Características observadas en los aislados encontrados en las cinco etapas de procesamiento de los granos de cacao</i>	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Esquema de la distribución de las siembras usadas para la identificación de los aislados de hongos (tomado de Pitt & Hocking, 2009)</i>	20
Figura 2. <i>Colonias de aislados micotoxigénico obtenidos de granos de cacao después de 7 días de incubación a 25 °C. De izquierda a derecha: anverso en medio CYA, reverso en medio CYA, anverso en medio MEA, reverso en medio MEA</i>	25
Figura 3. <i>Micrografías de microcultivo de aislados micotoxigénicos obtenidos de granos de cacao. De izquierda a derecha: conidióforo sin colorante, conidióforo con colorante y conidios (aumento: 40x).....</i>	26
Figura 4. <i>Esquema de identificación de aislados a nivel de genero utilizando la clave dicotómica general de Pitt & Hocking (2009).....</i>	28
Figura 5. <i>Registro de imágenes durante la fase experimental. A: Cajas de fermentación de cacao; B: Muestras recolectadas; C: Desinfección; D: Siembra directa en medio DG18; E: crecimiento de colonias y; F: Evaluación de reverso de placa.....</i>	39
Figura 6. <i>Esquema de identificación de aislados no toxigénicos a nivel de genero utilizando la clave dicotómica general de Pitt & Hocking (2009).....</i>	49
Figura 7. <i>Colonias de aislados no micotoxigénico obtenidos de granos de cacao después de 7 días de incubación a 25 °C. De izquierda a derecha: anverso en medio CYA, reverso en medio CYA, anverso en medio MEA, reverso en medio MEA</i>	50
Figura 8. <i>Micrografías de microcultivo de aislados no micotoxigénico obtenidos de granos de cacao. De izquierda a derecha: cleistotecia sin colorante, cleistotecia con colorante y conidios (aumento: 40x).</i>	52
Figura 9. <i>Micrografías de microcultivo de aislados no micotoxigénico obtenidos de granos de cacao: Conidios (aumento: 40x).....</i>	53
Figura 10. <i>Detección del potencial para producir aflatoxina u ocratoxina por la producción de fluorescencia en medio CAM. Imágenes superiores: Izquierda anversos del aislado toxigénico RA2C1 y de la placa de Petri sin aislado, derecha reversos del aislado toxigénico RA2C1 y de la placa de Petri sin aislado. Imágenes inferiores: Izquierda anversos del aislado no toxigénico RB1C2 y de la placa de Petri sin aislado, derecha reversos del aislado no toxigénico RB1C2 y de placa de Petri sin aislado</i>	54

RESUMEN

El cacao es un producto agrícola cuya calidad final es resultado de múltiples factores, entre los que se destacan las condiciones de postcosecha. En general, los granos del cacao son susceptibles a la contaminación por hongos durante el procesamiento postcosecha. Además de causar alteración en las propiedades sensoriales, los hongos filamentosos en el cacao pueden producir micotoxinas. Las micotoxinas son compuestos tóxicos del metabolismo secundario de algunos hongos. Tanto la aflatoxina como la ocratoxina A se han reportado en el cacao. La invasión de hongos toxigénicos puede presentar una barrera comercial para la exportación de cacao o un riesgo para el mercado interno, que muchas veces absorbe la oferta de productos de menor calidad. Las exportaciones del Perú han aumentado hace algunas décadas y, sin embargo, todavía son escasas las investigaciones relacionadas a los hongos toxigénicos en los granos de cacao. La propuesta de este trabajo fue hacer un sondeo de la presencia de hongos toxigénicos en los granos de cacao producidos en la región Amazonas, como línea base para futuras investigaciones. Para eso, muestras de 5 etapas del procesamiento del cacao fueron recolectadas. Los granos fueron desinfectados superficialmente con solución de hipoclorito de sodio a 0.4% y sembrados en medio Dicloran Glicerol 18%. La habilidad de los aislados para producir aflatoxinas u ocratoxinas fue determinada utilizando la técnica del medio Agar Coco. Ocho hongos aislados, de un total de 20, presentaron potencial toxigénico. Estos resultados de ninguna manera significan que los granos estaban contaminados con micotoxinas, sino que revelan un riesgo potencial para tal. Este trabajo refuerza la importancia de las Buenas Prácticas Agrícolas, así como de las Buenas Prácticas de Manufactura, que buscan disminuir la presencia de microorganismos y sus efectos indeseables.

Palabras clave: *Aspergillus*, postcosecha, clave dicotómica.

ABSTRACT

Cocoa is an agricultural product whose final quality is the result of multiple factors, among which the post-harvest conditions stand out. In general, cocoa beans are susceptible to fungal contamination during post-harvest processing. In addition to causing alteration in sensory properties, filamentous fungi in cocoa can produce mycotoxins. Mycotoxins are toxic compounds of the secondary metabolism of some fungi. Both aflatoxin and ochratoxin A have been reported in cocoa. The invasion of toxigenic fungi can present a commercial barrier for the exportation of cocoa or a risk for the domestic market, which often absorbs the supply of lower quality products. Exports from Peru have increased for some decades, and yet there is still little research related to toxigenic fungi in cocoa beans. The proposal of this work was to conduct a survey of the presence of toxigenic fungi in cocoa beans produced in the Amazon region, as a baseline for future research. For that, samples of 5 stages of cocoa processing were collected. The grains were superficially disinfected with 0.4% sodium hypochlorite solution and directly plated on Dichloran 18% Glycerol agar. The ability of the isolates to produce aflatoxins or ochratoxins was determined using the Agar Coco Medium technique. Eight isolated fungi, out of a total of 20, presented toxigenic potential. These results in no way mean that the grains were contaminated with mycotoxins, but rather reveal a potential risk for such. This work reinforces the importance of Good Agricultural Practices, as well as Good Manufacturing Practices, which seek to reduce the presence of microorganisms and their undesirable effects.

Keywords: *Aspergillus*, postharvest, dichotomous key

I. INTRODUCCIÓN

Varios alimentos, como granos almacenados, nueces y hierbas, pueden estar mohosos debido a la exposición a condiciones ambientales y de manipulación adversas en la post cosecha, transporte, almacenamiento, por el secado inadecuado, por el daño por insectos, por el cambio climático entre otros factores (Trucksess et al., 2006; Van Der Fels-Klerx et al., 2016). La contaminación de cultivos agrícolas por hongos asociados a la producción de micotoxinas es un serio problema en todo el mundo (Solhaug et al., 2016) que fue reconocido solamente en las últimas décadas.

El cacao es un producto agrícola cuya calidad final es resultado de la contribución de factores climáticos, maduración de los frutos, intensidad y la regularidad de la fermentación, cantidad de materiales adherentes a la cáscara, que es dependiente del tipo de fermentación y secado adoptados (Sarbu & Csutak, 2019).

El proceso de fermentación del cacao ocurre de forma natural, siendo que durante este proceso innumerables especies de levaduras crecen, llevando a la producción de etanol y secreción de enzimas pectinolíticas. En seguida, se eleva el número de bacterias ácido-lácticas y acéticas, seguidas por las formadoras de esporas (Copetti et al., 2014). Esta es la etapa donde se puede observar el inicio del crecimiento de hongos filamentosos, estos son afectados por altas cantidades de alcohol y ácidos láctico y acético producidos por levaduras y bacterias, respectivamente (Schwan & Wheals, 2004).

En general, los granos del cacao van a ser susceptibles a la contaminación por hongos durante los pasos de procesamiento, se ven afectados por parámetros intrínsecos de los granos de cacao como el pH, la actividad del agua y por los diversos ácidos orgánicos producidos durante la fermentación. Además de causar alteración de las propiedades sensoriales, la presencia de hongos filamentosos en el cacao y el chocolate pueden formar micotoxinas, que son toxinas producidas por hongos. Tanto la aflatoxina (AF) como la ocratoxina A (OTA) se han reportado a partir del cacao y el chocolate (Copetti et al., 2014).

Estudios encontraron que el punto crítico de contaminación fúngica de los granos de cacao y el comienzo de la producción OTA es durante el proceso de secado, cuando el grano empieza a perder agua, reduciendo los competidores por dificultar la disponibilidad

de agua a las bacterias y a las levaduras (Copetti et al., 2010; Copetti, Iamanaka, Pereira, et al., 2011).

Químicamente las AF y ocratoxinas son de bajo peso molecular. Las AF son producidas por especies del género *Aspergillus*, como *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. Entre las aflatoxinas, la AFB₁ presenta efectos más potentes al ser ingeridos en alimentos contaminados por humanos y animales generan hepatitis, edema, hemorragia, defectos del tubo neural, cáncer de esófago y carcinoma hepático por las propiedades hepatocarcinogénicas, teratogénicas y mutagénicas que poseen (Rasheed et al., 2019). Las ocratoxinas también son producidas por especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, principalmente *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* y *P. verrucosum*. La OTA es considerada una de las más importantes micotoxinas, responsable de causar severos efectos en la salud tanto de humanos como de animales debido a sus diversos efectos toxicológicos como las AF (Kumar et al., 2020).

Las micotoxicosis están asociadas con las propiedades carcinogénicas, teratogénicas, mutagénicas e inmunosupresoras de las micotoxinas. Existe un alto riesgo que representa la contaminación de los alimentos por las micotoxinas, la mayoría estables a altas temperaturas. Las principales especies directamente relacionadas con la producción de micotoxinas están incluidas en cuatro géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* (Gil-Serna et al., 2019) y pertenecen a las clases de aflatoxinas, ocratoxinas, patulina (PAT), y toxinas del *Fusarium* (Anfossi et al., 2016).

El cacao es un cultivo valorado por ser un cultivo de exportación llegando a ser de importancia mundial. En diferentes países, el procesamiento postcosecha sigue siendo el mismo: los frutos de cacao recolectados se abren para obtener los granos para fermentarlos, secarlos y almacenarlos antes de comercializarlos o procesarlos, a menudo en malas condiciones favoreciendo la contaminación por hongos toxigénicos (Akinfala et al., 2020). La invasión de hongos toxigénicos puede presentar una barrera comercial para la exportación de cacao o un riesgo para el mercado interno, que muchas veces absorbe la oferta de productos de menor calidad. Dado esta situación nos planteamos realizar una investigación exploratoria que nos permita reconocer el nivel de contaminación que estos tengan mediante una prospección de los hongos con potencial toxigénico en granos cacao y para eso (1) se aislaron; (2) se identificaron los hongos presentes en los granos de cacao; (3) se determinó si los hongos aislados presentan capacidad para producir toxinas.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Lugar de estudio

El trabajo de identificación y aislamiento fue realizado en la Clínica de Diagnóstico de Enfermedades de Plantas, que funciona en las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología y Entomología del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES) de la UNTRM-A.

2.2 Procedimiento

2.2.1 Obtención de las muestras

Las muestras de cacao utilizadas para el aislamiento fueron recolectadas en el distrito de Bagua, en la Asociación de Productores Cacaoteros Amazonas – APROCAM. Fueron recolectadas 500 g de muestras desde diferentes etapas del procesamiento y fueron dispuestas en bolsas de polietileno, selladas y enviadas al laboratorio dentro de cajas de poliestireno de 21×29×24.5 cm para ser transportadas directamente al laboratorio. Las muestras fueron mantenidas bajo congelación, a una temperatura aproximada de – 12 °C, hasta su evaluación.

Las muestras fueron de las siguientes etapas de procesamiento:

1. Granos frescos;
2. Inicio de la fermentación;
3. Final de la fermentación;
4. Primer día del secado;
5. Último día de secado (11 días después de la etapa anterior).

2.2.2 Siembra directo de las muestras

Los granos fueron descongelados por 150 min y posteriormente desinfectados superficialmente por la inmersión en solución de hipoclorito de sodio 0.4% durante 2 minutos, para aislar solamente los hongos que infectan y colonizan los granos. Fueron tomados 24 granos de cacao de cada muestra y distribuidos en 2 placas de Petri (12 granos

por placa) conteniendo agar Dicloran Glicerol 18% (DG18) con cloranfenicol, que es un medio desarrollado para hongos xerofílicos presentes en alimentos con baja actividad de agua. Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 5 a 7 días. Después del periodo de incubación, las placas fueron examinadas visualmente con un estereoscopio, las partículas infectadas fueron contabilizadas y los resultados expresados en porcentaje de granos infectados internamente (Pitt & Hocking, 2009).

$$\% \text{ infección total} = \frac{n^{\circ} \text{ de granos infectados}}{24 \text{ granos}} * 100$$

2.2.3 Aislamiento e identificación por microscopía de las especies fúngicas de las muestras

Posterior a la incubación y el conteo de las partículas infectadas para la determinación del porcentaje de infección, todas las especies fúngicas fueron aisladas en placas conteniendo los medios Czapek extracto de levadura (CYA), extracto de malta (MEA) y 25% glicerol nitrato (G25N) (Figura 5: anexos). Las placas fueron incubadas en tres temperaturas diferentes (5 °C, 25 °C y 37 °C) para posterior identificación a través de protocolos específicos para cada género (Pitt & Hocking, 2009).

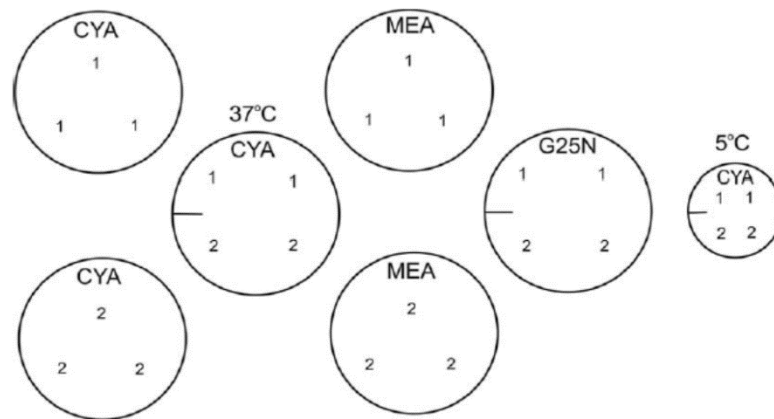
2.2.4 Evaluación de las características macro y micro morfológicas

Los aislados fueron cultivados en medios específicos para cada tipo de hongo, inoculando tres puntos en una sola placa (para los medios CYA, MEA y G25N), equidistantes del centro y el borde de la placa y entre sí. Las características macromorfológicas, tales como la tasa de crecimiento de las colonias, textura, grado de esporulación, producción de esclerocio o cleistotecia, color del micelio, pigmentos solubles, exudados, reverso de la colonia, producción de esclerocio, clamidosporas y cleistotecia fueron registrados. Además, el diámetro de cada una de las colonias fue medido a los 7 días. El diámetro fue el promedio de dos mediciones perpendiculares de cada colonia. Las características micro morfológicas, tales como forma de los conidios, número de puntos de ramificación entre la vesícula y la fiálide, color de la estipe y dimensión, forma y textura del estipe, hifas septadas o no, vesículas, métulas (si están presentes), fiálides, conidios, clamidosporas (si presentan), cleistotecia, ascos y ascosporas fueron observadas y fotografiadas con la ayuda de un microscopio de luz (Samson et al., 2014). Las evaluaciones de características macro y micro morfológicas fueron realizadas de las colonias incubadas a 25 °C, ya que

las otras temperaturas sirven esencialmente para la caracterización y el uso de las claves dicotómicas de Pitt & Hocking (2009)

Figura 1

Esquema de la distribución de las siembras usadas para la identificación de los aislados de hongos (tomado de Pitt & Hocking, 2009)



2.2.5 Realización del microcultivo

La técnica del microcultivo fue realizada con cada uno de los diferentes hongos aislados. Esta técnica consiste básicamente en la siembra del microorganismo en cada uno de los lados de un cubo de medio de cultivo de agar agua colocado sobre una lámina portaobjeto y con una lámina cubreobjeto en la parte superior del cubo (Alfenas & Mafia, 2016). La visualización del crecimiento del hongo fue realizada todos los días hasta obtener una imagen clara de la estructura de fructificación del hongo sin ruido visual causado por las hifas, lo que, muchas veces, es inviable mediante el montaje directo de lámina microscópica utilizando estilete.

2.2.6 Inoculación en el medio agar coco (CAM) para evaluar la producción de extrolitos

Como una forma rápida para la determinación de producción de extrolitos, los hongos aislados e identificados por los protocolos específicos para cada especie que presentaron potencial toxigénico (a través de su caracterización y en base a la literatura) fueron inoculados en el centro de la placa con medio agar coco (CAM) e incubados a 30 °C por

5 días, conforme descrito por Kuntawee & Akarapisan (2015) y Lin & Dianese (1976). Después de este período, las placas fueron observadas bajo luz ultravioleta de 366 nm. Los aislados que presentaron un color azul fluorescente en el reverso de la colonia fueron considerados productores de aflatoxinas u ocratoxinas.

III. RESULTADOS

3.1 Porcentaje hongos aislados en granos de cacao

Fueron obtenidos 20 aislados de los granos evaluados en las 5 etapas. El porcentaje de partículas infectadas fue calculado para estimar el nivel de contaminación por hongos (tabla 1). La muestra de la etapa 2 (inicio de la fermentación – 48 horas) presenta mayor porcentaje de infección, de 29.17%, seguida de la etapa 5 (último día de secado) con 20.83%. En la etapa 3 (fermentación - salida al proceso de secado) no se encontraron colonias fúngicas.

Tabla 1

Porcentaje de granos infectados en 5 etapas del procesamiento de cacao

Etapas	Granos evaluados	Granos contaminados	Granos contaminados en porcentaje
1. Granos frescos	24	1	4.17
2. Inicio de la fermentación	24	7	29.17
3. Final de la fermentación	24	0	0
4. Primer día del secado	24	3	12.50
5. Último día de secado	24	5	20.83

3.2 Ocurrencia de los aislados de granos de cacao evaluados por etapa

La tabla 2 evidencia la cantidad de colonias que crecieron por cada etapa evaluada. En la etapa 2 se encontró el mayor porcentaje de ocurrencia (50%), seguida por la etapa 5 (25%).

Tabla 2

Porcentaje de aislados obtenidos de 5 etapas del procesamiento de cacao

Etapas	Número de colonias	Porcentaje de ocurrencia
1. Granos frescos	1	5
2. Inicio de la fermentación	10	50
3. Final de la fermentación	0	0
4. Primer día del secado	4	20
5. Último día de secado	5	25

3.3 Codificación de los aislados

La codificación utilizada para los aislados encontrados fue: R de recolección seguida de la letra A para la primera etapa, RB para la segunda, RC para la tercera, RD para la cuarta y RE para la última etapa, seguida por los números 1 o 2, referentes a la placa de la cual se aisló el microorganismo. Esta codificación inicial fue seguida por la letra C de cepa, indicando los aislados encontrados y, finalmente, A o B cuando crecía más de una cepa en un mismo grano.

Tabla 3*Distribución de códigos para cada aislado obtenido*

Etapa	Código
1. Granos frescos	RA2C1
2. Inicio de la fermentación	RB1C1, RB1C2 , RB2C1A , RB2C1B , RB2C2, RB2C4 , RB2C5 , RB2C6 , RB2C7A, RB2C7B
3. Final de la fermentación	
4. Primer día del secado	RD1C1, RD1C1B, RD1C2, RD2C1
5. Último día de secado	RE1C1, RE1C2, RE2C1A, RE2C1B, RE2C3

Nota. Los códigos en negrita fueron los aislados fúngicos que presentaron potencial toxigénico.

3.4 Crecimiento de aislados en medio MEA y CYA

Los 20 aislados encontrados fueron caracterizados. De estos en la figura 2 se resaltan las imágenes macroscópicas en medios CYA y MEA. En la figura 3 están las micrografías de los hongos potencialmente toxigénicos representando el 40%. La descripción de la caracterización de los aislados se encuentran en la tabla 5 (anexos) y las imágenes de las colonias en los medios CYA y MEA de los 12 aislados no toxigénicos se encuentran en la figura 7, representando el 60% de todos los microorganismos encontrados en el presente trabajo.

Figura 2

Colonias de aislados micotoxigénico obtenidos de granos de cacao después de 7 días de incubación a 25 °C. De izquierda a derecha: anverso en medio CYA, reverso en medio CYA, anverso en medio MEA, reverso en medio MEA

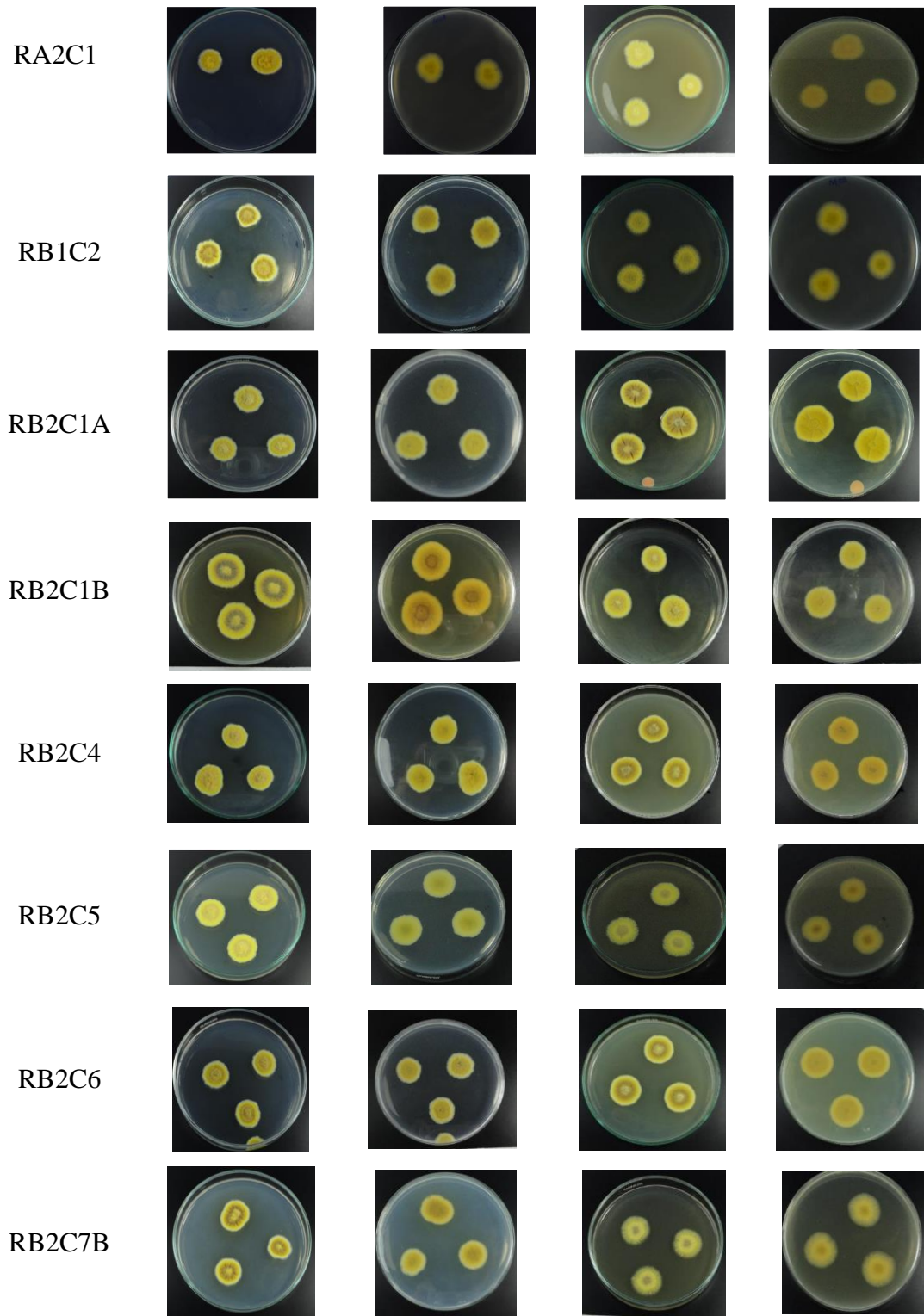
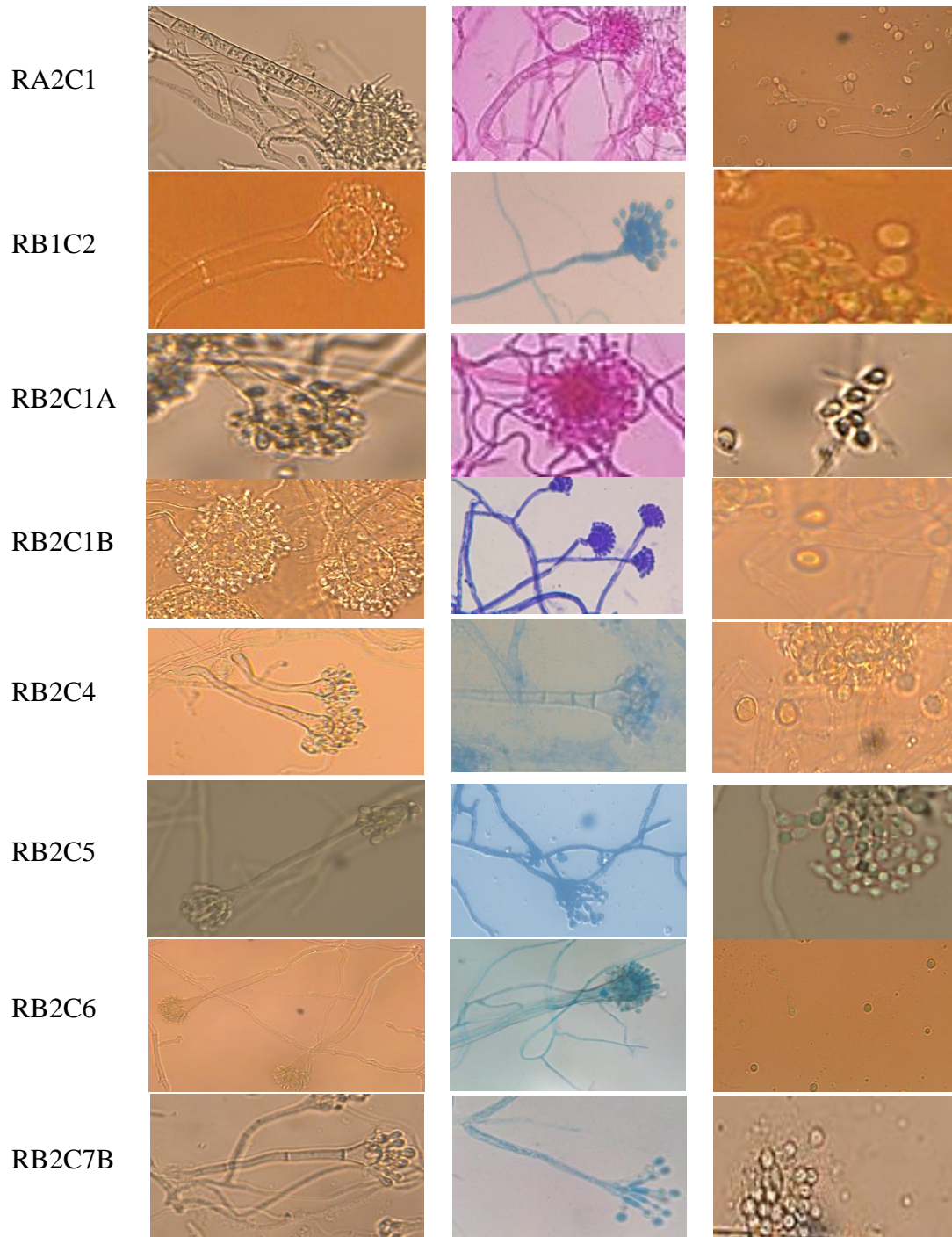


Figura 3

Micrografías de microcultivo de aislados micotoxigénicos obtenidos de granos de cacao. De izquierda a derecha: conidióforo sin colorante, conidióforo con colorante y conidios (aumento: 40x)

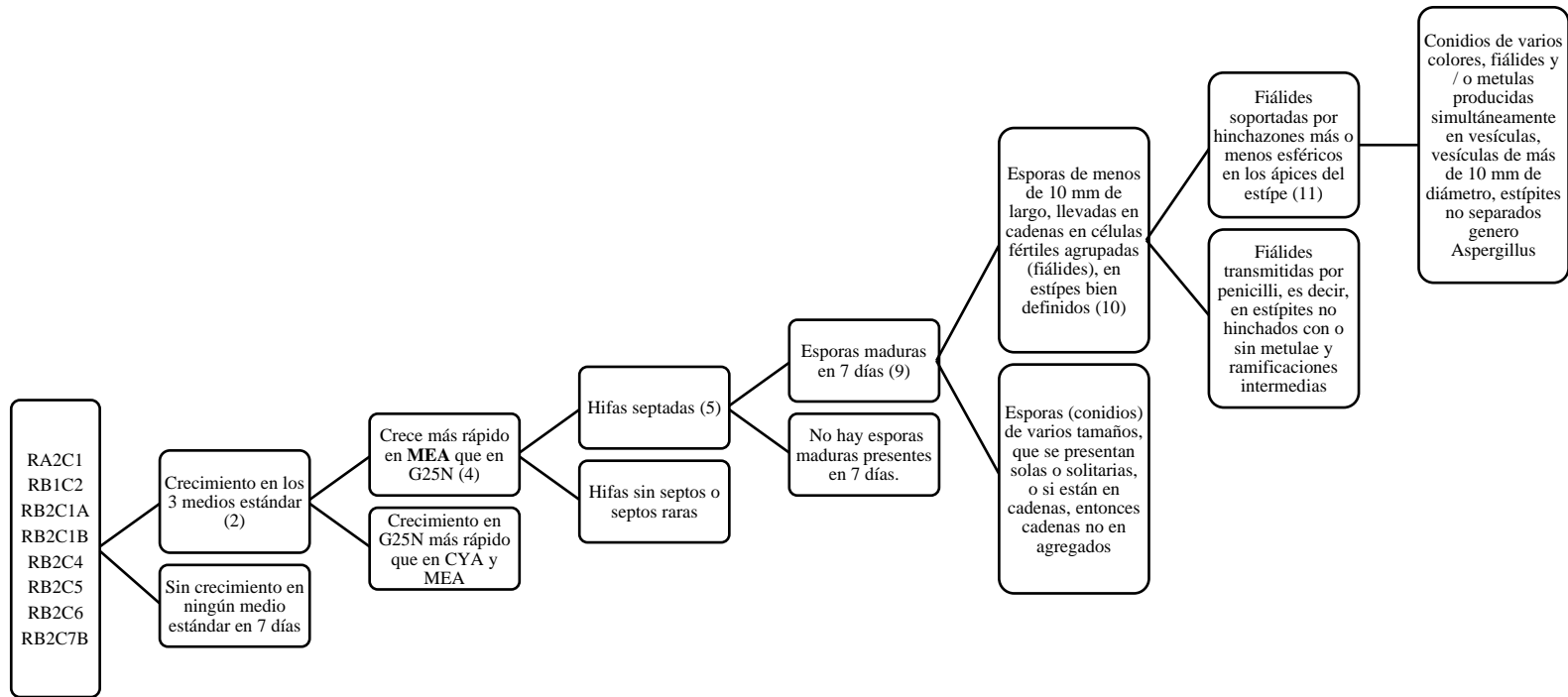


3.5 Clave dicotómica para identificación de cepas

Para identificar el género de los aislados se utilizó la clave dicotómica de Pitt & Hocking (2009, *p.* 55) comparándose las características encontradas en las evaluaciones con las características establecidas en la clave general para los hongos que deterioran los alimentos. En la figura 4 se aprecia el esquema de identificación de los aislados toxigénicos con las claves dicotómicas, hasta llegar al género. En la figura 6 (anexos) se encuentra el esquema para los aislados no toxigénicos.

Figura 4

Esquema de identificación de aislados a nivel de genero utilizando la clave dicotómica general de Pitt & Hocking (2009)



3.6 Detección de hongos con capacidad potencial para producir toxinas con el medio CAM

Las 20 colonias fueron inoculadas en medio CAM.

Tabla 4

Detección de la capacidad de producción de toxinas en medio CAM por aislados obtenidos de granos de cacao en 5 etapas de postcosecha

Etapas	Código	Fluorescencia en CAM (+: positivo, -: negativo)	
1. Granos frescos	RA2C1	+	
	RB1C1	-	
	RB1C2	+	
	RB2C1A	+	
	RB2C1B	+	
	RB2C2	-	
	RB2C4	+	
2. Inicio de la fermentación	RB2C5	+	
	RB2C6	+	
	RB2C7A	-	
	RB2C7B	+	
	3. Final de la fermentación	RD1C1A	-
	4. Primer día del secado	RD1C1B	-
		RD1C2	-
RD2C1		-	
RE1C1		-	
5. Último día de secado	RE1C2	-	
	RE2C1	-	
	RE2C1B	-	
	RE2C3	-	

Un aislado de la etapa 1 y siete aislados de la etapa 2 presentaron una aureola fluorescente alrededor de la colonia indicando el potencial para producir aflatoxinas u ocratoxinas. Los aislados encontrados en la etapa 4 y 5 dieron resultado negativo.

IV. DISCUSIÓN

La presente investigación buscó realizar una prospección de los hongos potencialmente toxigénicos que determinan en gran medida la presencia de micotoxinas en cacao. Esto se realizó en cinco etapas del procesamiento de los granos para identificar momentos de mayor riesgo de contaminación. Además, se determinó el potencial de los aislados obtenidos para producir específicamente aflatoxinas (Lin & Dianese, 1976) u ocratoxinas (Pitt & Hocking, 2009), mediante la aplicación de un método sencillo y rápido.

La detección de los hongos toxigénicos puede ayudar a proponer medidas correctivas para prevenir su aparición, su desarrollo o las condiciones propicias para la producción de la micotoxina. Esto sería más recomendable que tomar acciones posteriores para eliminar la micotoxina directamente del grano o diluirla, mezclando con granos no contaminados. Es importante notar que el procesamiento de alimentos contaminados con tiempos y temperaturas elevadas, muchas veces, pueden no ser suficientes para degradar las toxinas e incluso pueden generar otros compuestos igual o más tóxicos que las micotoxinas (Martins et al., 2017).

La determinación y cuantificación de micotoxinas en matrices alimentarias, como el grano de cacao, son más complejas, costosas y laboriosas que el método utilizando el medio CAM, habiendo necesidad de la utilización de solventes orgánicos, inversión de más tiempo y equipos sofisticados (Lin & Dianese, 1976).

El abordaje que se decidió seguir en la presente investigación, sin embargo, no es simple o libre de dificultades. La identificación de microorganismos por observación de sus características biológicas, y el uso de claves dicotómicas ha sido, y todavía es, un desafío muchas veces relegado a especialistas y profesionales con experiencia. Actualmente, existe la ventaja de poder corroborar las identificaciones con secuenciaciones genéticas pero las informaciones fenotípicas de los microorganismos no pierden relevancia. En realidad, todos los abordajes se complementan (Samson et al., 2014). Por otro lado, con respecto a su utilidad práctica, el presente trabajo de ninguna manera busca directamente una solución al problema de las toxinas en granos de cacao, sino que podrá ser un componente importante dentro de un manejo integrado en la postcosecha.

La capacidad para producir micotoxinas está definida por las condiciones ambientales, como el pH, la temperatura, la actividad de agua, así como por factores genéticos del microorganismo (Pitt et al., 2013). Es importante tener en cuenta ello porque si un hongo produce toxinas en el medio CAM no significa que necesariamente lo hará en los granos. Por otro lado, la no detección de microorganismos micotoxigénico en granos de cacao no descarta la presencia de micotoxinas porque esta puede haber sido producida cuando el microorganismo estaba presente, y permanecer aun cuando el microorganismo se haya eliminado.

Según Copetti et al. (2012), las prácticas de fermentación influyen sobre la producción de ocratoxina A en cacao. El efecto de ácidos orgánicos débiles generados durante la fermentación como los ácidos acético, láctico y cítrico y la disminución de los valores de pH, reducen el crecimiento de hongos, así como la producción de ocratoxina A. En el presente trabajo no fueron encontrados hongos parásitos internos al final de la etapa de fermentación de los granos, corroborando que el proceso de fermentación ayudó a eliminar parte de los microorganismos presentes, incluso los toxigénicos. En otra investigación, Copetti, Iamanaka, Frisvad, et al. (2011) estudiaron la micobiota del cacao en grano desde la finca hasta el chocolate encontrando mayor cantidad, diversidad de hongos y mayor porcentaje de hongos toxigénicos en las muestras recolectadas durante el secado y almacenamiento, a diferencia del presente trabajo que se encontró hongos toxigénicos en las etapas anteriores a la completa fermentación, siendo el mayor porcentaje de granos contaminados al inicio de la fermentación (etapa 2). Eso puede deberse a la utilización de mazorcas defectuosas y el procesamiento postcosecha en condiciones más expuestas a contaminación.

Con relación a los microorganismos toxigénicos encontrados en las etapas 1 y 2, por el color de las colonias y estructuras, asimismo por informaciones encontradas en la literatura, es probable que sean *Aspergillus* de la sección *Circumdati* (Wang et al., 2016). Este género es complejo siendo dividido en varias secciones para agrupar a los microorganismos con características semejantes. Esta sección también puede ser llamada de grupo del *Aspergillus ochraceus* y, dentro de ella, varias especies son consideradas productoras de ocratoxina A (Visagie et al., 2014), justificando la fluorescencia en el medio CAM.

La mayor parte de la producción de cacao del Perú es destinada a la exportación a países europeos. Los granos que son considerados inadecuados a la exportación son destinados al mercado interno, ofreciendo riesgo a la población y productos de baja calidad. El consumo interno de cacao es considerado bajo, aproximadamente de 0.2 kg/persona, pero las micotoxinas pueden bioacumularse en el organismo (Turner et al., 2015), presentando igualmente un riesgo que puede ser minimizado o controlado aplicando las Buenas Prácticas Agrícolas y/o de Manufactura. Conocer específicamente a los microorganismos, las vías metabólicas para la producción de las micotoxinas y los mecanismos que regulan su producción, son factores importantes para la prevención de estos riesgos (Wang et al., 2016).

V. CONCLUSIONES

En la presente prospección fueron encontrados 20 aislados fúngicos. La mayor incidencia fue encontrada en las etapas del inicio de fermentación y el último día de secado, 29.17% y 20.83%, respectivamente.

Ocho aislados (40% del total) obtenidos antes de finalizar la fermentación completa de los granos fueron identificados como potencialmente toxigénicos.

Los aislados con potencial para producir aflatoxinas u ocratoxinas aparentemente pertenecen a la sección *Circumdati*, del género *Aspergillus*, de acuerdo con su color y morfología.

Existe un potencial riesgo de contaminación por aflatoxinas u ocratoxinas en los granos de cacao evaluados.

VI. RECOMENDACIONES

- Sería recomendable que las organizaciones que procesan el cacao realicen diagnóstico de rutina de la microbiota como parte de su plan de manejo de la postcosecha.
- Después de verificar el potencial para la producción de micotoxinas y el riesgo de su presencia en el cacao, se recomienda realizar la identificación por secuenciación genética para asegurar la especie de hongo identificado y proponer medidas de control adecuadas a la especie.
- Aplicación inmediata de medidas preventivas en los procesos de beneficio de cacao para controlar la infección de estos hongos, evitando alguna barrera comercial por la presencia de micotoxinas y futuras pérdidas económicas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akinfala, T. O., Houbraken, J., Sulyok, M., Adedeji, A. R., Odebode, A. C., Krska, R., & Ezekiel, C. N. (2020). Moulds and their secondary metabolites associated with the fermentation and storage of two cocoa bean hybrids in Nigeria. *International Journal of Food Microbiology*, 316(August 2019), 108490. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108490>
- Alfenas, A. C., & Mafia, R. G. (Eds.). (2016). *Métodos em fitopatologia* (2nd ed.). UFV.
- Anfossi, L., Giovannoli, C., & Baggiani, C. (2016). Mycotoxin detection. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.11.005>
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Frisvad, J. C., Pereira, J. L., & Taniwaki, M. H. (2011). Mycobiota of cocoa: From farm to chocolate. *Food Microbiology*, 28(8), 1499–1504. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.005>
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pereira, J. L., Fungaro, M. H., & Taniwaki, M. H. (2011). Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. *International Journal of Food Microbiology*, 148(2), 141–144. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.020>
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pereira, J. L., Lemes, D. P., Nakano, F., & Taniwaki, M. H. (2012). Co-occurrence of ochratoxin a and aflatoxins in chocolate marketed in Brazil. *Food Control*, 26(1), 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.023>
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pitt, J. I., & Taniwaki, M. H. (2014). Fungi and mycotoxins in cocoa: From farm to chocolate. *International Journal of Food Microbiology*, 178, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.023>
- Copetti, M. V., Pereira, J. L., Iamanaka, B. T., Pitt, J. I., & Taniwaki, M. H. (2010). Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. *International Journal of Food Microbiology*, 143(1–2), 67–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.031>
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., & Patiño, B. (2019). Mycotoxins | Toxicology. *Reference Module in Food Science*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.22630-9>

- Kumar, P., Mahato, D. K., Sharma, B., Borah, R., Haque, S., Mahmud, M. M. C., Shah, A. K., Rawal, D., Bora, H., & Bui, S. (2020). Ochratoxins in food and feed: Occurrence and its impact on human health and management strategies. *Toxicon*, 187(September), 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.08.031>
- Kuntawee, S., & Akarapisan, A. (2015). Isolation and identification of *Aspergillus* species producing Ochratoxin A in Arabica coffee beans. *International Journal of Agricultural Technology*, 11(5), 1235–1242.
- Lin, M. T., & Dianese, J. C. (1976). A Coconut-Agar Medium for Rapid Detection of Aflatoxin Production by *Aspergillus* spp. In *Phytopathology* (Vol. 66, Issue 12, p. 1466). <https://doi.org/10.1094/phyto-66-1466>
- Martins, L. M., Sant’Ana, A. S., Iamanaka, B. T., Berto, M. I., Pitt, J. I., & Taniwaki, M. H. (2017). Kinetics of aflatoxin degradation during peanut roasting. *Food Research International*, 97(September 2016), 178–183. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.052>
- Pitt, J. I., Taniwaki, M. H., & Cole, M. B. (2013). Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives. In *Food Control* (Vol. 32, Issue 1, pp. 205–215). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.023>
- Pitt, John I., & Hocking, A. D. (2009). Fungi and food spoilage. In *Fungi and Food Spoilage*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Rasheed, U., Wu, H., Wei, J., Ou, X., Qin, P., Yao, X., Chen, H., Chen, A. J., & Liu, B. (2019). A polyphasic study of *Aspergillus* section Flavi isolated from corn in Guangxi, China- a hot spot of aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 310(March), 108307. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108307>
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hubka, V., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Szigeti, G., Yaguchi, T., Frisvad, J. C., Tanney, J. B., Varga, J., & Kocsub, S. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 141–173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Sarbu, I., & Csutak, O. (2019). The Microbiology of Cocoa Fermentation. In *Caffeinated and Cocoa Based Beverages* (pp. 423–446). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815864-7.00013-1>

- Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 205–221. <https://doi.org/10.1080/10408690490464104>
- Solhaug, A., Karlsøen, L. M., Holme, J. A., Kristoffersen, A. B., & Eriksen, G. S. (2016). Immunomodulatory effects of individual and combined mycotoxins in the THP-1 cell line. *Toxicology in Vitro*, 36, 120–132. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.07.012>
- Trucksess, M., Weaver, C., Oles, C., D'Ovidio, K., & Rader, J. (2006). Determination of aflatoxins and ochratoxin A in ginseng and other botanical roots by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*, 89(3), 624–630. <https://doi.org/10.1093/jaoac/89.3.624>
- Turner, N. W., Bramhmbhatt, H., Szabo-Vezse, M., Poma, A., Coker, R., & Piletsky, S. A. (2015). Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009–2014). *Analytica Chimica Acta*, 901, 12–33. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.013>
- Van Der Fels-Klerx, H. J., Liu, C., & Battilani, P. (2016). Modelling climate change impacts on mycotoxin contamination. *World Mycotoxin Journal*, 9(5), 717–726. <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2066>
- Visagie, C. M., Varga, J., Houbraeken, J., Meijer, M., Kocsubé, S., Yilmaz, N., Fotedar, R., Seifert, K. A., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2014). Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Studies in Mycology*, 78(1), 1–61. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.001>
- Wang, Y., Wang, L., Liu, F., Wang, Q., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhao, Y., & Liu, Y. (2016). Ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms. *Toxins*, 8(3), 1–15. <https://doi.org/10.3390/toxins8030083>

ANEXOS

Figura 5

Registro de imágenes durante la fase experimental. A: Cajas de fermentación de cacao; B: Muestras recolectadas; C: Desinfección; D: Siembra directa en medio DG18; E: crecimiento de colonias y; F: Evaluación de reverso de placa

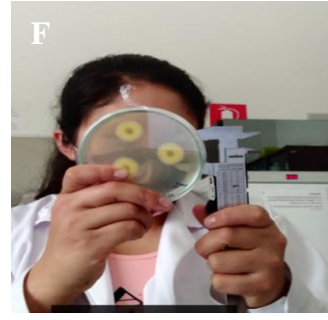
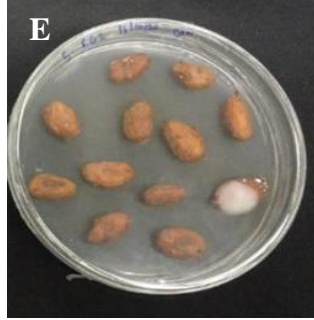
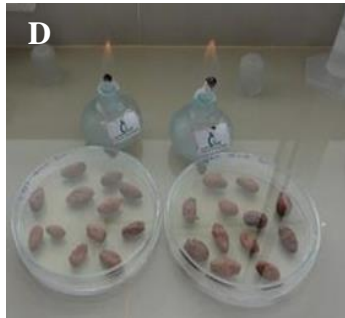
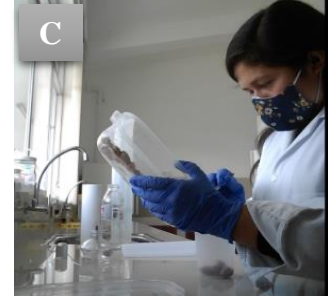


Tabla 5*Características observadas en los aislados encontrados en las cinco etapas de procesamiento de los granos de cacao*

Etapas	Código	Diámetros (mm) de las colonias a 25°C, a los 7 días	Características macroscópicas	Características microscópicas
1. Granos frescos	RA2C1	CYA: 17.41 MEA: 19.15 G25N:18.62	MEA: Colonias ligeramente elevadas en el centro, márgenes bajos, planos, micelio blanco; textura suave; con esporulación, conidios en masa amarillos. Al inverso, centro marrón claro y se desvanece en amarillo claro. CYA: Colonias con márgenes color blanco y bajos, planos, amarillo pastel en el centro; textura suave; con esporulación notoria, conidios en masa turquesa grisácea; exudados ausentes. Al inverso, de amarillo a marrón que se desvanece en amarillo claro.	En objetivo 40x, conidióforo de 9.99 µm y conidio de 2.32 µm.
2. Inicio de la fermentación	RB1C1	CYA: 21.28 MEA: 33.52 G25N: 21.82	MEA: Colonias surcadas del intermedio hacia los márgenes, planos, micelio blanco textura suave, con esporulación, conidios blancos, exudados ausentes. Al inverso, centro naranja amarillento que se desvanece en blanco, colonias ligeramente elevadas en el centro; márgenes bajos, micelio blanco; textura aterciopelada. CYA: colonias de color blanco	En objetivo 40x, cleistotecia de 41.11 µm, conidio de 11.57 µm.

Etapas	Código	Diámetros (mm) de las colonias a 25°C, a los 7 días	Características macroscópicas	Características microscópicas
			y bajos, planos, textura suave (algodonosa); con poca esporulación, exudados ausentes. Al inverso, blanco.	
	RB1C2	CYA: 19.39 MEA: 18.15 G25N: 19.02	MEA: Colonias planas, micelio blanco; textura suave; con esporulación, conidios en masa verde opaco. Al inverso, centro marrón claro y se desvanece en amarillo claro. CYA: Colonias con márgenes color blanco y bajos, planos, amarillo pastel en el centro; textura suave; con esporulación notoria, conidios en masa turquesa grisácea; exudados ausentes. Al inverso, de amarillo a marrón grisáceo que se desvanece en amarillo claro.	En objetivo 40x, conidióforo de 5.68 µm, conidio de 2.0 µm.
	RB2C1A	CYA: 18.70 MEA: 21.93 G25N: 20.13	MEA: Colonias planas, micelio blanco; textura suave; con esporulación, conidios en masa marrón grisáceo, bordes surcados. Al inverso, centro amarillo y se desvanece en amarillo claro. CYA: Colonias con márgenes color blanco y bajos, planos, con amarillo pastel y ligera elevación en el centro, textura suave; con esporulación notoria, conidios en	En objetivo 40x, conidióforo de 6.57 µm, conidio de 2.03 µm.

Etapa	Código	Diámetros (mm) de las colonias a 25°C, a los 7 días	Características macroscópicas	Características microscópicas
			masa amarillos; exudados ausentes. Al inverso, se desvanece de amarillo a amarillo claro.	
	RB2C1B	CYA: 18.25 MEA: 20.10 G25N: 19.65	MEA: Colonias planos, micelio blanco; textura suave; con esporulación, conidios en masa grisáceo. Al inverso, centro amarillo grisáceo a amarillo y se desvanece en amarillo. CYA: Colonias de diámetro con márgenes color blanco y bajos, planos, amarillo pastel en el centro; textura suave; con esporulación notoria, conidios en masa marrón grisáceo; exudados ausentes. Al inverso, de amarillo a marrón que se desvanece en amarillo claro.	En objetivo 40x, conidióforo de 17.7µm, conidio de 5.00 µm.
	RB2C2	CYA: 18.25 MEA: 20.10 G25N: 15.39	MEA: Colonias surcadas del intermedio hacia los márgenes, planos, micelio blanco textura suave, con esporulación, conidios blancos, exudados ausentes. Al inverso, centro rosa pálido que se desvanece en blanco, colonias ligeramente elevadas en el centro; márgenes bajos, micelio blanco; textura aterciopelada. CYA, colonias de color blanco	En objetivo 40x, conidióforo de 33.71 µm, conidio de 7.13 µm.

Etapa	Código	Diámetros (mm) de las colonias a 25°C, a los 7 días	Características macroscópicas	Características microscópicas
			y bajos, planos, textura suave (algodonosa); con poca esporulación, exudados ausentes. Al inverso, blanco.	
	RB2C4	CYA: 18.76 MEA: 20.85 G25N: 13.11	MEA: Colonias con líneas cóncavas, micelio a los bordes de color blanco; textura suave; con esporulación, conidios en masa turquesa grisácea. Al inverso, el centro marrón claro y se desvanece en amarillo claro. CYA: Colonias con márgenes color blanco y bajos, planos, amarillo pastel en el centro; textura suave; con esporulación notoria, exudados ausentes. Al inverso, de amarillo a marrón grisáceo que se desvanece en amarillo claro.	En objetivo 40x, conidióforo de 10.12 μm , conidio de 2.55 μm .
	RB2C5	CYA: 22.18 MEA: 21.44 G25N: 17.48	MEA: Colonias planas; textura suave; con esporulación amarilla, micelio amarillo. Al inverso, el centro amarillo y se desvanece en amarillo claro. CYA: Colonias con márgenes color blanco y bajos, planos, con amarillo pastel y ligera elevación en el centro, textura suave; con esporulación notoria, conidios en masa amarillos; exudados ausentes. Al inverso, que se desvanece de amarillo a amarillo claro.	En objetivo 40x, conidióforo de 10.25 μm , conidio de 4.38 μm .

Etapa	Código	Diámetros (mm) de las colonias a 25°C, a los 7 días	Características macroscópicas	Características microscópicas
	RB2C6	CYA: 18.24 MEA: 22.20 G25N: 20.85	MEA: Colonias con líneas cóncavas, micelio a los bordes de color blanco; textura suave; con esporulación, conidios en masa turquesa grisácea. Al inverso, centro marrón grisáceo y se desvanece en amarillo claro. CYA: Colonias con márgenes color blanco y elevación en el centro, amarillo pastel en el centro, a amarillo hacia los bordes; textura suave; con esporulación notoria, exudados ausentes. Al inverso, de amarillo a marrón grisáceo que se desvanece en amarillo claro.	En objetivo 40x, conidióforo de 20.08 μm , conidio de 4.57 μm
	RB2C7A	CYA: 23.71 MEA: 29.61 G25N: 22.05	MEA: Colonias con bordes elevados, micelio blanco; textura suave; con esporulación, conidios en masa blancos, bordes filamentosos. Al inverso, centro rosa pálido y se desvanece en blanco. CYA: Colonias con márgenes color blanco, elevados, con rojo pálido, textura filamentosa; con esporulación, conidios blancos; exudados ausentes. Al inverso, que se desvanece rojo pálido a blanco.	En objetivo 40x, cleistotecia de 38.67 μm , conidio de 6.03 μm

Etapa	Código	Diámetros (mm) de las colonias a 25°C, a los 7 días	Características macroscópicas	Características microscópicas
	RB2C7B	CYA: 18.38 MEA: 22.19 G25N: 20.05	MEA: Colonias planas; textura suave; con esporulación amarilla, micelio amarillo. Al inverso, el centro amarillo y se desvanece en amarillo claro. CYA: Colonias con márgenes color blanco y bajos, planos, con amarillo pastel y ligera elevación en el centro, textura suave; con esporulación notoria, conidios en masa amarillos; exudados ausentes. Al inverso, que se desvanece de amarillo a amarillo claro.	En objetivo 40x, conidióforo de 5.54 μm , conidio de 2.17 μm
4. Primer día del secado	RD1C1A	CYA: 21.28 MEA: 33.52 G25N: 21.82	MEA: Colonias de micelio grisáceo blanco; textura algodonosa; con esporulación, conidios en grisáceos, bordes suaves, grietas en las líneas cóncavas. Al inverso, el centro marrón y se desvanece en marrón claro. CYA: Colonias con márgenes color blanco algodonoso, elevados, blanco grisáceo, textura filamentosa; sin esporulación, conidios grisáceos; exudado ausente. Al inverso blanco grisáceo.	En objetivo 40x, cleistotecia de 50.37 μm , conidio de 9.49 μm
	RD1C1B	CYA: 23.01 MEA: 33.08 G25N: 17.08	MEA: Colonias de micelio griseo blanco; textura algodonosa; con esporulación, conidios en grisáceos, bordes suaves, grietas en las líneas cóncavas. Al inverso, el centro marrón	En objetivo 40x, cleistotecia de 27.79 μm , conidio de 7.35 μm

Etapa	Código	Diámetros (mm) de las colonias a 25°C, a los 7 días	Características macroscópicas	Características microscópicas
			claro y se desvanece en blanco grisáceo. CYA: Colonias con márgenes color blanco algodonoso, elevados, blanco grisáceo, textura filamentosa; sin esporulación, conidios grisáceos; exudados ausentes. Al inverso, blanco grisáceo	
	RD1C2	CYA: 19.87 MEA: 32.7 G25N: 16.95	MEA: Colonias con bordes elevados, micelio blanco; textura suave; con esporulación, conidios en masa blancos, bordes filamentosos. Al inverso, el centro rosa pálido y se desvanece en blanco. CYA: Colonias con márgenes color blanco, elevados, con rojo pálido, textura filamentosa; con esporulación, conidios blancos; exudados ausentes. Al inverso, que se desvanece rojo pálido a blanco.	En objetivo 40x, cleistotecia de 41.88 µm, conidio de 7.43 µm
	RD2C1	CYA: 22.81 MEA: 25.82 G25N: 23.05	MEA: Colonias con bordes algodonosos y elevados, micelio blanco; textura suave; con esporulación, conidios en masa grisáceos pálido. Al inverso, el centro marrón grisáceo y se desvanece en grisáceo pálido. CYA: Colonias con micelio algodonoso color blanco, centro grisáceo, textura	En objetivo 40x, cleistotecia de 33.54 µm, conidio de 7.21 µm

Etapa	Código	Diámetros (mm) de las colonias a 25°C, a los 7 días	Características macroscópicas	Características microscópicas
			filamentosa; sin esporulación, exudados ausentes. Al inverso, grisáceo pálido a blanco.	
	RE1C1	CYA: 19.29 MEA: 35.00 G25N: 18.50	MEA: Colonias con bordes algodonosos y elevados, micelio grisáceo al centro, con un anillo gris y borde blanco grisáceo; textura algodonosa; con esporulación, conidios en masa grisáceos. Al inverso, el centro gris oscuro y se desvanece en grisáceo pálido. CYA: Colonias con micelio algodonoso color blanco, textura filamentosa, sin esporulación y con exudados ausentes. Al inverso grisáceo pálido a blanco.	En objetivo 40x, conidio de 2.81 μm
5. Último día de secado	RE1C2	CYA: 6.65 MEA: 14.34 G25N: 22.15	MEA y CYA: Colonias de consistencia cremosa, planas y de color blanco. Al inverso blanco.	Microscópicamente se observaron células
	RE2C1A	CYA: 26.46 MEA: 27.82 G25N: 18.89	MEA: Colonias algodonosas y elevadas, micelio con un anillo negro grisáceo, blanco al centro, con bordes blancos grisáceo, con esporulación, conidios en masa gris oscuro. Al inverso, el centro gris oscuro y se desvanece en grisáceo pálido. CYA: Colonias con micelio algodonoso color blanco,	En objetivo 40x, conidio 4.47 μm

Etapa	Código	Diámetros (mm) de las colonias a 25°C, a los 7 días	Características macroscópicas	Características microscópicas
			textura filamentosa; sin esporulación, exudados ausentes. Al inverso, grisáceo pálido a blanco.	
	RE2C1B	CYA: 20.76 MEA: 27.97 G25N: 29.46	MEA y CYA: Colonias de consistencia cremosa, planas y de color blanco, con bordes curvados, al inverso blanco.	Microscópicamente se observaron células alargadas
	RE2C3	CYA: 12 MEA: 15.24 G25N: 32.13	MEA y CYA: Colonias de consistencia cremosa, planas y de color rosa pálido del centro, que se desvanece en blanco. Al inverso, rosa pálido.	Microscópicamente se observaron células alargadas

Figura 6

Esquema de identificación de aislados no toxigénicos a nivel de género utilizando la clave dicotómica general de Pitt & Hocking (2009)

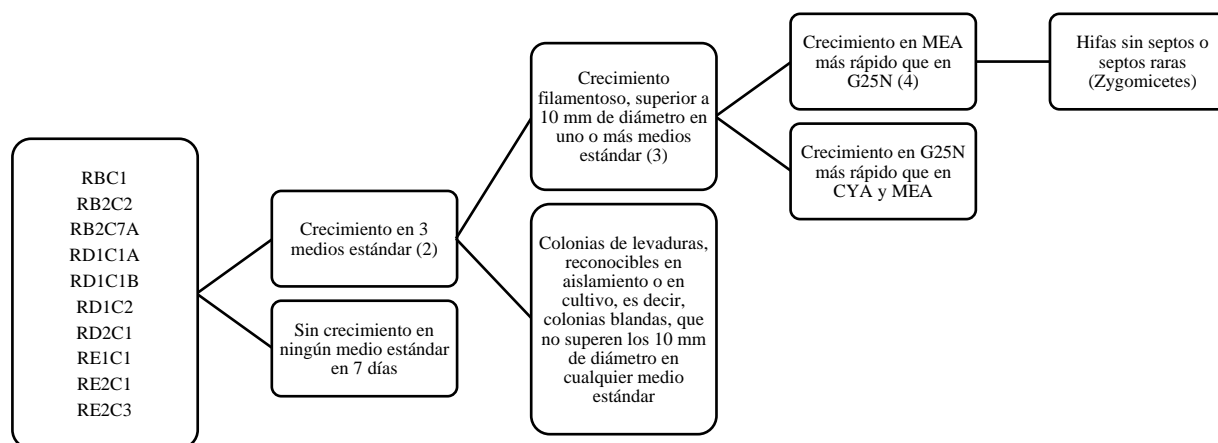
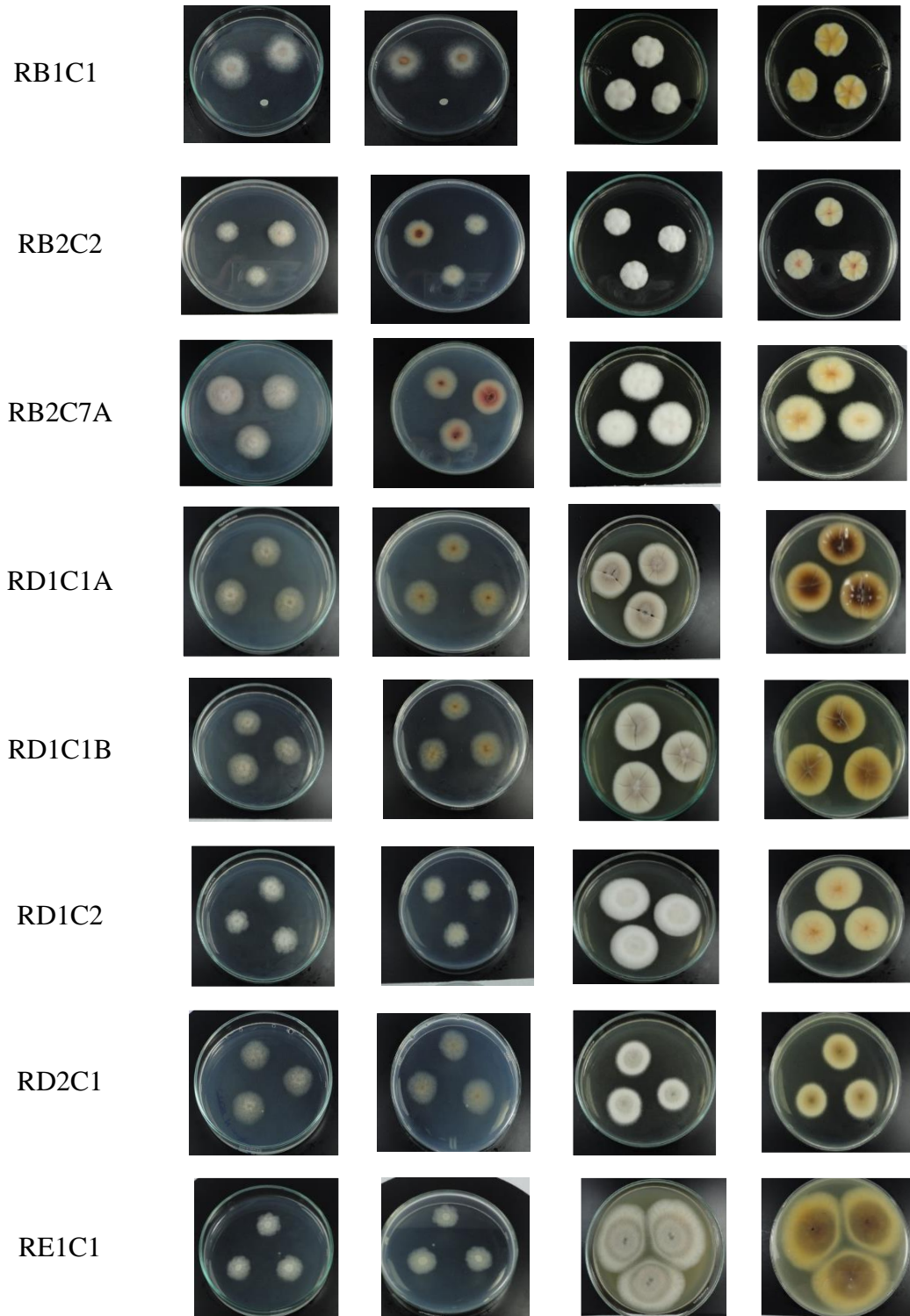


Figura 7

Colonias de aislados no micotoxigénico obtenidos de granos de cacao después de 7 días de incubación a 25 °C. De izquierda a derecha: anverso en medio CYA, reverso en medio CYA, anverso en medio MEA, reverso en medio MEA



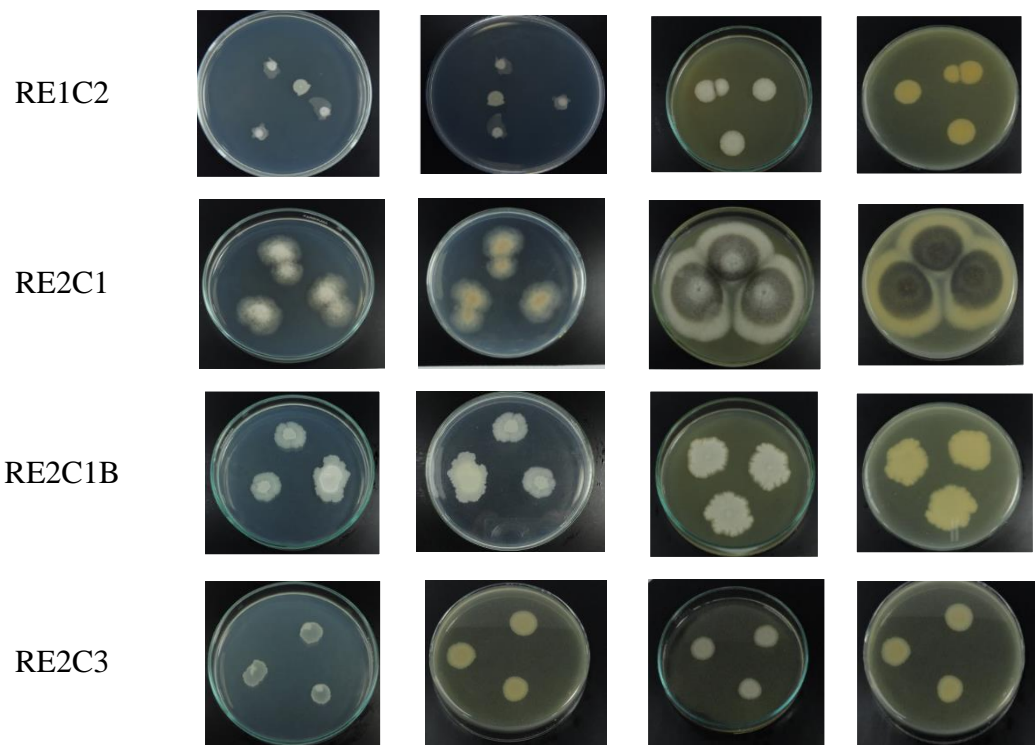


Figura 8

Micrografías de microcultivo de aislados no micotoxigénico obtenidos de granos de cacao. De izquierda a derecha: cleistotecia sin colorante, cleistotecia con colorante y conidios (aumento: 40x).

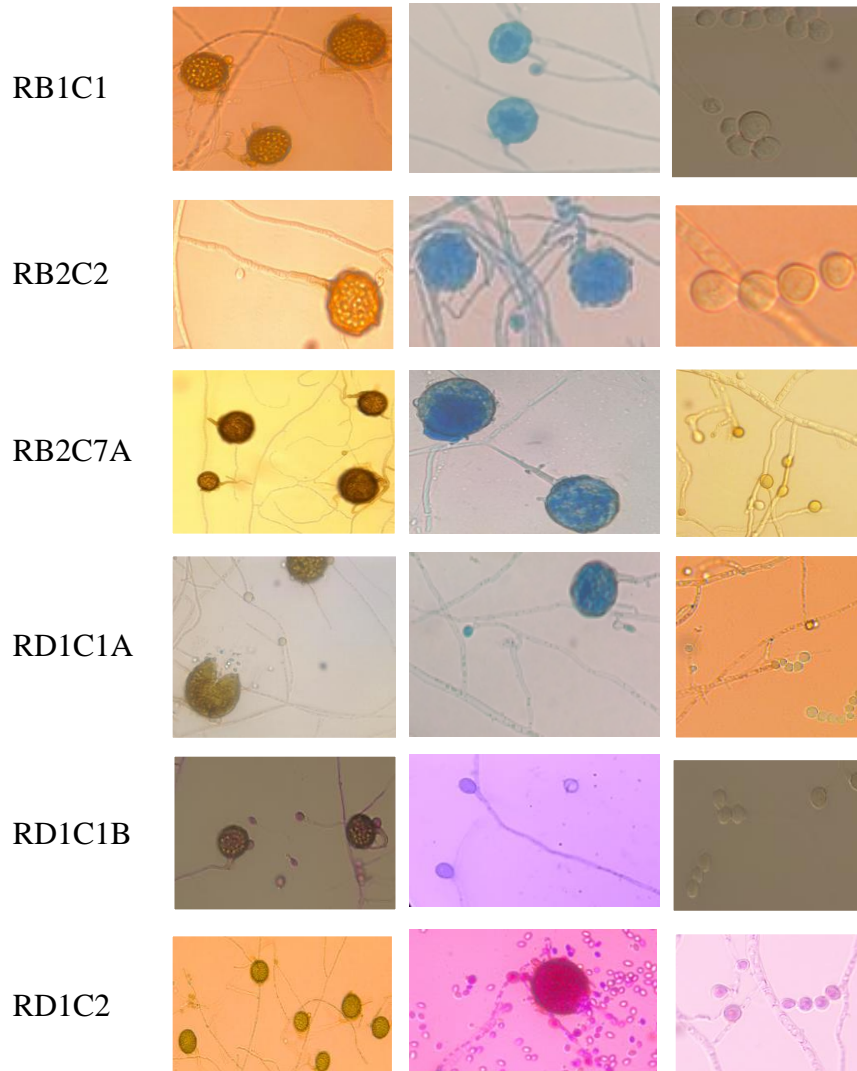


Figura 9

Micrografías de microcultivo de aislados no micotoxigénico obtenidos de granos de cacao: Conidios (aumento: 40x)

RD2C1



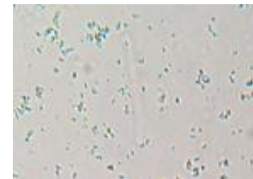
RE2C1



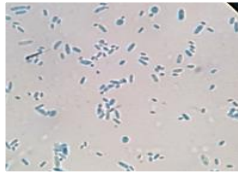
RE1C1



RE2C1B



RE1C2



RE2C3

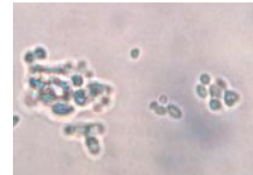


Figura 10

Detección del potencial para producir aflatoxina u ocratoxina por la producción de fluorescencia en medio CAM. Imágenes superiores: Izquierda anversos del aislado toxigénico RA2C1 y de la placa de Petri sin aislado, derecha reversos del aislado toxigénico RA2C1 y de la placa de Petri sin aislado. Imágenes inferiores: Izquierda anversos del aislado no toxigénico RB1C2 y de la placa de Petri sin aislado, derecha reversos del aislado no toxigénico RB1C2 y de placa de Petri sin aislado

