

**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**

**INCIDENCIA DE HONGOS CON POTENCIAL
TOXIGÉNICO PRESENTES EN CAFÉ DE LA
PROVINCIA DE RODRÍGUEZ DE MENDOZA –
AMAZONAS**

Autora: Bach. Fiorela Gaslac Culqui

Asesora: M. Sc. Aline Camila Caetano

Co-asesor: Ph. D. Pedro Javier Mansilla Córdova

Registro: (.....)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2022

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM



ANEXO 3-H

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM

1. Datos de autor 1

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): Gaslae Colqui Fiorela
DNI N°: 72773918
Correo electrónico: fiorelagc.2095@gmail.com
Facultad: Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias
Escuela Profesional: Ingeniería Agriindustrial

Datos de autor 2

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): _____
DNI N°: _____
Correo electrónico: _____
Facultad: _____
Escuela Profesional: _____

2. Título de la tesis para obtener el Título Profesional

Incidencia de Hongos con Potencial Toxigénico Presentes en Café de la Provincia de Rodríguez de Mendoza - Amazonas

3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: M.Sc. Caetano Aline Camila
DNI, Pasaporte, C.E N°: 001630382
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) <https://orcid.org/0000-0002-9910-8518>

Datos de asesor 2

Apellidos y nombres: Ph.D. Mansilla Córdova Pedro Javier
DNI, Pasaporte, C.E N°: 41956404
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) <https://orcid.org/0000-0002-9560-7678>

4. Campo del conocimiento según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos- OCDE (ejemplo: Ciencias médicas, Ciencias de la Salud-Medicina básica- Inmunología)

2.11.01 -- Alimentos y bebidas
https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html

5. Originalidad del Trabajo

Con la presentación de esta ficha, el(la) autor(a) o autores(as) señalan expresamente que la obra es original, ya que sus contenidos son producto de su directa contribución intelectual. Se reconoce también que todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal.

6. Autorización de publicación

El(los) titular(es) de los derechos de autor otorga a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), la autorización para la publicación del documento indicado en el punto 2, bajo la *Licencia creative commons* de tipo BY-NC: Licencia que permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial por lo que la Universidad deberá publicar la obra poniéndola en acceso libre en el repositorio institucional de la UNTRM y a su vez en el Registro Nacional de Trabajos de Investigación-RENATI, dejando constancia que el archivo digital que se está entregando, contiene la versión final del documento sustentado y aprobado por el Jurado Evaluador.

Chapoyas, 03/ Noviembre, 2022

Firma del autor 1

Aline Camila Caetano
Firma del Asesor 1

Firma del autor 2

Firma del Asesor 2

DEDICATORIA

Todo este esfuerzo está dedicado a ti mamá, porque eres mi mayor inspiración y orgullo. Gracias por ser mi cómplice, mi confidente, mi amiga, por ayudarme a crecer, por amarme, pero sobre todo gracias por nunca cortarme las alas.

A mi hermano, familia y amigos por acompañarme durante todo el proceso de aprendizaje y formación profesional, con los que comparto todo lo que aprendo y de quienes también sigo aprendiendo.

Fiorela Gaslac Culqui

AGRADECIMIENTO

A Dios por ser el principio y fin de todo cuanto existe, que me ha dado la vida y fortaleza para seguir cumpliendo mis objetivos.

A mi mamá Teresa de Jesús Culqui Torres por su apoyo incondicional y su amor infinito, confiar y creer en mí en todo momento, por sus consejos, valores y principios que me ha inculcado.

Al Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDESCES) por su apoyo con la infraestructura que hizo posible la ejecución de este trabajo y a todas las personas que lo conforman.

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Facultad de Ingeniería y Ciencia Agrarias, a la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial y a todos los docentes por compartir sus conocimientos durante mi formación académica y profesional.

A la Clínica Fitopatológica, lugar donde no solo ejecuté mi proyecto de tesis, si no que se convirtió en mi segunda casa, donde conocí a personas maravillosas de las que aprendí y sigo aprendiendo, y con los que compartí momentos gratos que guardaré siempre en mi corazón.

A mi asesora la M. Sc. Aline Camila Caetano y mi coasesor el Ph. D. Pedro Javier Mansilla Córdova, por su dirección, conocimiento, enseñanza, rectitud y colaboración que hizo posible el desarrollo de este trabajo.

A la Cooperativa Agraria Rodríguez de Mendoza (COOPARM), el Ing. Oswaldo Barranzuela Cepeda y el Ing. José Amancio Rodríguez Culqui, por todo el apoyo brindado para la colección de las muestras (desde el contacto con los productores hasta el envío de muestras).

A los productores el Sr. José Epifanio Arista Pinedo y el Sr. Segundo Prospero Santillán Espinoza quienes proporcionaron las muestras de café evaluadas en mi proyecto de tesis.

Al Ing. Segundo Grimaldo Chavez Quintana por el apoyo con una incubadora, la que permitió la realización del presente trabajo.

Al Dr. Paúl Lama Isminio por la interpretación de los análisis de suelos para los productores de café de la provincia de Rodríguez de Mendoza.

A la Dra. Natalie Verónica Rondinel Mendoza por su disposición en apoyarme en el proceso de análisis estadístico de los resultados.

A la Universidad Nacional de Jaén por la subvención durante 6 meses, mediante el proyecto “Perfil de compuestos orgánicos volátiles del grano verde y de la bebida de café determinado por GC-MS” - VOCCOFFEE, ganador del Prointec-2021, con Resolución de Vicepresidencia de Investigación n° 400-2022-UNJ.

Finalmente, a todos mis amigos y amigas con los que compartí dentro y fuera de las aulas, que se convierten en mis amigos de vida y aquellos que serán mis colegas, gracias por todo su apoyo y diversión.

Fiorela Gaslac Culqui

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

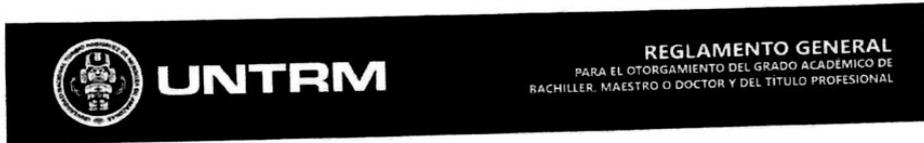
**Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI
RECTOR**

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

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

**Mg. Sc. ARMSTRONG BARNARD FERNANDEZ JERI
Decano de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias**

VISTO BUENO DE LA ASESORA DE LA TESIS



ANEXO 3-L

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 Incidencia de Hongos con Potencial Toxigénico Presentes en Café de la Provincia de Rodríguez de Mendoza - Amazonas; del egresado Fiorela Gaslac Cuzqui 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, 31 de agosto de 2022

Aline Camila Caetano
Firma y nombre completo del Asesor
M. Sc. Aline Camila Caetano

VISTO BUENO DEL CO-ASESOR DE LA TESIS



ANEXO 3-L

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 Incidencia de Hongos con Potencial Toxicogénico Presentes en café de la Provincia de Rodríguez de Mendoza - Amazonas; del egresado Fiorela Gastac Colqui 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.



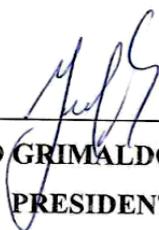
Chachapoyas, 31 de agosto de 2022



Firma y nombre completo del Asesor

Ph.D. Pedro Javier Mansilla Cordova

JURADO EVALUADOR DE LA TESIS



Ing. MsC. SEGUNDO GRIMALDO CHAVEZ QUINTANA
PRESIDENTE

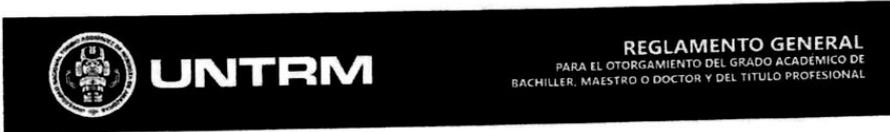


Ing. Ms. ROBERT JAVIER CRUZALEGUI FERNÁNDEZ
SECRETARIO



Ing. Ms. ROBERTO CARLOS MORI ZABARRURÚ
VOCAL

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



ANEXO 3-Q

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

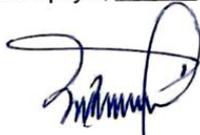
Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

Incidencia de Hongos con Potencial Toxigénico Presentes en
Café de la Provincia de Rodríguez de Mendoza - Amazonas,
presentada por el estudiante ()/egresado (x) Fiorela Gaslac Culqui
de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial
con correo electrónico institucional 7277791842@untrm.edu.pe
después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- a) La citada Tesis tiene 11 % 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.
- b) 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, 19 de setiembre del 2022



SECRETARIO



VOCAL



PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

.....
.....

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



UNTRM

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

ANEXO 3-5

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 12 de octubre del año 2022 siendo las 17 horas, el aspirante: Fiorela Gaslar Calqui, asesorado por M. Sc. Aline Camila Caetano defiende en sesión pública presencial () / a distancia () la Tesis titulada: Incidencia de Hongos con Potencial Toxigénico Presentes en Café de la Provincia de Rodríguez de Mendoza - Amazonas, para obtener el Título Profesional de Ingeniera Agroindustrial, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: Ing. Msc. Segundo Giraldo Chavez Quintana
Secretario: Ing. Ms. Robert Javier Cruzalegui Fernández
Vocal: Ing. Ms. Roberto Carlos Mori Zabarburo



Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

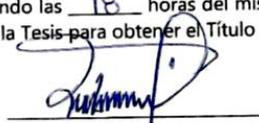
Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

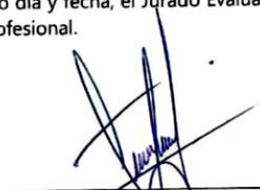
Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado () por Unanimidad () / Mayoría () Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 18 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.


SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

ÍNDICE DEL CONTENIDO

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS.....	vi
VISTO BUENO DE LA ASESORA DE LA TESIS.....	vii
VISTO BUENO DEL CO-ASESOR DE LA TESIS.....	viii
JURADO EVALUADOR DE LA TESIS.....	ix
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS.....	x
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS.....	xi
ÍNDICE DEL CONTENIDO.....	xii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
I. INTRODUCCIÓN.....	20
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
2.1. Lugar de estudio.....	22
2.2. Procedimiento.....	22
2.2.1. Muestreo de los frutos y granos de café.....	22
2.2.2. Siembra directa de las muestras.....	22
2.2.3. Aislamiento e identificación de las colonias fúngicas.....	23
2.2.4. Determinación de AFLA y OTA en medio agar coco (CAM).....	25
2.3. Análisis de datos.....	25
III. RESULTADOS.....	26
3.1. Codificación de los aislados.....	26
3.2. Contaminación fúngica de los frutos y granos de café.....	26
3.3. Morfología e identificación de las colonias.....	29
3.4. Detección de OTA en medio CAM.....	33
IV. DISCUSIÓN.....	34
V. CONCLUSIONES.....	37

VI.	RECOMENDACIONES.....	38
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
	ANEXOS.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Porcentaje de infección fúngica de los frutos y granos de café orgánico de la provincia de Rodríguez de Mendoza – Amazonas de la primera y segunda colecta.....	27
Tabla 2 Porcentaje de infección fúngica de los frutos y granos de café convencional de la provincia de Rodríguez de Mendoza – Amazonas de la primera y segunda colecta..	29
Tabla 3 Descripción de las características macro y microscópicas de los hongos potencialmente toxigénicos.....	33
Tabla 4 Descripción macroscópica y microscópica de colonias del género <i>Aspergillus</i> aisladas de la colecta 1	46
Tabla 5 Descripción macroscópica y microscópica de colonias del género <i>Penicillium</i> aisladas de la colecta 1	51
Tabla 6 Descripción macroscópica y microscópica de colonias del género <i>Aspergillus</i> aisladas de la colecta 2.....	56
Tabla 7 Descripción macroscópica y microscópica de colonias del género <i>Penicillium</i> aisladas de la colecta 2.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama adaptado de la metodología de Pitt & Hocking (2009)	23
Figura 2 Características micromorfológicas de hongos de los géneros <i>Penicillium</i> (a) y <i>Aspergillus</i> (b)	24
Figura 3 Porcentaje de infección fúngica de los frutos y granos de café orgánico de la provincia de Rodríguez de Mendoza – Amazonas de la primera y segunda colecta.....	28
Figura 4 Porcentaje de infección fúngica de los frutos y granos de café convencional de la provincia de Rodríguez de Mendoza – Amazonas de la primera y segunda colecta..	29
Figura 5 <i>P. verrucosum</i> (PCA2), <i>A. westerdijkiae</i> (PCA19) colonias en medios CYA y MEA después de 7 días de incubación a 25°C; anverso (a, c, e, g); reverso (b, d, f, h).	31
Figura 6 <i>P. verrucosum</i> (PCA2), <i>A. westerdijkiae</i> (PCA19) después de 7 días a 25 °C; penicilli (a) con barra de 20 µm y cabeza conidial (b) con barra de 30 µm; conidios de <i>P. verrucosum</i> (c) y de <i>A. westerdijkiae</i> (d) con barras de 10 µm.....	31
Figura 7 Aislados que fluorescen (PCA2, PCA19) y que no fluorescen (SOS30, SCS12) en medio CAM examinado bajo luz ultravioleta de 366 nm. PCA2: <i>P. verrucosum</i> ; SOS30: <i>P. pinophilum</i> ; PCA19: <i>A. westerdijkiae</i> ; CSC12: <i>A. versicolor</i> . Colonias evaluadas después de 5 días a 30 °C.....	33
Figura 8 Clave dicotómica general adaptado de Pitt & Hocking, (2009) pág. 55	43
Figura 9 Clave general del género <i>Aspergillus</i> adaptado de Pitt & Hocking, (2009) pág. 277.....	44
Figura 10 Clave general del género <i>Penicillium</i> adaptado de Pitt & Hocking, (2009) pág. 194.....	44
Figura 11 <i>Aspergillus</i> spp. (POM6, POS5, PCM23, PCM24) después de 7 días de incubación a 25°C; anverso (a, c, e, g, i, k, m, o); reverso (b, d, f, h, j, l, n, p).....	45
Figura 12 Género <i>Aspergillus</i> (POM6, PCM23, POS5, PCM24) después de 7 días a 25°C; cabeza conidial (a; b, e; c; d) con barras de 30 µm; conidios de PCM23 (e) y PCM24 coloreada con fucsina ácida (f) con barras de 10 µm	46
Figura 13 <i>P. aurantiogriseum</i> (POS2), <i>P. brevicompactum</i> (POS3), subgénero <i>Penicillium</i> (POA17) después de 7 días de incubación a 25°C; anverso (a, c, e, g, i, k); reverso (b, d, f, h, j, l)	48
Figura 14 Subgénero <i>Penicillium</i> (PCA7, PCA12), <i>P. fellutanum</i> (PCA9), <i>P. solitum</i> (PCA11) después de 7 días de incubación a 25°C; anverso (a, c, e, g, i, k, m, o); reverso (b, d, f, h, j, l, n, p)	49

Figura 15 <i>P. aurantiogriseum</i> (a, b), <i>P. brevicompactum</i> (c, d) subgénero <i>Penicillium</i> (e, f), subgénero <i>biverticillium</i> (g, h) después de 7 días a 25°C; penicilos sin colorante (a, b, c, d) penicilos con colorante fucsina ácida (e, f, g, h) con barras de 20 µm.....	50
Figura 16 Subgénero <i>Penicillium</i> PCA7 (a, b, c, d, e) y PCA12 (j), <i>P. fellutanum</i> (f, g, h), <i>P. solitum</i> (i) después de 7 días a 25°C; penicilos sin colorante (a, b, c, d, e, h, i, j) penicilos con fucsina ácida (f, g) con barras de 20 µm, conidios de subgénero <i>Penicillium</i> PCA7 (l) y PCA12 (k), <i>P. fellutanum</i> (m) con barras de 10 µm	50
Figura 17 Género <i>Aspergillus</i> (SOV4, SOS23, SOS24), <i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tirab. (SOS23, SCS12) después de 7 días de incubación a 25°C; anverso (a, c, e, g, i, k, m, o, q, s); reverso (b, d, f, h, j, l, n, p, r, t)	55
Figura 18 Género <i>Aspergillus</i> SOV4 (a), SOV23 (b) y SOV24 (d), <i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tirab. (c; e, f) después de 7 días a 25°C; cabezas conidiales (a, b, c, d, e, e, f) con barras de 30 µm; conidios de SOV4 (g) con barras de 10 µm	56
Figura 19 Colonias en medio CREAD después de 7 días de incubación a 25°C; anverso (a, c, d); reverso (b, f, e); <i>Penicillium</i> sp. (SOS34) que produce bastante ácido, <i>P. brevicompactum</i> (PCA14) con poca producción de ácido, <i>P. viridicatum</i> (SOS5) que no produce ácido	59
Figura 20 Colonias de aislados productores de bastante ácido: <i>Penicillium</i> sp. (SOS34) incubadas por 7 días a 25°C; anverso (a, c); reverso (b, d)	59
Figura 21 Penicilo de <i>Penicillium</i> sp. (a) después de 7 días a 25°C con barra de 20 µm; conidios (b) con barras de 10 µm	60
Figura 22 Colonias de aislados que producen poco ácido: <i>P. brevicompactum</i> (SOS11, SOS12, SOS13, SOS14, SOS15), subgénero <i>Penicillium</i> (SOS32) después de 7 días de incubación a 25°C; anverso (a, c, e, g, i, k, m, o, q, s, u, w); reverso (b, d, f, h, j, l, n, p, r, t, v, x).....	61
Figura 23 <i>P. brevicompactum</i> SOS11 (a), SOS12 (g), SOS13 (b), SOS14 (c, d), SOS15 (h, e, i, j, k, l); subgénero <i>Penicillium</i> SOS32 (f); después de 7 días a 25°C; penicilos (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l), penicilo con colorante fucsina ácida (h) con barras de 20 µm, conidios de <i>P. brevicompactum</i> SOS11 (m), SOS12 (r), SOS13 (o), SOS15 (q), subgénero <i>Penicillium</i> SOS32 (p) con barras de 10 µm	62
Figura 24 Colonias de aislados no productores de ácido: <i>P. viridicatum</i> (SOS5, SOS6), después de 7 días de incubación a 25°C; anverso (a, c, e, g); reverso (b, d, f, h).....	63
Figura 25 <i>P. viridicatum</i> (a, b, c, d, e, f, g), después de 7 días a 25°C; penicilos (a, b, c, d, e) con barras de 20 µm, conidios (f, g) de 10 µm.....	63

Figura 26 Encuesta realizada a los productores de café de la provincia de Rodríguez de Mendoza..... 66

RESUMEN

Durante la etapa de cultivo y proceso postcosecha, el café está expuesto a múltiples factores de deterioro. Estos factores son los responsables de la contaminación fúngica en los frutos y granos de café, siendo el género *Aspergillus* y *Penicillium* fuente productoras de aflatoxina (AFLA) y ocratoxina A (OTA) las cuales son toxinas carcinógenas, nefrotóxicas, teratogénicas, hepatotóxicas y pueden afectar negativamente a la salud humana. La presencia de estas toxinas en el café es indeseable porque pueden ser una barrera para la exportación. En este sentido, se evaluó la microbiota de los granos de café procedentes de la provincia de Rodríguez de Mendoza - Amazonas (Perú) y la incidencia de hongos con potencial toxigénico. En la investigación se encontró baja incidencia (hasta 7, 19, 34% de infección) en las muestras de café orgánico y convencional por los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y alta incidencia (83, 90, 100 % de infección) por otros géneros de hongos filamentosos (*Cladosporium*, *Pestalotias*, *Rhizopus*, *Colletotrichum*, entre otros) que fueron identificados por sus características biológicas. Las principales especies identificadas fueron *A. versicolor*, *P. brevicompactum* Dierckx, *P. aurantiogriseum* Dierckx, *P. fellutanum* Biourge, *P. viridicatum* Westling y *P. solitum* Westling. También fueron identificadas colonias de *P. verrucosum* y *A. westerdijkiae*, dos aislados posiblemente toxigénicos, los cuales presentaron fluorescencia en medio agar coco (CAM) bajo luz ultravioleta.

Palabras claves: micotoxinas, *Penicillium*, *Aspergillus*, ocratoxina A

ABSTRACT

During the cultivation stage and post-harvest process, coffee is exposed to multiple deterioration factors. These factors are responsible for fungal contamination in coffee cherries and beans, with the *Aspergillus* and *Penicillium* genera being sources of aflatoxin (AFLA) and ochratoxin A (OTA), which are carcinogenic, nephrotoxic, teratogenic, hepatotoxic toxins and can affect negatively human health. The presence of these toxins in coffee is undesirable because they can be an exportation barrier. In this sense, the mycobiota of coffee from the province of Rodríguez de Mendoza - Amazonas (Peru) and the incidence of toxigenic potential fungi were evaluated. In the investigation, a low incidence was found (up to 7, 19, 34% of infection) in the samples of organic and conventional coffee by the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and a high incidence (83, 90, 100% of infection) by other genera of coffee. filamentous fungi (*Cladosporium*, *Pestalotias*, *Rhizopus*, *Colletotrichum*, among others) that were identified by their biological characteristics. The main species identified were *A. versicolor*, *P. brevicompactum* Dierckx, *P. aurantiogriseum* Dierckx, *P. fellutanum* Biourge, *P. viridicatum* Westling, and *P. solitum* Westling. Colonies of *P. verrucosum* and *A. westerdijkiae*, two possibly toxigenic isolates, were also identified, which showed fluorescence in coconut agar medium (CAM) under ultraviolet light.

Keywords: mycotoxins, *Penicillium*, *Aspergillus*, ochratoxin A

I. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos que comúnmente contaminan una amplia gama de cultivos como cereales, nueces, hierbas, especias, frutas o semillas oleaginosas. Algunas micotoxinas son altamente tóxicas o cancerígenas (Bessaire et al., 2019), siendo *Aspergillus* uno de los tres géneros de hongos más importantes en el deterioro de alimentos y responsable por la producción de micotoxinas, habiendo otros géneros de hongos productores de micotoxinas como *Fusarium* y *Penicillium* (Taniwaki et al., 2018). Las micotoxinas se producen naturalmente (Paterson et al., 2014), pero la infección puede tener lugar antes de la cosecha o posteriormente, durante el secado y almacenamiento del café. Estos hongos tienen la capacidad de infectar las plantas durante el crecimiento sin dañar la planta misma la cual proporciona un mecanismo listo para infectar a los granos antes de la cosecha (Taniwaki et al., 2018)

Las especies de *Aspergillus* producen micotoxinas importantes, en particular las aflatoxinas (AFLA), producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus*. La ocratoxina A (OTA) es producida por varias especies de *Aspergillus*, en particular *A. carbonarius*, *A. westerdijkiae* y *A. steynii*. Estas especies son responsables de la producción de OTA en climas más cálidos. También puede ser producida por el *P. verrucosum* en productos básicos de las zonas templadas frías, especialmente en cereales (Pitt & Hocking, 2009), siendo toxinas nefrotóxicas, inmunosupresoras, teratogénicas, hepatotóxicas y cancerígenas (Castellanos-Onorio et al., 2011; Iamanaka et al., 2014; Joosten et al., 2001; Kuntawee & Akarapisan, 2015; Taniwaki, 2005). Estas moléculas son estables y difícilmente son degradadas bajo condiciones de cocción, tostado y fermentación (Boudra et al., 1995).

Las cerezas y los granos de café están sujetos a la contaminación y consecuente a la colonización por microorganismos durante las diferentes etapas de desarrollo, durante el cultivo, cosecha, procesamiento, transporte y almacenamiento (Noonim et al., 2008; Silva et al., 2008). Las malas prácticas de procesamiento como recoger las cerezas caídas del suelo durante la cosecha, lavar mal el pergamino del café, la superficie del ambiente de secado, la rehumectación por la lluvia durante el proceso de secado, así como almacenar café parcialmente seco durante largos períodos que pueden favorecer en el crecimiento

de hongos en café afectando la calidad y seguridad del producto final debido a la producción de micotoxinas (Noonim et al., 2008; Winston et al., 2005).

La producción de OTA en los granos de café depende de muchos factores como la temperatura, humedad y las condiciones de manipulación (Yao et al., 2015) y ha sido reportado la producción de OTA en café y sus derivados, desde climas templados a tropicales (Kuntawee & Akarapisan, 2015).

La presencia de OTA en el café es indeseable porque es una barrera al comercio, afectando las economías de los países productores (Suárez-Quiroz et al., 2004) además que el café es una de las bebidas mundialmente consumidas y su contribución a la ingesta dietética individual de OTA podría ser relativamente alta (Castellanos-Onorio et al., 2011). En este sentido, la legislación de la Unión Europea establece un nivel máximo de OTA en café tostado ($5.0 \mu\text{g kg}^{-1}$) y café instantáneo ($10.0 \mu\text{g. kg}^{-1}$) (Comisión Europea, 2006).

La colonización de hongos toxigénicos y la formación de OTA en el café viene siendo estudiada por varios autores. Encontrando incidencia promedio de 78% de colonización con *Aspergillus* sección *Circumdati* con *A. westerdijkiae* y *A. melleus* como especie predominante. *Aspergillus* pp. de sección *Nigri* se encontraron en el 75% en granos de café cultivados en dos regiones de Tailandia (Maman et al., 2021; Noonim et al., 2008). Mediante siembra directa Suárez-Quiroz et al., (2004) halló niveles de contaminación de 80, 72 y 92% en café pergamino, cereza y seco; y 20, 34 y 15% para café verde. Además Aguilar-Alvarez et al. (2021) reveló que mediante el análisis estadístico que la prevalencia de OTA depende de la variedad, tipo y procesamiento ($p \leq 0.05$) y que no se observaron diferencias significativas entre el café orgánico y el cultivado convencionalmente.

La finalidad del presente trabajo fue evaluar la incidencia de hongos con potencial toxigénico e identificar la microbiota en las diferentes etapas del procesamiento de los granos de café de la provincia de Rodríguez de Mendoza, Amazonas.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Lugar de estudio

El aislamiento de hongos y la determinación del potencial toxigénico de los aislados, fue realizada en el área de la Clínica Fitopatológica, 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. Muestreo de los frutos y granos de café

La recolección de muestras de frutos y granos de café se realizó en la provincia de Rodríguez de Mendoza a través de la Cooperativa Agraria Rodríguez de Mendoza (COOPARM). Las muestras de frutos y granos de café orgánico se recolectaron en el caserío de Cochamal en los meses mayo y julio del año 2021. Las muestras de frutos y granos de café convencional fueron colectadas del caserío de Shucush en los meses de mayo y noviembre del año 2021.

Se colectaron muestras de 4 etapas de la cadena productiva del café utilizando el método aleatorio simple: (1) 700 g de frutos verdes, (2) 500 g de frutos maduros, (3) 400 g de granos en la etapa de secado y (4) 400 g de granos almacenados. Estas muestras se utilizaron para el aislamiento de los hongos.

Cada una de las muestras fueron dispuestas en bolsas de polietileno (7×10 cm) con cierre hermético y transportadas en una caja de poliestireno de 60×40×40 cm, la cual contenía gel pack congelados para mantener las muestras frescas hasta llegar al laboratorio. Las muestras se porcionaron y almacenaron bajo congelación (-18 °C), hasta su evaluación.

2.2.2. Siembra directa de las muestras

Las cerezas de café y pergamino con mucílago tienen un alto contenido de humedad y se contaminan fácilmente (Maman et al., 2021), así como la manipulación también puede contaminar las muestras, por lo que se desinfectaron superficialmente por inmersión en solución de hipoclorito de sodio al 0.4% durante 1 min (2 min en caso de los frutos verdes y maduros).

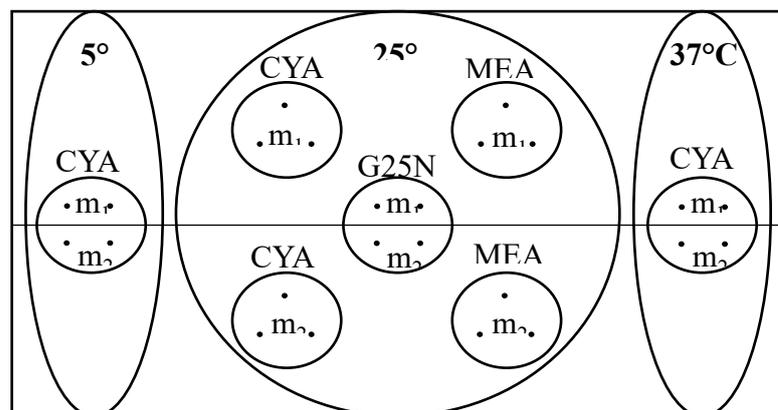
Las muestras de los frutos de café fueron sembradas en 2 placas de Petri (15 cm de diámetro) con 15 granos en cada placa y los granos de café se colocaron en 1 placa (15 cm de diámetro) con 30 granos por placa conteniendo agar dicloran 18% glicerol. Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 5 días. Las colonias que aparecieron sobre los frutos y granos se examinó visualmente en un estereoscopio SteREO Discovery.V8, las partículas con presencia de colonias fueron contabilizadas y los resultados fueron expresados en porcentaje de granos infectados (número de frutos/granos contaminados dividido por el número de frutos/granos sembrados y multiplicado por 100) (Pitt & Hocking, 2009).

2.2.3. Aislamiento e identificación de las colonias fúngicas

Las colonias fúngicas se aislaron individualmente en tubos de microcentrífuga de polipropileno conteniendo 250 µl de agar semilíquido. Cada colonia fúngica fue identificada a través de protocolos específicos para cada género establecidos por Pitt & Hocking (2009). Los aislados fueron sembrados en placas de Petri con medios CYA, MEA en tres puntos equidistantes del centro, del borde de la placa y entre sí; en G25N dos colonias por placa e incubadas a 25 °C durante 7 días. Además, como controles se inoculó en medio CYA dos colonias por placa y se incubó a 5 °C y 37 °C durante 7 días (Figura 1).

Figura 1

Diagrama adaptado de la metodología de Pitt y Hocking (2009)



Nota. m₁ (microorganismo 1) y m₂ (microorganismo 2)

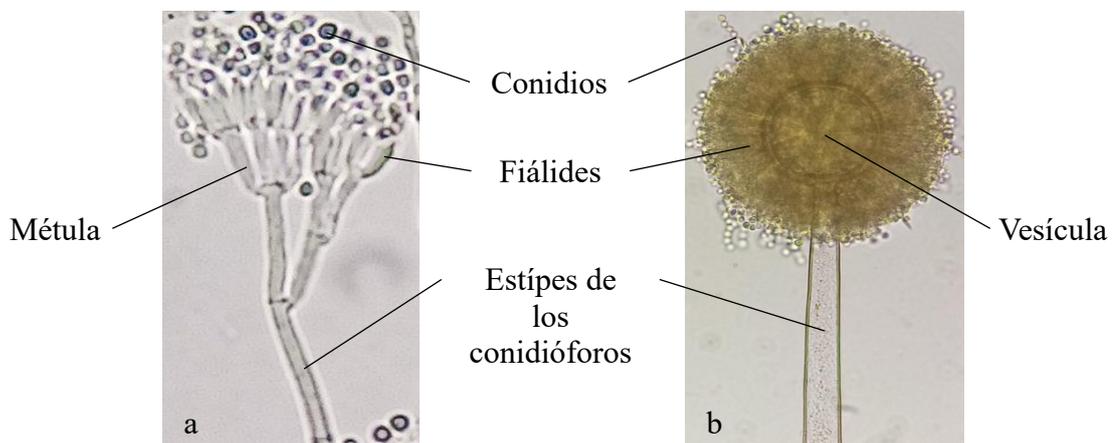
Las características macromorfológicas, tales como la tasa de crecimiento de las colonias, textura, grado de esporulación, color del micelio, esporulación, pigmentos solubles,

exudados, reverso de la colonia, producción de esclerocios, clamidosporas y cleistotecios, fueron registrados. Además, el diámetro de cada una de las colonias fue medido diariamente con vernier, hasta antes que las colonias se sobrepongan.

Las características micromorfológicas (Figura 2), tales como forma de los conidios, color del estipe y dimensión, forma y textura del estipe, vesículas, métulas, fialides, conidios, clamidosporas, cleistotecios, ascos y ascosporas fueron observadas y fotografiadas con la ayuda de un microscopio de luz Primo Star ZEISS (Samson et al., 2014).

Figura 2

Características micromorfológicas de hongos de los géneros Penicillium (a) y Aspergillus (b)



Las evaluaciones de características macro y micromorfológicas se realizaron de las colonias incubadas a 25 °C. Las otras dos temperaturas se usaron para la primera fase de caracterización y el uso de las claves dicotómicas de Pitt & Hocking (2009). Para la visualización de las estructuras microscópicas se realizaron montajes de las colonias fúngicas en láminas portaobjeto con ácido láctico, que es un buen fluido de montajes microscópicos y permite ver el color natural de la estructura de los aislados, y alcohol 70% para dispersar las esporas y prevenir burbujas cubriendo con laminillas cubreobjeto. Existe una amplia variedad de colorantes para trabajos micológicos, pero la mayoría de ellos requiere mucho tiempo de preparación o tarda en actuar sobre las paredes y esporas de los hongos que resultan ser resistentes a los tintes; la fucsina ácida es el colorante más eficaz para su uso en micología alimentaria (Pitt & Hocking, 2009), por ese motivo, para pigmentar la estructura de algunas colonias fúngicas se usó la fucsina ácida.

Adicionalmente se realizó la técnica del microcultivo descrita por (Alfenas & Mafia, 2007) para las colonias fúngicas que no fue posible observar estructuras limpias, claras y completas en los montajes realizados. Para realizar el microcultivo, fueron utilizadas placas de Petri que contenían papel toalla cubriendo el fondo de la placa, ambos esterilizados. Sobre el papel, fueron colocadas varillas de vidrio en forma triangular. El papel toalla se humedeció con agua estéril y, sobre las varillas fue colocada la lámina portaobjeto. Un cubo de medio MEA, de aproximadamente 1 × 1 cm, fue depositado sobre la lámina portaobjeto. La siembra del aislado se realizó en los cuatro lados del cubo y, en seguida, la laminilla cubreobjeto fue colocada sobre el cubo de medio. La placa fue tapada, rotulada y sellada con film plástico. Para auxiliar en la identificación de los microorganismos también fueron utilizados medios diferenciadores, como AFPA (Agar *Aspergillus flavus* y *parasiticus*) y CY20S (Agar Czapek extracto de levadura con 20% de sacarosa) para colonias del género *Aspergillus*, CREAD (Agar creatina sacarosa dicloran) y DRYES (Agar dicloran rosa de bengala extracto de levadura sacarosa) para colonias del género *Penicillium*.

2.2.4. Determinación de AFLA y OTA en medio agar coco (CAM)

Como una forma rápida para la determinación de producción de extrolitos, se seleccionaron aislados del género *Penicillium* y *Aspergillus* ya que son géneros reportados como posiblemente toxigénicos. Las colonias fueron inoculadas en el centro de la placa con medio CAM e incubadas a 30 °C por 5 días, acorde con lo descrito por Kuntawee & Akarapisan (2015) y Lin & Dianese (1976). Después de este período, las placas fueron observadas y fotografiadas bajo luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm. Las cepas que llegaron a presentar un color azul fluorescente en el halo de la colonia, indicó que es productora de OTA.

2.3. Análisis de datos

Como los datos del experimento fueron esencialmente de conteo, por la naturaleza de los factores o variables nominales que han sido utilizados, como el tratamiento, el tipo de sistema y la respuesta (presencia o ausencia de hongos), se utilizó la prueba estadística chi-cuadrado de Cochran-Mantel-Haenszel, que es exclusivamente para datos de conteo. Todos los resultados fueron analizados con el paquete estadístico del software R (R Development Core Team, 2020).

III. RESULTADOS

3.1. Codificación de los aislados

La codificación de las colonias aisladas se hizo de la siguiente manera:

P: primera colecta

S: segunda colecta

O: café orgánico

C: café convencional

V: frutos verdes

M: frutos maduros

S: granos secando

A: granos almacenados

00: número secuencial

3.2. Contaminación fúngica de los frutos y granos de café

Durante el año 2021 se colectaron muestras de la cadena productiva de café orgánico y convencional: dos estados de madurez, frutos verdes y frutos maduros; dos etapas de producción, granos secando y granos almacenados de la provincia de Rodríguez de Mendoza – Amazonas, y se estudió la micobiota presente con enfoque en hongos potencialmente toxigénicos.

De acuerdo a la Tabla 1 y Figura 3, en las muestras de frutos verdes de la segunda colecta hubo un 5% de infección por los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*. En los frutos maduros se encontró 5% de infección por el género *Aspergillus* en la primera colecta, mientras que en la segunda colecta 5% del género *Fusarium*. Para los granos secando de la primera colecta se registró la presencia de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* en niveles de infección de 2, 3 y 10%, respectivamente. No obstante, para la segunda colecta se registró niveles de 19 y 34% de infección para los géneros *Penicillium* y *Fusarium*. Finalmente, en las muestras de granos de café almacenados de la primera colecta se encontró 2 y 16% de infección por los géneros *Penicillium* y *Fusarium* y solo el 4% de infección por el género *Fusarium* en la segunda colecta. De esta forma, todas las muestras de café orgánico evaluadas estaban comúnmente infectadas por el género *Fusarium* y por otros géneros de hongos filamentosos que no fueron especificados. Los frutos verdes,

frutos maduros y granos secando estaban infectados por el género *Aspergillus* y los frutos maduros, granos secando y granos almacenados infectados por el género *Penicillium*.

Tabla 1

Porcentaje de infección fúngica de los frutos y granos de café orgánico de la provincia de Rodríguez de Mendoza – Amazonas de la primera y segunda colecta

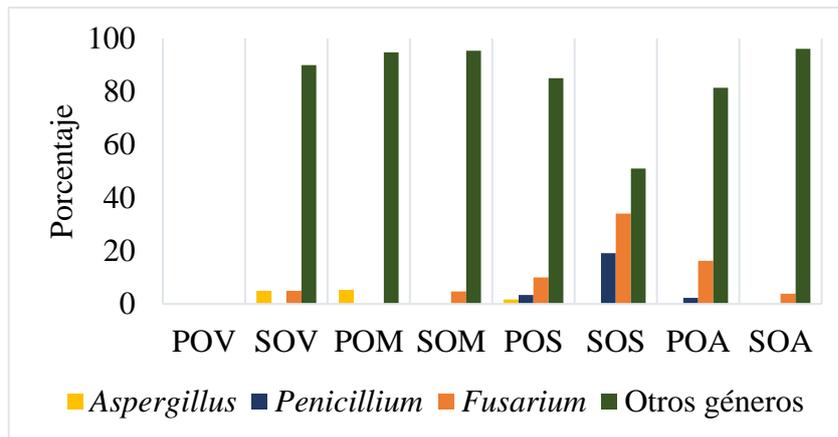
Géneros aislados	POV	SOV	POM	SOM	POS	SOS	POA	SOA
<i>Aspergillus</i>	NA	5	5	-	2	-	-	-
<i>Penicillium</i>	NA	-	-	-	3	19	2	-
<i>Fusarium</i>	NA	5	-	5	10	34	16	4
Otros géneros	NA	90	95	95	85	51	81	96

Al realizar el análisis de datos, el p-valor nos otorga la información de la existencia (p-valor < 0.05) o no (p-valor > 0.05) de asociación entre el tratamiento evaluado (etapas de procesamiento de café) y la presencia de especies de hongos siendo controlada o no por la variable sistema (Orgánico y Convencional). Por otro lado, la razón de probabilidades o razón de posibilidades (Common odds ratio) evalúa la relación entre las variables nominales indicando si las chances de apareamiento de los géneros fúngicos son iguales en las dos colectas (valor = 1), si la chance de encontrar los géneros identificados es mayor en la primera colecta (valor > 1) o si la chance de que los géneros fúngicos aparezcan es mayor en la colecta 2 que en la colecta 1 (valor < 1). Con base en eso, para frutos verdes (p-valor=0.2458) no existe asociación entre tratamiento y presencia de hongos siendo independientes dentro de cada sistema de producción y hay una mayor chance de encontrar hongos en la segunda colecta que en la primera (razón de probabilidades común = 0). Para frutos maduros (p-valor = 2.2e-16), existe asociación entre tratamiento y presencia de hongos, siendo controlada por la variable sistema de producción y existe una mayor probabilidad de encontrar hongos en la segunda etapa (razón de probabilidades = 0.0878776). En el caso de los granos secando (p-valor = 7.456e-13) y granos almacenados (p-valor = 1.803e-05), existe asociación entre tratamiento y presencia de hongos, siendo controlada por la variable sistema de producción (Orgánico y Convencional) y hay una mayor chance de encontrar hongos en la primera colecta que en la segunda (razón de probabilidades común = 36.71429 y 2.398601 para granos secando y almacenados, respectivamente). Además, el p-valor menor que 0.05 (p-valor = 9.471e-11 y p-valor = 2.2e-16) indica que el tratamiento y el

sistema utilizado en la producción de café controlan el aparecimiento de los géneros fúngicos estudiados en la primera y segunda colecta.

Figura 3

Porcentaje de infección fúngica de los frutos y granos de café orgánico de la provincia de Rodríguez de Mendoza – Amazonas de la primera y segunda colecta



De manera similar, las cuatro muestras de café convencional presentaron infección por hongos filamentosos de otros géneros no identificados; los frutos maduros, granos secando y granos almacenados infectados por los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*; y, los granos almacenados infectados por el género *Penicillium*.

Los frutos verdes de las dos colectas mostraron 100% de infección por otros géneros, las muestras de frutos maduros en la primera colecta presentaron 7% de infección por el género *Aspergillus* y, 11 y 17% de infección por el género *Fusarium* en la primera y segunda colecta, respectivamente. Para los granos secando se encontró 10% de infección por el género *Fusarium* en la primera colecta y 5% de infección por los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* en la segunda colecta. En las muestras de granos almacenados de la primera colecta se encontró el 2, 12 y 10% de infección por los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, respectivamente. Toda esta información se puede observar en la Tabla 2 y Figura 4.

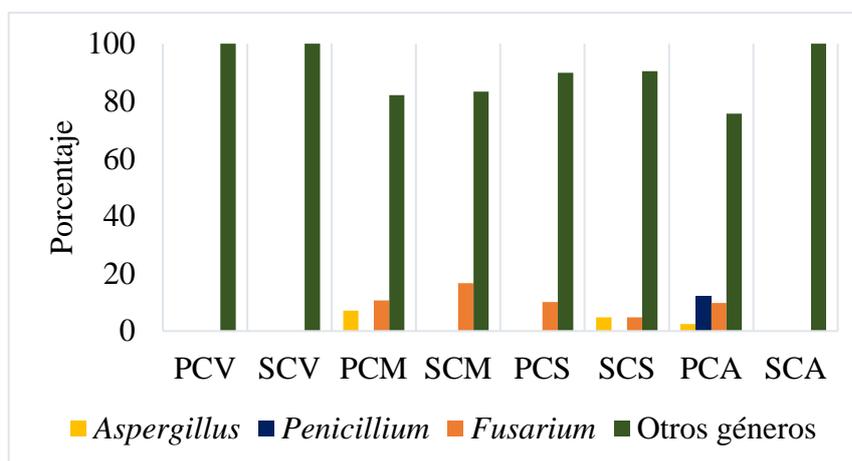
Tabla 2

Porcentaje de infección fúngica de los frutos y granos de café convencional de la provincia de Rodríguez de Mendoza – Amazonas de la primera y segunda colecta

Géneros aislados	PCV	SCV	PCM	SCM	PCS	SCS	PCA	SCA
<i>Aspergillus</i>	-	-	7	-	-	5	2	-
<i>Penicillium</i>	-	-	-	-	-	-	12	-
<i>Fusarium</i>	-	-	11	17	10	5	10	-
Otros géneros	100	100	82	83	90	90	76	100

Figura 4

Porcentaje de infección fúngica de los frutos y granos de café convencional de la provincia de Rodríguez de Mendoza – Amazonas de la primera y segunda colecta



3.3. Morfología e identificación de las colonias

Todas las colonias aisladas fueron caracterizadas e identificadas utilizando la clave dicotómica general de Pitt y Hocking (2009) descrita en la Figura 8, principalmente en base a sus características macro y microscópicas. Las claves específicas para los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* se encuentran en la Figura 9 y Figura 10, respectivamente.

La descripción de las características macro y microscópicas de los hongos potencialmente toxigénicos se muestra en la Tabla 3 y las imágenes de sus características macroscópicas y microscópicas en las Figuras 5 y 6, respectivamente.

Tabla 3

Descripción de las características macro y microscópicas de los hongos potencialmente toxigénicos identificados

Código	Características macroscópicas y microscópicas
	<i>P. verrucosum</i>
PCA2	<p>Colonias en CYA de 27.58 mm de diámetro, aterciopeladas, muy sulcadas; micelio blanco; formación de conidios claro a moderado, verde grisáceo; produce exudado claro abundantemente; inverso amarillo. MEA de 21.58 mm de diámetro, densas y velutinosas, centralmente flocosas; micelio blanco a verde opaco; producción de conidios moderada; reverso marrón pálido opaco. Colonias en G25N de 19.77 mm de diámetro, sulcadas, velutinosas a algo flocosas; micelio blanco a verde grisáceo; reverso de pálido a amarillo.</p> <p>Conidióforos nacidos de hifas subsuperficiales o superficiales, estipes con paredes finas; penicilli biverticilado; rami 1–2 por estipe de 21.46 μm de largo; métulas de 9.85 μm de largo con paredes suaves; fialides ampuliforme de 7.32 μm de largo; conidios generalmente esféricos, de 2.36 μm de diámetro, con paredes lisas, sostenidos en cadenas desordenadas.</p>
	<i>A. westerdijkiae</i>
PCA19	<p>Colonias en CYA con 49.13 mm de diámetro, sulcadas, micelio blanco discreto a amarillo pálido tornándose anaranjado opaco; con esclerocios; inverso color amarillo mostaza con textura arrugada. Colonias en MEA con 53.23 mm de diámetro, con buena esporulación, aterciopelada, de color amarillo pálido, esclerocios escasamente formados, cubiertos por un estado conidial en tonos anaranjados; inverso con borde amarillo mostaza con textura espiral. Colonias en G25N de 38.99 mm de diámetro, sulcadas, velutinosas a algo flocosas; micelio blanco a tonos amarillo naranja; reverso de pálido a amarillo con textura arrugada.</p> <p>Las cabezas conidiales se irradian y se dividen en columnas; estipes con paredes ásperas, incoloras a pigmentadas de amarillo; vesículas de globosas a espatuladas de 27.84 μm de diámetro; métulas y fialides que cubren toda</p>

Código	Características macroscópicas y microscópicas
	la vesícula; conidios globosos, esféricos finamente rugosos de 2.85 μm de diámetro.

Figura 5

P. verrucosum (PCA2), *A. westerdijkiae* (PCA19) colonias en medios CYA y MEA después de 7 días de incubación a 25°C; anverso (a, c, e, g); reverso (b, d, f, h)

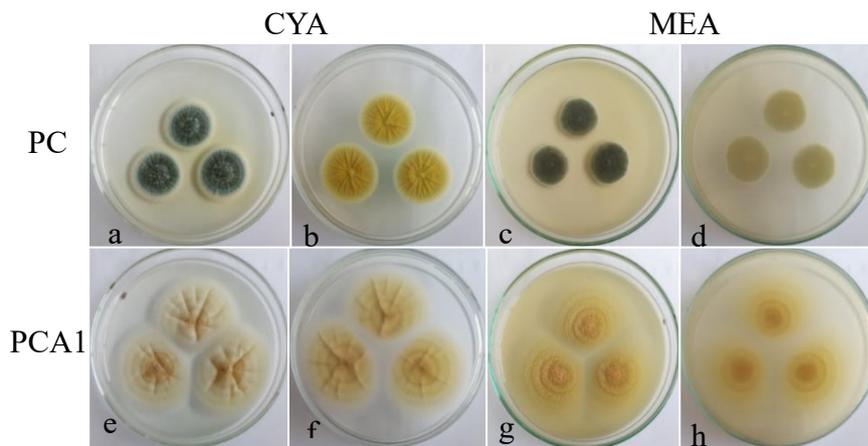


Figura 6

P. verrucosum (PCA2), *A. westerdijkiae* (PCA19) después de 7 días a 25 °C; penicilli (a) con barra de 20 μm y cabeza conidial (b) con barra de 30 μm ; conidios de *P. verrucosum* (c) y de *A. westerdijkiae* (d) con barras de 10 μm



Las características y descripciones macroscópicas y microscópicas de los demás aislados se encuentran en los Anexos.

Las fotos macroscópicas de aislados del género *Aspergillus* de muestras orgánicas y convencional obtenidos en la primera colecta están presentadas en la Figura 11 y sus estructuras microscópicas en la Figura 12. Las descripciones macro y microscópicas en la Tabla 4. Las fotos macroscópicas de los aislados del género *Penicillium* de ambas formas de cultivo están demostradas en las Figuras 13 y 14. Las fotos de sus estructuras microscópicas están en las Figuras 15 y 16 y, sus descripciones macro y microscópicas, en la Tabla 5.

Para la colecta 2, las fotos macroscópicas de los aislados del género *Aspergillus* de muestras orgánicas y convencionales son presentadas en la Figura 17. Fotos de sus estructuras microscópicas están en la Figura 18 y sus descripciones macro y microscópicas pueden ser observadas en la Tabla 6.

En la Figura 19 está una representación de las colonias de *Penicillium*, aisladas de la segunda colecta solamente de café orgánico, sembradas en medio diferenciador CREAD, en la cual se muestran colonias que producen grandes cantidades de ácido, poco ácido y las que no producen ácido. La producción de ácido puede ser verificada por el cambio de color del medio de cultivo, de morado a amarillo, por la conversión del azúcar del medio a ácido por el microorganismo, cambiando el pH del medio de cultivo a ácido. El cambio de color se da por la presencia de la púrpura de bromocresol, un indicador de pH. El medio con valores de pH próximos a 7 tiene color morado y cambios de pH del medio a valores menores que 6 hace con que el medio se vuelva amarillo (Velázquez-Gurrola & Ramos-Alegría, 2015). En la Figura 20 están las fotos macroscópicas de aislados del género *Penicillium* que producen ácido y sus estructuras microscópicas están en la Figura 21. Las imágenes macroscópicas de aislados del género *Penicillium* que producen poco ácido están en la Figura 22 y sus estructuras microscópicas en la Figura 23. La Figura 24 muestra las imágenes macroscópicas de aislados del género *Penicillium* que no producen ácido. Las fotos de sus estructuras microscópicas están en la Figura 25 y sus descripciones macro y microscópicas en la Tabla 7.

En las muestras de café orgánico se identificaron *Aspergillus* de la sección *Versicolor* especie *A. versicolor* y *Aspergillus* spp. *Penicillium* del subgénero *Penicillium* especies

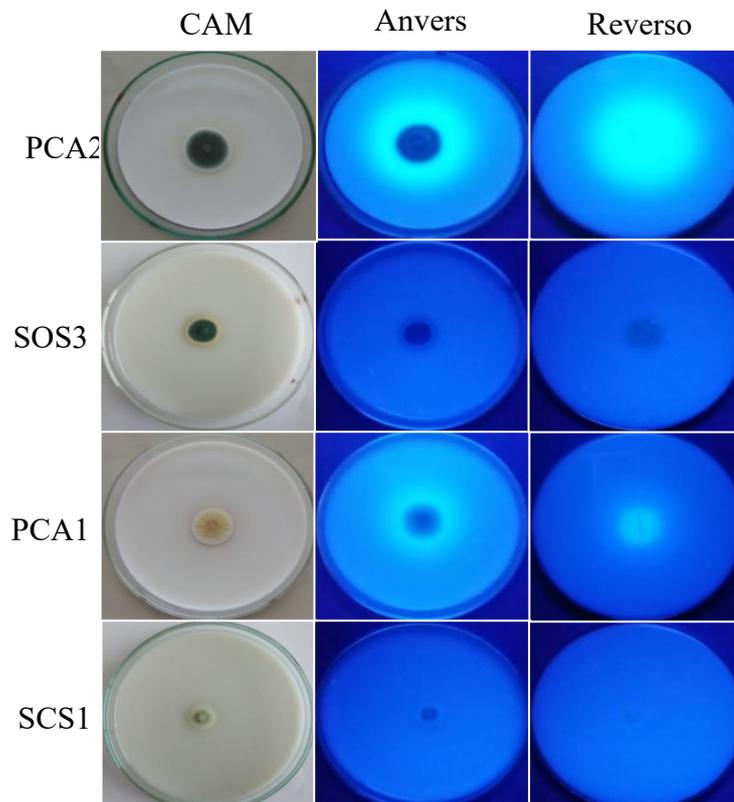
P. aurantiogriseum Dierckx, *P. brevicompactum* Dierckx, *P. viridicatum* Westling y *Penicillium* spp. Del mismo modo, en las muestras de café convencional se identificó *Aspergillus* de la sección *Circumdati* especie *A. westerdijkiae*, sección *Versicolor* especie *A. versicolor* y *Aspergillus* spp. y *Penicillium* del subgénero *Penicillium* especies *P. solitum* Westling y *P. verrucosum* Dierckx, *Penicillium* del subgénero *Furcatum* especies *P. fellutanum* Biourge y *Penicillium* spp. (Figura 9 y 10).

3.4. Detección de OTA en medio CAM

De todos los aislados evaluados en medio CAM se detectaron dos aislados posiblemente productoras de OTA. *P. verrucosum* y *A. westerdijkiae* debido a que presentó un halo de fluorescencia coronando las colonias; los aislados identificados como *P. pinophilum* y *A. versicolor* y los demás no identificados no presentaron fluorescencia (Figura 7).

Figura 7

Aislados que fluorescen (PCA2, PCA19) y que no fluorescen (SOS30, SCS12) en medio CAM examinado bajo luz ultravioleta de 366 nm. PCA2: *P. verrucosum*; SOS30: *P. pinophilum*; PCA19: *A. westerdijkiae*; CSC12: *A. versicolor*. Colonias evaluadas después de 5 días a 30 °C



IV. DISCUSIÓN

La humedad es un factor que contribuye a la contaminación por hongos en el café y las condiciones meteorológicas intervienen en el aumento de la humedad si es que no se controla bien los parámetros de secado y almacenamiento. El contenido de humedad después del secado debe ser menor al 11% para que los problemas de contaminación sean mínimos (Maman et al., 2021). Además, se sabe que los granos de café tienen una pulpa espesa y si el proceso de secado pudiera ser más rápido y efectivo, se podría prevenir la invasión de hongos, lo que resultaría en una menor contaminación por OTA (Noonim et al., 2008).

Magan & Lacey (1984) estudiaron la colonización de granos de café por *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium culmorum*, especies de *Aspergillus*, *Penicillium brevicompactum* y *P. roqueforti* y observaron que las dos primeras especies estaban presentes en el campo y las dos últimas especies eran colonizadoras de granos secos de café durante el almacenamiento. Los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Cladosporium* son conocidos como contaminantes naturales del café y están presentes desde el campo hasta el almacén (Nakajima et al., 1997; Pereira Galvão et al., 2005; Silva et al., 2000) datos que coinciden con el presente trabajo y explican los porcentajes de infección (incidencia) en las muestras de café orgánico y convencional por los géneros *Fusarium* (4 a 34%), *Penicillium* (2 a 19%), *Aspergillus* (2 a 7%) y otros géneros de hongos filamentosos no especificados en los resultados (*Cladosporium*, *Pestalotias*, *Rhizopus*, *Colletotrichum*, entre otros). Así mismo, Nega, (2014) aisló e identificó patógenos fúngicos asociados al tipo de almacenamiento en frío de semillas de café y de las especies encontradas *Aspergillus* spp. tuvo la mayor frecuencia de ocurrencia (49.375%), seguida por *Penicillium* spp. (11.875%), *Fusarium* spp. (5.625%) y especies no identificadas (0.626%).

Silva et al. (2008) investigaron la incidencia y distribución de hongos filamentosos durante la fermentación, secado y almacenamiento de granos de café y reportaron microorganismos del género *Pestalotias* (4), *Cladosporium* (26), *Fusarium* (34), *Penicillium* (81) y *Aspergillus* (112). Couto et al. (2014) y Rezende et al. (2013) compararon los sistemas de cultivo de café orgánico y convencional y encontraron que los géneros más identificados fueron *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, además de esos géneros, también encontraron *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Trichoderma*,

Colletotrichum y *Alternaria*; de los cuales, el género *Aspergillus* sección *Circumdati* representó el 49.35%, seguido por la sección *Nigri* (47.26%) y sección *Flavio* (3.37%). Por su parte, Iamanaka et al. (2014) y Vilela et al. (2010) estudiaron la microbiota en los granos de café y encontraron incidencia de hongos siendo que las principales especies aisladas fueron *A. tubingensis*, *A. versicolor*, *Aspergillus* sección *Nigri*, *A. westerdijkiae*, *Aspergillus* sp. *P. decumbens*, *P. brevicompactum*, *Penicillium* sp. nov. (*P. crustosum*), *Cladosporium cladosporioides* y *Fusarium latericio*.

Estos hechos fueron confirmados en el presente estudio ya que en las muestras de café orgánico se identificaron *Aspergillus* de la sección *Versicolor* especie *A. versicolor* (1), *Aspergillus* spp. (7), *Penicillium* del subgénero *Penicillium* especies *P. aurantiogriseum* Dierckx (1) y *P. brevicompactum* Dierckx (6), *P. viridicatum* Westling (2) y *Penicillium* spp. (3). En las muestras de café convencional se encontró *Aspergillus* de la sección *Circumdati* especie *A. westerdijkiae* (1), sección *Versicolor* especie *A. versicolor* (1) y *Aspergillus* spp. (2), *Penicillium* del subgénero *Penicillium* especies *P. solitum* Westling (1) y *P. verrucosum* Dierckx (1), *Penicillium* subgénero *Furcatum* especies *P. fellutanum* Biourge (1) y *Penicillium* spp. (2). Existiendo diferencia cuantitativa, mas no diferencia cualitativa en los géneros identificados en los dos sistemas de cultivo del café.

La ocratoxina A (OTA; CAS303-47-9) es un sólido cristalino blanco con intensa fluorescencia ultravioleta (UV), verde en ácido y azul en condiciones alcalinas, debido a un anillo de lactona cerrado o abierto, respectivamente (Pitt, 2014). La ocratoxina A produce enfermedades nefrotóxicas crónicas que afecta la función renal en todas las especies animales analizadas y también tiene efectos inmunosupresores, teratogénicos y genotóxicos en animales y posiblemente en humanos (Pitt & Hocking, 2009).

En este trabajo se encontró dos aislados productores de OTA, identificados por los métodos biológicos como *P. verrucosum* y *A. westerdijkiae*. Noonim et al. (2008) reportaron que los hongos productores de OTA aislados del café arábica de Chiang Mai, Tailandia, pertenecían a la sección *Circumdati* de la especie *A. westerdijkiae*, *A. melleus*, y *A. steynii*. Vesonder et al. (1973) identificaron *P. verrucosum* (en ese tiempo conocido como *P. viridicatum II*) como único productor de OTA en cereales de Canadá y USA. También Lund & Frisvad (2003) encontraron *P. verrucosum* como fuente de producción de OTA en trigo y cebada de Europa. Estas informaciones apoyan al resultado de la fluorescencia en el agar coco encontrado en la presente investigación.

A pesar de que en la presente investigación se ha enfocado en las toxinas AFLA y OTA, porque son de importancia prioritaria, una cuestión pendiente es la identificación más detallada de los aislados utilizando abordajes adicionales como los análisis filogenéticos basados en secuenciaciones de más de un gen y el uso de más medios selectivos y diferenciales. Eso sería relevante porque permitiría inferir el riesgo de contaminación del café con otras toxinas como la esterigmatocistina que es producida por *Aspergillus versicolor* (Bennett & Klich, 2003) y que no es posible identificar con el método de fluorescencia en el medio CAM. Una segunda cuestión que podría ser explorada en trabajos futuros es la identificación más precisa de las toxinas producidas por los aislados toxigénicos. Por ejemplo, la técnica del agar plug por la cromatografía en capa delgada (TLC) que permite identificar si la toxina producida es AFLA u OTA. Estos son solo algunos caminos posibles en la investigación de toxicología fúngica que podrían ser seguidos y que permitirían llenar el gran vacío de conocimientos de esta área.

V. CONCLUSIONES

En la investigación se encontró baja incidencia (hasta 7, 19, 34% de infección) en las muestras de café orgánico y convencional por los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y alta incidencia (83, 90, 100 % de infección) por otros géneros de hongos filamentosos (*Cladosporium*, *Pestalotias*, *Rhizopus*, *Colletotrichum*, entre otros) que fueron identificados por sus características biológicas.

Por sus características biológicas las principales especies identificadas fueron *A. versicolor*, *P. brevicompactum* Dierckx, *P. aurantiogriseum* Dierckx, *P. fellutanum* Biourge, *P. viridicatum* Westling y *P. solitum* Westling.

Se logró identificar dos aislados toxigénicos en granos almacenados de café convencional, *P. verrucosum* y *A. westerdijkiae*, que mostraron fluorescencia en medio agar coco (CAM) bajo luz ultravioleta siendo considerados posibles productores de OTA. En este sentido, la presencia de estos microorganismos ofrece un riesgo de contaminación por OTA en el café evaluado.

VI. RECOMENDACIONES

Para prevenir la invasión por hongos en el proceso del café y disminuir la producción de micotoxinas se debe realizar las buenas prácticas agrícolas, buenas prácticas de manipulación, los pozos de fermentación deben ser cuidados para no ser fuente de inóculo, el tiempo y la superficie del local de secado, la humedad y la temperatura de almacenamiento y transporte.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Alvarez, M. E., Saucedo-Castañeda, G., Durand, N., Perraud-Gaime, I., González-Robles, R. O., & Rodríguez-Serrano, G. M. (2021). The variety, roasting, processing, and type of cultivation determine the low OTA levels of commercialized coffee in Chiapas State, Mexico. *Food Control*, *126*(December 2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108088>
- Alfenas, A. C., & Mafia, R. G. (2007). *Métodos em fitopatologia* (UFV (ed.)).
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). *Mycotoxins*. *16*(3), 497–516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497>
- Bessaire, T., Perrin, I., Tarres, A., Bebius, A., Reding, F., & Theurillat, V. (2019). Mycotoxins in green coffee: Occurrence and risk assessment. *Food Control*, *96*(June 2018), 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.08.033>
- Boudra, H., Le Bars, P., & Le Bars, J. (1995). Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(3), 1156–1158. <https://doi.org/10.1128/aem.61.3.1156-1158.1995>
- Castellanos-Onorio, O., Gonzalez-Rios, O., Guyot, B., Fontana, T. A., Guiraud, J. P., Schorr-Galindo, S., Durand, N., & Suárez-Quiroz, M. (2011). Effect of two different roasting techniques on the Ochratoxin A (OTA) reduction in coffee beans (*Coffea arabica*). *Food Control*, *22*(8), 1184–1188. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.014>
- Comisión Europea. (2006). *Reglamento (CE) 401/2006 de la Comisión de 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para control oficial del contenido de micotoxinas en productos alimenticios* (Vol. 70, pp. 12–34).
- Couto, F. A., Souza, S. C. de, Monteiro, M. C. P., Silva, D. M. da, Cirillo, M. Â., & Batista, L. R. (2014). Diversity and association of filamentous fungi in coffee beans under organic and conventional cultivation. *African Journal of Microbiology Research*, *8*(26), 2505–2512. <https://doi.org/10.5897/ajmr2013.6571>
- Iamanaka, B. T., Teixeira, A. A., Teixeira, A. R. R., Copetti, M. V., Bragagnolo, N., & Taniwaki, M. H. (2014). The mycobiota of coffee beans and its influence on the coffee beverage. *Food Research International*, *62*, 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.033>

- Joosten, H. M. L. J., Goetz, J., Pittet, A., Schellenberg, M., & Bucheli, P. (2001). Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. *International Journal of Food Microbiology*, 65(1–2), 39–44. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00506-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00506-7)
- 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).
- 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>
- Lund, F., & Frisvad, J. C. (2003). *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 1117–1123. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02076.x>
- Magan, N., & Lacey, J. (1984). Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Transactions - British Mycological Society*, 82(1). [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(84\)80214-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(84)80214-4)
- Maman, M., Sangchote, S., Piasai, O., Leesutthiphonchai, W., Sukorini, H., & Khewkhom, N. (2021). Storage fungi and ochratoxin A associated with arabica coffee bean in postharvest processes in Northern Thailand. *Food Control*, 130(May), 108351. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108351>
- 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(2), 77–83. <https://doi.org/10.1080/09540109709354938>
- Nega, A. (2014). Isolation and Identification of Fungal Pathogens Associated with Cold Storage Type of (*Coffea Arabica*) Seed , at Jimma Agricultural Research Center , Western Ethiopia. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 4(25), 20–27.
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2008). Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 197–202.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.005>

- Paterson, R. R. M., Lima, N., & Taniwaki, M. H. (2014). Coffee, mycotoxins and climate change. *Food Research International*, *61*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.037>
- Pereira Galvão, R., Pfenning, L. H., & Antônio De Castro, H. (2005). *Characterization and dynamic of colonization of Cladosporium cladosporioides (Fresen.) de Vries in coffee fruits (Coffea arabica L.)*. *29*(6), 1112–1116.
- Pitt, J. I. (2014). Mycotoxins: Ochratoxin A. In *Encyclopedia of Food Safety* (Vol. 2, pp. 304–309). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00191-8>
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). Fungi and food spoilage. In *Fungi and Food Spoilage*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Rezende, E. de F., Borges, J. G., Cirillo, M. Â., Prado, G., Paiva, L. C., & Batista, L. R. (2013). Ochratoxigenic fungi associated with green coffee beans (*Coffea arabica* L.) in conventional and organic cultivation in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*(2), 377–384. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200006>
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., & Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, *78*(1), 141–173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Silva, C. F., Batista, L. R., & Schwan, R. F. (2008). Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans. *Brazilian Journal of Microbiology*, *39*(3), 521–526. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000300022>
- Silva, C. F., Schwan, R. F., Sousa Dias, E., & Wheals, A. E. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, *60*(2–3). [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00315-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00315-9)
- Suárez-Quiroz, M., González-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., & Guiraud, J. P. (2004). Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. *International Journal of Food Science and Technology*, *39*(5), 501–507.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00810.x>

- Taniwaki, M. H. (2005). An update on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in coffee. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 571, 189–202. https://doi.org/10.1007/0-387-28391-9_12
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., & Magan, N. (2018). *Aspergillus* species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. *Current Opinion in Food Science*, 23, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.008>
- Velázquez-Gurrola A, & Ramos-Alegría, M. (2015). *Beneficios de microorganismos solubilizadores de P y K en la recuperación y mantenimiento de suelos agrícolas. 1983*, 495–500.
- Vesonder, R. F., Ciegler, A., & Jensen, A. H. (1973). Isolation of the Emetic Principle from *Fusarium*-Infected Corn. *Applied Microbiology*, 26(6), 1008–1010. <https://doi.org/10.1128/am.26.6.1008-1010.1973>
- Vilela, D. M., Pereira, G. V. de M., Silva, C. F., Batista, L. R., & Schwan, R. F. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology*, 27(8), 1128–1135. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.024>
- Winston, E., Laak, J. Op De, Marsh, T., Lempke, H., Chapman, K., Winston, L. E., Laak, J. Op De, Marsh, T., Lempke, H., & Chapman, K. (2005). *A rabica coffee manual for Lao-PDR*.
- Yao, Y., Xiao, X., Ge, L., & Sun, C. P. (2015). Quantum coherence in multipartite systems. *Physical Review A - Atomic, Molecular, and Optical Physics*, 92(2), 1–8. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.92.022112>

ANEXOS

Figura 8

Clave dicotómica general adaptado de Pitt & Hocking, (2009) pág. 55

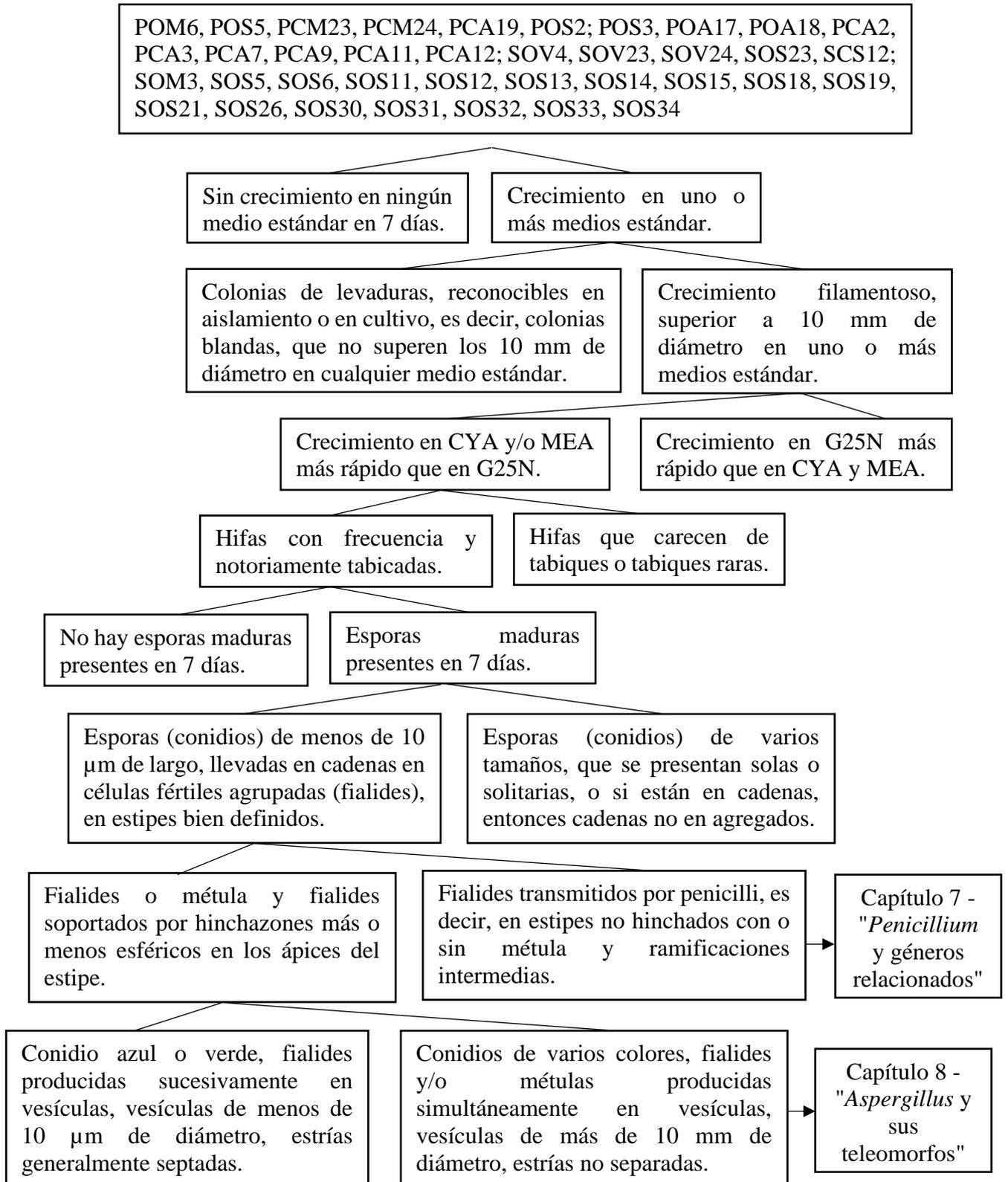


Figura 9

Clave general del género *Aspergillus* adaptado de Pitt & Hocking, (2009) pág. 277

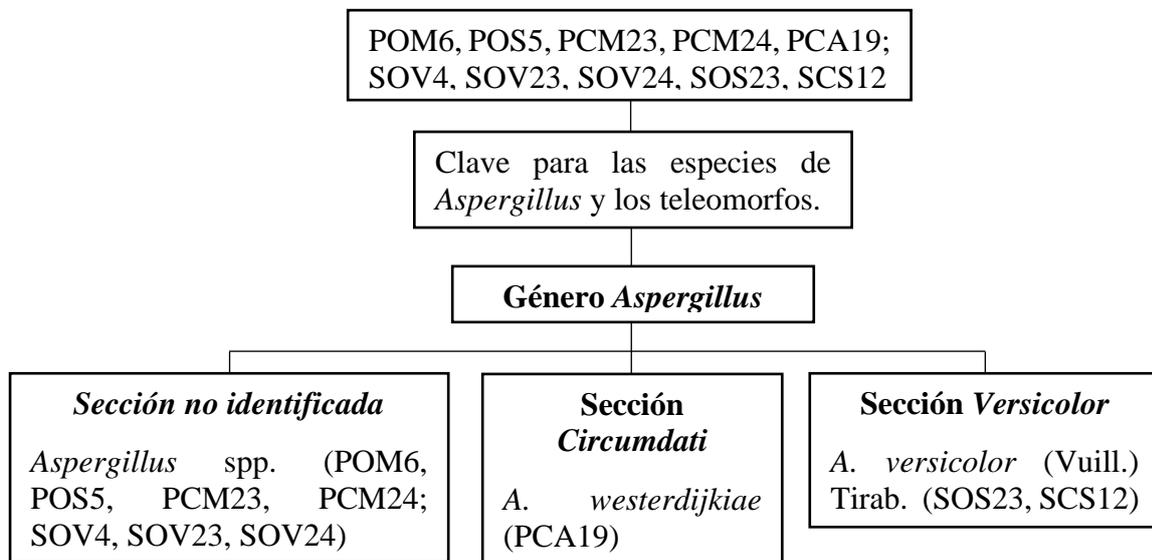
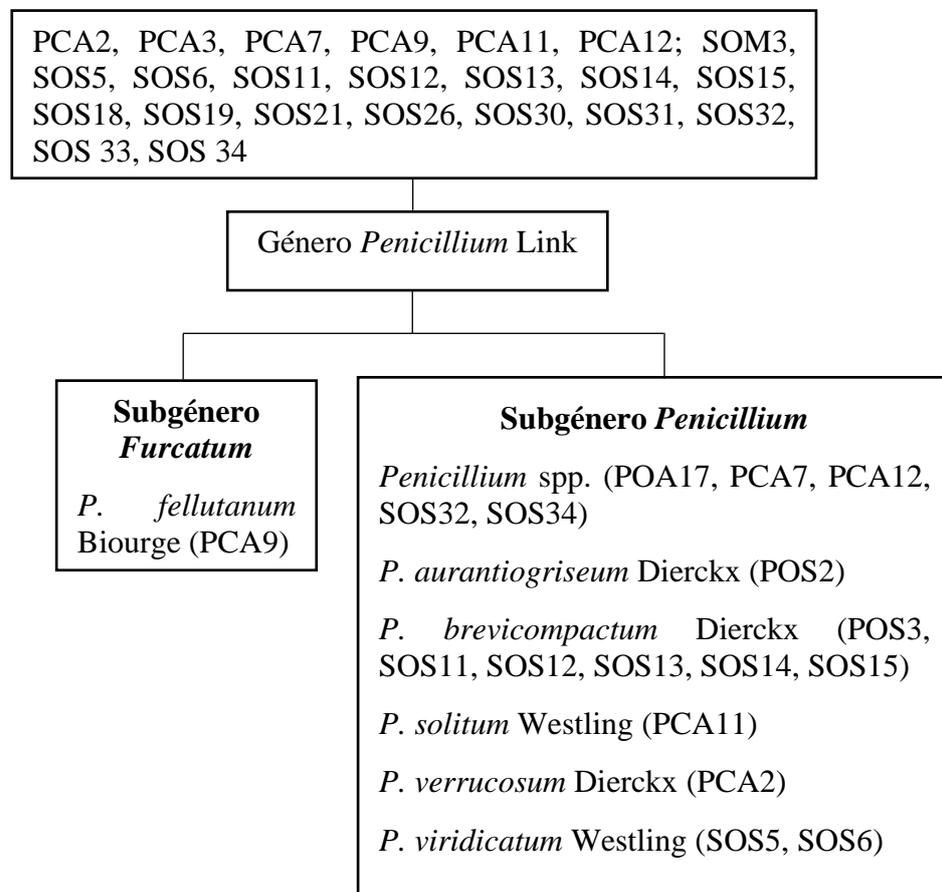


Figura 10

Clave general del género *Penicillium* adaptado de Pitt & Hocking, (2009) pág. 194



Colecta 1

Figura 11

Aspergillus spp. (POM6, POS5, PCM23, PCM24) después de 7 días de incubación a 25°C; anverso (a, c, e, g, i, k, m, o); reverso (b, d, f, h, j, l, n, p)

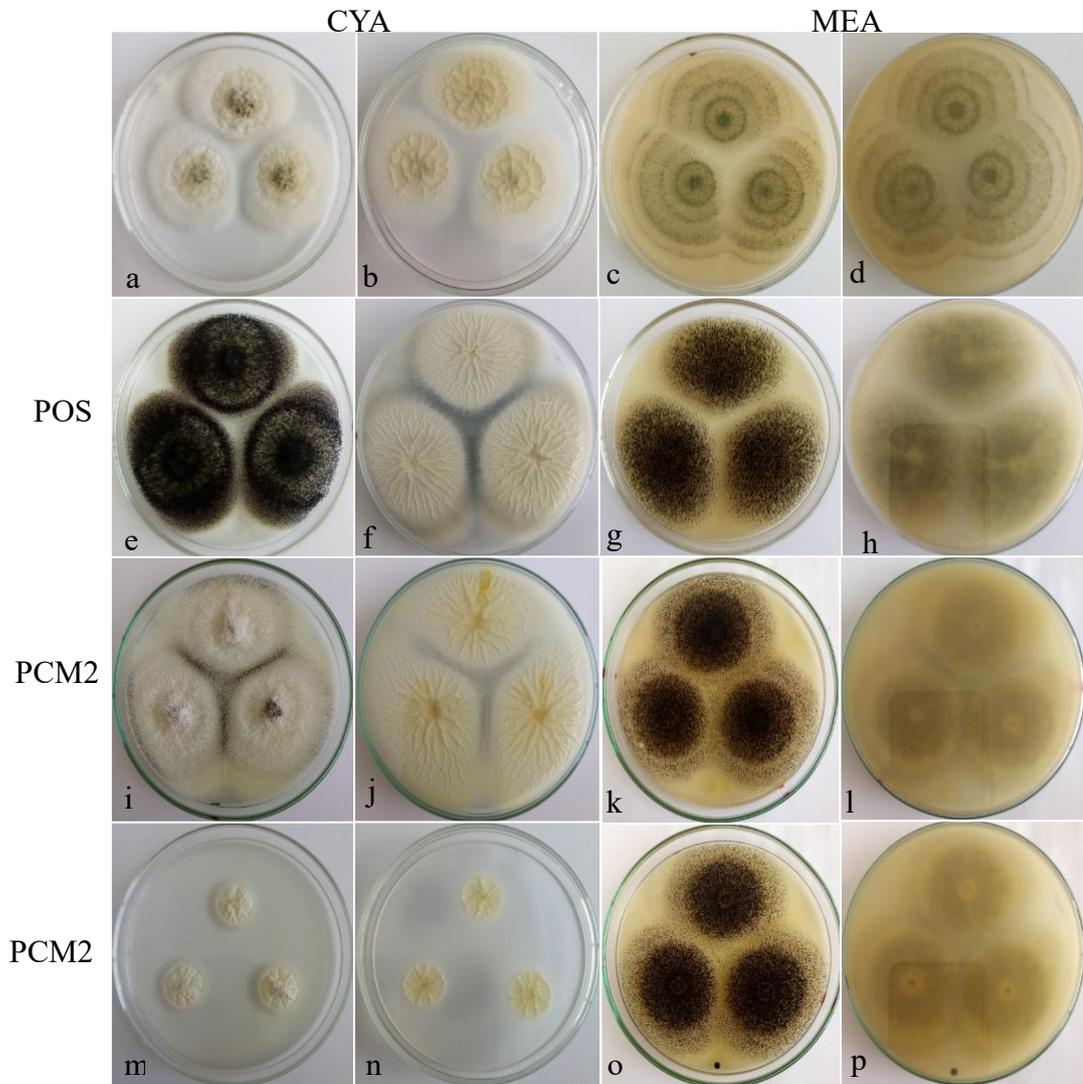


Figura 12

Género Aspergillus (POM6, PCM23, POS5, PCM24) después de 7 días a 25°C; cabeza conidial (a; b, e; c; d) con barras de 30 µm; conidios de PCM23 (e) y PCM24 coloreada con fucsina ácida (f) con barras de 10 µm

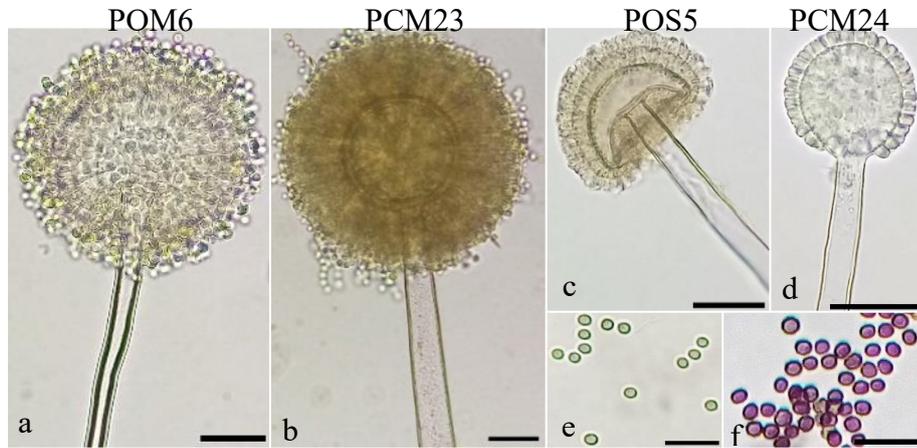


Tabla 4

Descripción macroscópica y microscópica de colonias del género Aspergillus aisladas de la colecta 1

Código	Características macroscópicas y microscópicas
	<i>Aspergillus sp.</i>
	Colonias en CYA de 43.66 mm de diámetro, flocosas, micelio blanco a amarillo pálido; reverso amarillo pálido rugosa. Colonias en MEA de 76.45 mm de diámetro, bajas, producción de conidios esparcidos radialmente verde oliva opaco; reverso mismas características, pero coloración más tenue. Colonias en G25N de 35.28 mm de diámetro, densas, flocosas, producción de conidios abundantes, color amarillo verdoso; reverso pálido.
POM6	Conidióforos nacidos del micelio aéreo, estipes con paredes delgadas, incoloras y lisas, que se agrandan terminalmente hasta convertirse en vesículas piriformes; vesículas de 37.81 µm de diámetro, fértiles en toda la cabeza conidial; conidios subesferoidales a elipsoidales, de 4.38 µm de largo, de paredes lisas, que nacen radiados a la cabeza conidial.
POS5	<i>Aspergillus sp.</i>

Código	Características macroscópicas y microscópicas
	<p>Colonias en CYA de 66.44 mm de diámetro, con micelio blanco subsuperficial, coronado por una capa de conidióforos cerca de los bordes, cabezas conidiales individuales visibles a simple vista, que cubren las áreas centrales de color negro azabache; reverso incoloro. Colonias en MEA de 66.00 mm de diámetro, similares a las de CYA, pero menos densas; micelio subsuperficial discreto; cabezas conidiales visibles sobre toda la colonia, negro azabache; reverso sin color. Colonias en G25N de 26.39 mm de diámetro, de superficie blanca con micelio subsuperficial coronado por cabezas conidiales negras escasas; reverso sin color.</p> <p>Conidióforos nacidos de hifas superficiales o subterráneas, con paredes gruesas y lisas, incoloras de 12.59 μm de ancho; vesículas esféricas u achatadas de 45.74 μm de diámetro; fialides muy juntas; conidios esféricos.</p>
PCM23	<p><i>Aspergillus sp.</i></p> <p>Colonias en CYA de 73.50 mm de diámetro, flocosas, producción de micelio blanco superficial con conidióforos y cabezas conidiales negras en la parte central y en los bordes; reverso amarillo pálido. Colonias en MEA de 59.06 mm de diámetro, densas; micelio subsuperficial discreto; cabezas conidiales visibles sobre toda la colonia, negro; reverso sin color. Colonias en G25N de 29.28 mm de diámetro, de superficie blanca con micelio con cabezas conidiales negras escasas; reverso sin color.</p> <p>Conidióforos nacidos de hifas superficiales, con paredes gruesas y lisas, incoloras; vesículas esféricas u achatadas de 44.66 μm de diámetro; fialides muy juntas; conidios esféricos de 3.88 μm de largo.</p>
PCM24	<p><i>Aspergillus sp.</i></p> <p>Colonias en CYA de 24.05 mm de diámetro, flocosas, sulcadas, producción de micelio superficial pálido; reverso amarillo pálido. Colonias en MEA de 67.54 mm de diámetro, flocosas; micelio blanco tornándose a amarillo superficial discreto; cabezas conidiales escasas; reverso sin color. Colonias</p>

Código	Características macroscópicas y microscópicas
	en G25N de 27.77 mm de diámetro, de superficie blanca con micelio con cabezas conidiales negras escasas; reverso sin color.
	Conidióforos nacidos de hifas superficiales, con paredes gruesas y lisas, incoloras; vesículas esféricas u achatadas de 34.10 μm de diámetro; fialides juntas, lisas y pequeñas; conidios esféricos a esferoidales de 4.05 μm de largo.

Figura 13

P. aurantiogriseum (POS2), *P. brevicompactum* (POS3), subgénero *Penicillium* (POA17) después de 7 días de incubación a 25°C; anverso (a, c, e, g, i, k); reverso (b, d, f, h, j, l)

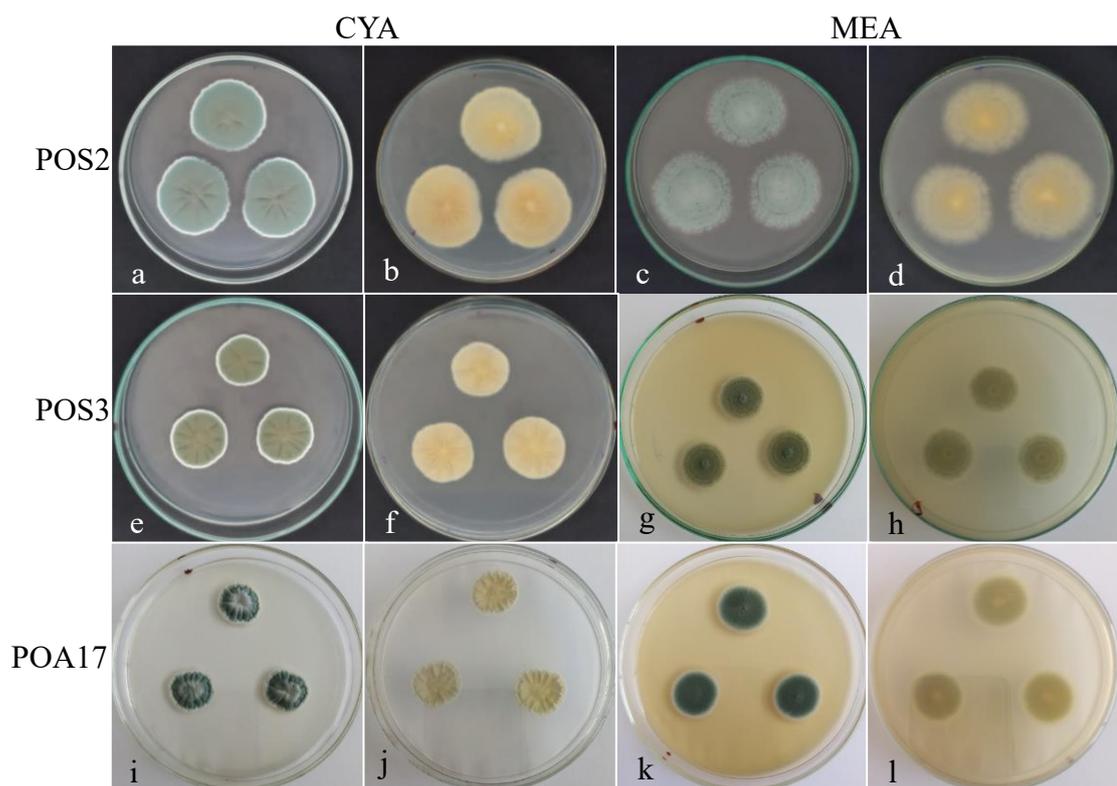


Figura 14

Subgénero Penicillium (PCA7, PCA12), *P. fellutanum* (PCA9), *P. solitum* (PCA11) después de 7 días de incubación a 25°C; anverso (a, c, e, g, i, k, m, o); reverso (b, d, f, h, j, l, n, p)

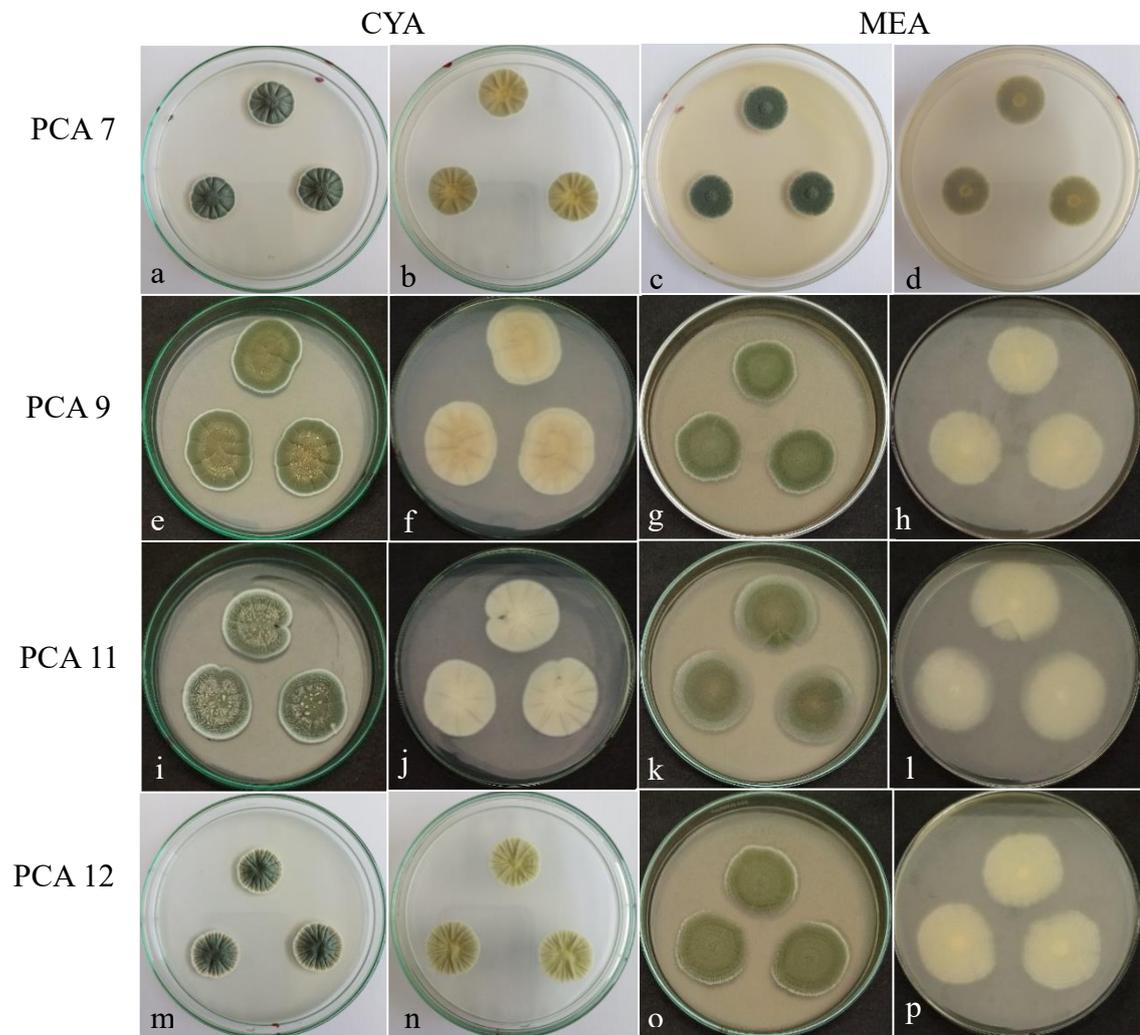


Figura 15

P. aurantiigriseum (a, b), *P. brevicompactum* (c, d) subgénero *Penicillium* (e, f), subgénero *biverticillium* (g, h) después de 7 días a 25°C; penicilos sin colorante (a, b, c, d) penicilos con colorante fucsina ácida (e, f, g, h) con barras de 20 µm

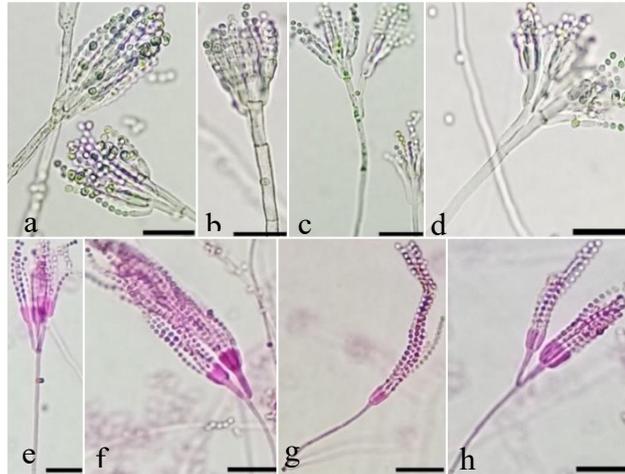


Figura 16

Subgénero *Penicillium* PCA7 (a, b, c, d, e) y PCA12 (j), *P. fellutanum* (f, g, h), *P. solitum* (i) después de 7 días a 25°C; penicilos sin colorante (a, b, c, d, e, h, i, j) penicilos con fucsina ácida (f, g) con barras de 20 µm, conidios de subgénero *Penicillium* PCA7 (l) y PCA12 (k), *P. fellutanum* (m) con barras de 10 µm

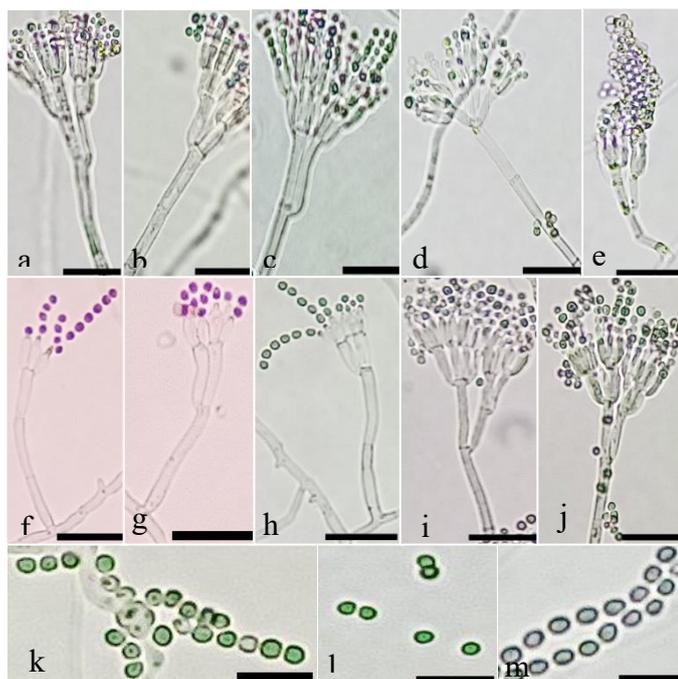


Tabla 5

Descripción macroscópica y microscópica de colonias del género Penicillium aisladas de la colecta 1

Código	Características macroscópicas y microscópicas
POS2	<p><i>P. aurantiogriseum</i> Dierckx</p> <p>Colonias en CYA de 32.91 mm de diámetro, moderadamente profundas, de textura suave micelio blanco en los bordes, generalmente discreto; producción de conidios de moderada a abundante, de color turquesa grisáceo a verde opaco; reverso naranja claro. Colonias en MEA de 35.12 mm de diámetro, planas; micelio subsuperficial; producción de conidios generalmente de moderada a intensa, de color turquesa grisáceo a verde opaco; reverso pálido. Colonias en G25N de 24.19 mm de diámetro, densas de textura granular; reverso pálido.</p>
	<p>Conidióforos nacidos solos o en fascículos, principalmente de hifas subsuperficiales, estipes de 37.96 μm de largo, con paredes lisas a finamente rugosas, con penicilos terminales biverticilados; fialides ampuliformes de 8.11 μm de largo; conidios esféricos a subesferoidales de 2.71 μm de largo, con paredes lisas, sostenidos en columnas largas y bien definidas.</p>
POS3	<p><i>P. brevicompactum</i> Dierckx</p> <p>Colonias en CYA de 22.59 mm de diámetro, radialmente sulcadas, moderadamente profundas, densas; micelio blanco en los bordes; formación de conidios de color verde claro a moderado; el reverso es de color amarillento. Colonias en MEA de 22.67 mm de diámetro, planas, sulcadas radialmente, velutinosas; micelio blanco; producción de conidios moderada de color verde opaco a verde oscuro; reverso pálido. Colonias en G25N de 13.27 mm de diámetro, planas con textura granula; reverso pálido.</p> <p>Conidióforos nacidos del micelio de la superficie, estipes generalmente de paredes lisas de 25.41 μm de longitud, con penicilos terverticilados; ramas cortas y anchas; métulas en grupos divergentes, cortas y anchas, de</p>

12.54 μm de largo; fialides en verticilos divergentes, ampuliformes, de 8.22 μm de largo; conidios elipsoidales, de 2.24 μm de largo, con paredes lisas, sostenidos en cadenas divergentes y desordenadas.

Penicillium sp.

POA17

Colonias en CYA de 19.50 mm de diámetro, radialmente sulcadas, moderadamente profundas, densas, textura velutinosa; micelio blanco; formación de conidios de color verde grisáceo; reverso pálido. Colonias en MEA de 23.80 mm de diámetro, planas, velutinosas; micelio blanco; conidios abundantes de color verde oscuro; reverso pálido. Colonias en G25N de 7.34 mm de diámetro, profundas, conidios de color verde claro; reverso pálido.

Conidióforos nacidos del micelio de la superficie, estipes delgados y lisos, de 47.09 μm de largo, con penicilos monoverticilados e biverticilados angostos y compactos; métulas cortas y divergentes de 13.00 μm de largo; fialides en verticilos juntos y ampuliformes, de 8.40 μm de largo; conidios elipsoidales, de 2.62 μm de largo, sostenidos en cadenas divergentes y desordenadas.

Penicillium sp.

PCA7

Colonias en CYA de 19.84 mm de diámetro, radialmente sulcadas, moderadamente profundas, densas, textura velutinosa; micelio blanco; formación de conidios azul verdoso; reverso pálido. Colonias en MEA de 22.20 mm de diámetro, planas, velutinosas; micelio blanco; conidios abundantes de color verde opaco a verde oscuro; reverso pálido. Colonias en G25N de 16.48 mm de diámetro, planas, textura granular, conidios de color verde claro a moderado; reverso pálido.

Conidióforos nacidos del micelio de la superficie, estipes delgados con paredes lisas de 31.62 μm de largo, con penicilos biverticilados; métulas en grupos divergentes de 12.66 μm de largo; fialides en verticilos ampuliformes de 9.08 μm de largo; conidios elipsoidales, de 2.57 μm de largo, sostenidos en cadenas divergentes y desordenadas.

***P. fellutanum* Biourge**

Colonias en CYA de 19.54 mm de diámetro, muy densas, radialmente sulcadas, velutinosas; micelio blanco visible solo en los márgenes; formación de conidios claros a pesados, de color gris pálido a verde oscuro; presenta exudado incoloro; reverso pálido. Colonias en MEA de 18.72 mm de diámetro, bajas y densas, velutinosas con un área central flocosa; conidios moderadamente abundantes; colores similares a las colonias en CYA. Colonias en G25N de 17.02 mm de diámetro, crecimiento bajo y denso; reverso amarillo pálido.

PCA9

Conidióforos nacidos de hifas aéreas, con penicilli definidos con 2 métulas de 11.81 μm de longitud, a veces teniendo métulas de manera aleatoria, con o sin fialides solitarias, dando la impresión de un penicilli mono y biverticilado nacidos perpendicularmente a las hifas fértiles, pero siempre con al menos dos métulas terminales; estipes de paredes lisas de 17.60 μm de longitud, irregulares y a menudo indeterminada; fialides ampuliformes, de 8.34 μm de largo; conidios elipsoidales, de 3.11 μm de largo, con superficies finamente a claramente rugosas, sostenidos en largas columnas irregulares.

***P. solitum* Westling**

Colonias en CYA de 21.26 mm de diámetro, levemente sulcadas, densa, con textura superficial velutinosa; micelio blanco visible solo en los márgenes; conidios generalmente producidas en abundancia, de color verde azulado oscuro; exudado abundante y claro; reverso generalmente pálido. Colonias en MEA de 23 mm de diámetro, planas, bajas con textura velutinosa; micelio grisáceo en los bordes; conidios abundantes, coloreados como en CYA; reverso pálido. Colonias en G25N de 18.14 mm de diámetro, muy parecidas a las colonias en CYA; conidios verdes oscuro; reverso incoloro.

PCA11

Los conidióforos nacen de hifas subsuperficiales, estipes comúnmente de 20.19 μm de largo, pero de longitud indeterminada cuando están en fascículos, con paredes lisas; penicilos terverticilados; fialides

ampuliforme a cilindroidal de 9.49 μm de largo; conidios esféricos a subesferoidales de 3.09 μm de diámetro, con paredes lisas a muy finamente rugosas, sostenidos en cadenas desordenadas.

Penicillium sp.

PCA12 Colonias de 20.79 mm de diámetro, sulcadas, micelio blanco en los márgenes; conidios moderados de color verde grisáceo; reverso amarillo pálido. Colonias en MEA de 22.72 mm de diámetro, planas, flocosas y granulosas; inverso pálido. Colonias en G25N 18.14 mm de diámetro, micelio blanco en los bordes, conidios moderados de color verde oscuro a amarillo en el centro; reverso pálido.

Conidióforos nacidos de hifas aéreas, estipes de 17.19 μm de largo, paredes rugosas, con penicilos terverticilados; métulas en verticilos de 10.33 μm de largo; fialides de 6.77 μm de largo; conidios subesferoidales de 2.83 μm , que se desarrollan en cadenas cortas desordenadas.

Colecta 2

Figura 17

Género *Aspergillus* (SOV4, SOS23, SOS24), *A. versicolor* (Vuill.) Tirab. (SOS23, SCS12) después de 7 días de incubación a 25°C; anverso (a, c, e, g, i, k, m, o, q, s); reverso (b, d, f, h, j, l, n, p, r, t)

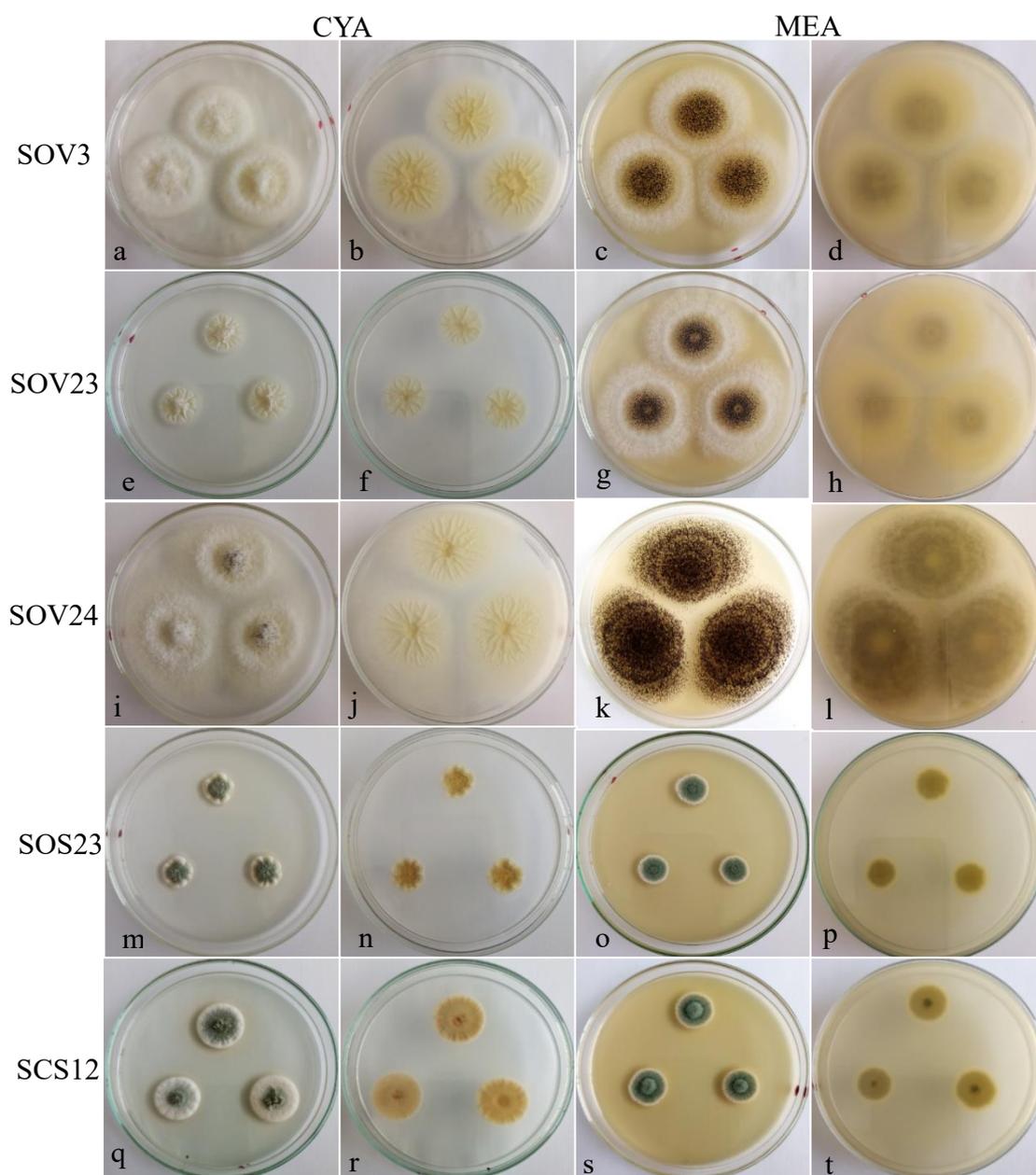


Figura 18

Género *Aspergillus* SOV4 (a), SOV23 (b) y SOV24 (d), *A. versicolor* (Vuill.) Tirab. (c; e, f) después de 7 días a 25°C; cabezas conidiales (a, b, c, d, e, e, f) con barras de 30 µm; conidios de SOV4 (g) con barras de 10 µm

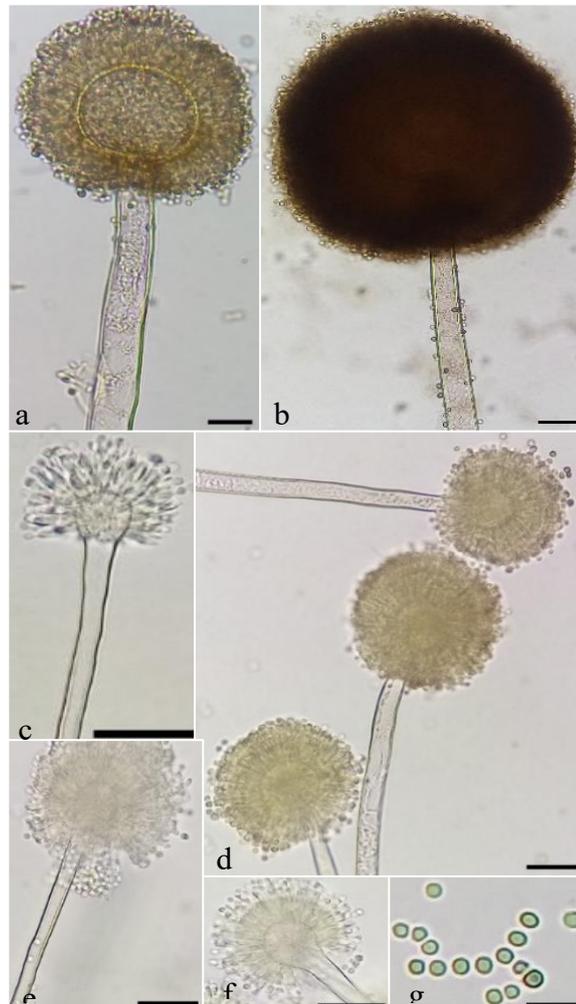


Tabla 6

Descripción macroscópica y microscópica de colonias del género *Aspergillus* aisladas de la colecta 2

Código	Características macroscópicas y microscópicas
<i>Aspergillus</i> sp.	
SOV4	Colonias en CYA de 42.22 mm de diámetro, flocosas, producción de micelio superficial pálido; reverso amarillo pálido. Colonias en MEA de 49.88 mm de diámetro, flocosas; micelio blanco superficial a subsuperficial; cabezas

conidiales marrones visibles en la parte central de las colonias; reverso sin color. Colonias en G25N de 33.47 mm de diámetro, de superficie blanca con micelio con cabezas conidiales negras escasas; reverso sin color.

Conidióforos nacidos de hifas superficiales, con paredes gruesas y paredes levemente rugosas, incoloras; vesículas esféricas u achatadas de 63.06 μm de diámetro; fialides juntas de paredes rugosas; conidios esféricos a esferoidales de 4.14 μm de largo.

Aspergillus sp.

Colonias en CYA de 24.78 mm de diámetro, flocosas, producción de micelio blanco superficial con cabezas conidiales escasas; reverso amarillo pálido. Colonias en MEA de 54.26 mm de diámetro, flocosas; micelio blanco superficial a subsuperficial; cabezas conidiales marrones visibles en la parte central de las colonias; reverso sin color. Colonias en G25N de 24.87 mm de diámetro, de superficie blanca con micelio con cabezas conidiales negras escasas; reverso sin color.

Conidióforos nacidos de hifas superficiales, con paredes gruesas y rugosas, incoloras; vesículas esféricas de 63.06 μm de diámetro; fialides muy juntas; conidios esféricos de 4.14 μm de diámetro.

Aspergillus sp.

Colonias en CYA de 64.46 mm de diámetro, flocosas, producción de micelio blanco superficial con conidióforos y cabezas conidiales negras discretas en la parte central; reverso amarillo pálido. Colonias en MEA de 64.62 mm de diámetro, densas; micelio subsuperficial escasas; cabezas conidiales marrones visibles sobre toda la colonia; reverso sin color. Colonias en G25N de 29.28 mm de diámetro, de superficie blanca con micelio con cabezas conidiales negras escasas; reverso sin color.

Conidióforos nacidos de hifas superficiales, con paredes gruesas y rugosas, incoloras; vesículas esféricas de 31.57 μm de diámetro; fialides muy juntas; conidios esféricos de 4.03 μm de diámetro.

***A. versicolor* (Vuill.) Tirab.**

SOS23

Colonias en CYA de 15.94 mm de diámetro, ligeramente sulcadas, densas; micelio de blanco a beige; cabezas conidiales escasas, color verde grisáceo; inversa mostaza fuerte. Colonias en MEA de 16.84 mm de diámetro, bajas, planas y densas; micelio de blanco a beige; cabezas conidiales color verde opaco; inverso amarillo verdoso. Colonias en G25N de 20.41 mm de diámetro, umbonadas, densas, de micelio blanco a amarillo claro; reverso amarillo pálido.

Conidióforos nacidos de hifas superficiales o aéreas, estipes con paredes gruesas; vesículas variables, las más grandes casi esférica, de 17.68 μm de diámetro, con métulas y fialides muy juntas; conidios esféricos, muy pequeñas, de 3.23 μm de diámetro, nacidas en cabezas radiadas.

***A. versicolor* (Vuill.) Tirab.**

SCS12

Colonias en CYA de 22.79 mm de diámetro, planas, densas; micelio de blanco a verde grisáceo; cabezas conidiales densamente agrupadas, de color verde grisáceo; inverso naranja pálido. Colonias en MEA de 19.48 mm de diámetro, bajas, densas, micelio de blanco a beige; cabezas conidiales numerosos, radiantes, de color verde opaco; inverso marrón amarillo. Colonias en G25N de 20.10 mm de diámetro, planas, densas, de micelio amarillo; reverso amarillo pálido.

Conidióforos nacidos de hifas superficiales o aéreas, estipes con paredes gruesas; vesículas variables, las más grandes casi esférica, de 21.86 μm de diámetro, con métulas y fialides muy juntas; conidios esféricos, muy pequeñas, de 3.14 μm de diámetro, nacidas en cabezas radiadas.

Figura 19

Colonias en medio CREAD después de 7 días de incubación a 25°C; anverso (a, c, d); reverso (b, f, e); *Penicillium* sp. (SOS34) que produce bastante ácido, *P. brevicompactum* (PCA14) con poca producción de ácido, *P. viridicatum* (SOS5) que no produce ácido

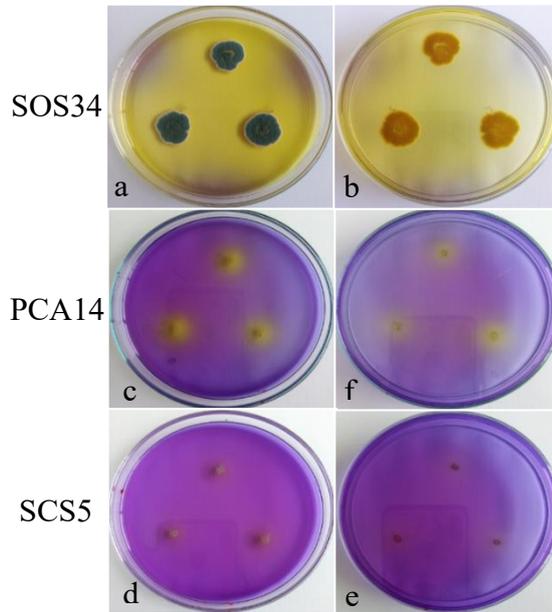


Figura 20

Colonias de aislados productores de bastante ácido: *Penicillium* sp. (SOS34) incubadas por 7 días a 25°C; anverso (a, c); reverso (b, d)

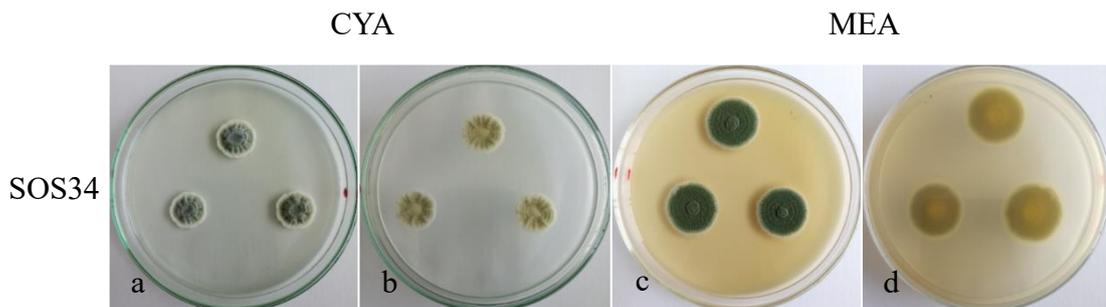


Figura 21

Penicilo de Penicillium sp. (a) después de 7 días a 25°C con barra de 20 μm; conidios (b) con barras de 10 μm

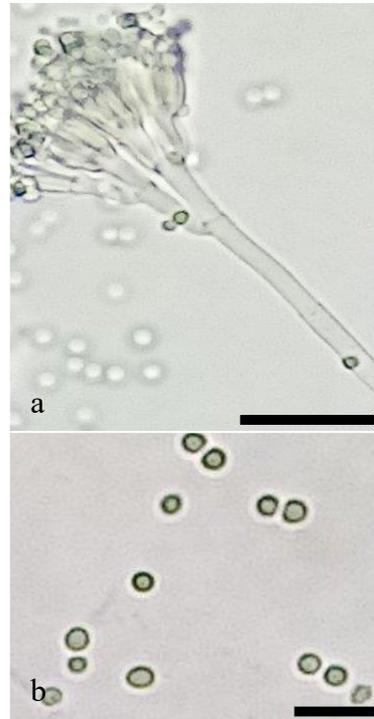


Figura 22

Colonias de aislados que producen poco ácido: P. brevicompactum (SOS11, SOS12, SOS13, SOS14, SOS15), subgénero Penicillium (SOS32) después de 7 días de incubación a 25°C; anverso (a, c, e, g, i, k, m, o, q, s, u, w); reverso (b, d, f, h, j, l, n, p, r, t, v, x)

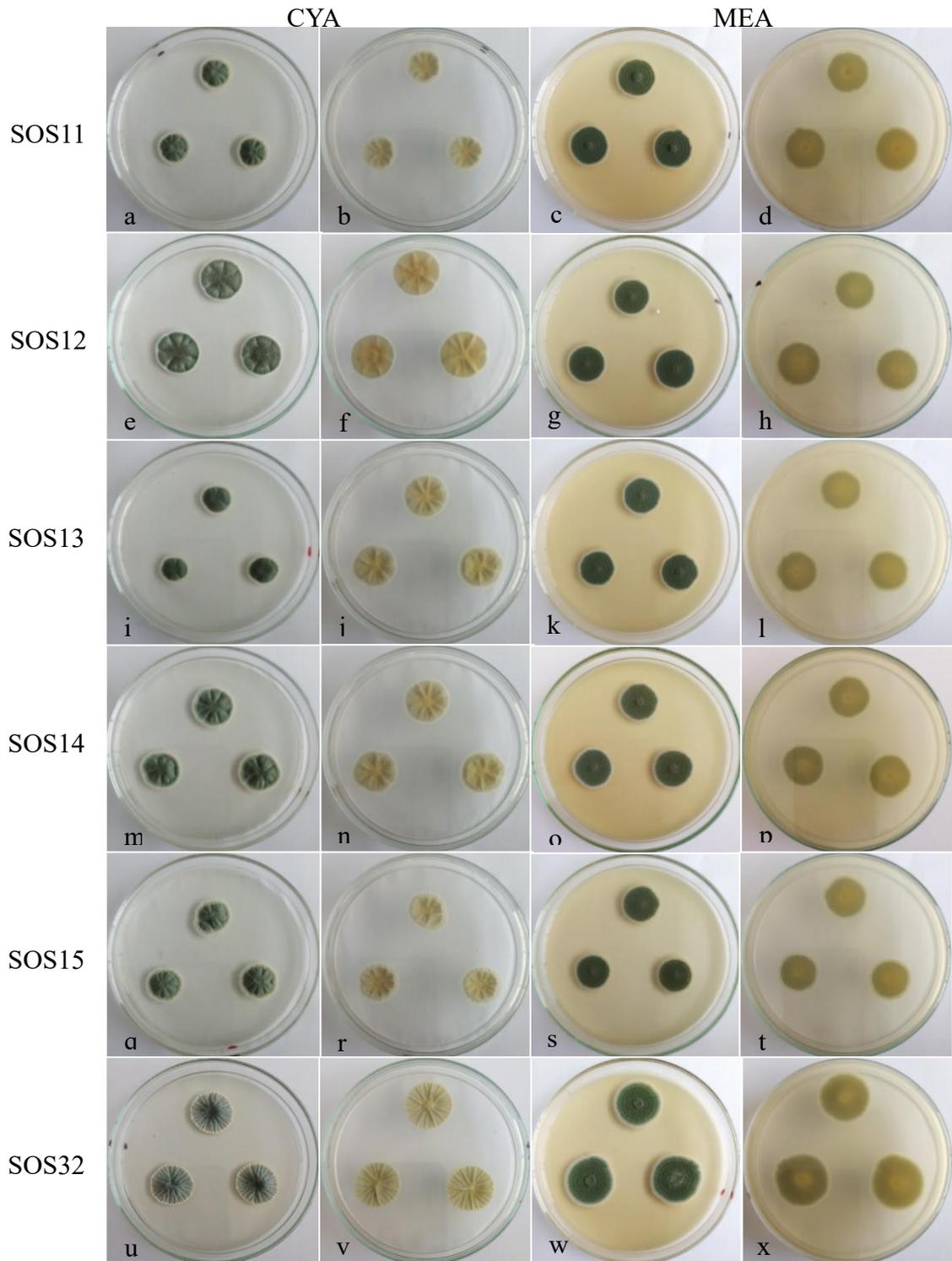


Figura 23

P. brevicompactum SOS11 (a), SOS12 (g), SOS13 (b), SOS14 (c, d), SOS15 (h, e, i, j, k, l); subgénero *Penicillium* SOS32 (f); después de 7 días a 25°C; penicilos (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l), penicilo con colorante fucsina ácida (h) con barras de 20 µm, conidios de *P. brevicompactum* SOS11 (m), SOS12 (r), SOS13 (o), SOS15 (q), subgénero *Penicillium* SOS32 (p) con barras de 10 µm

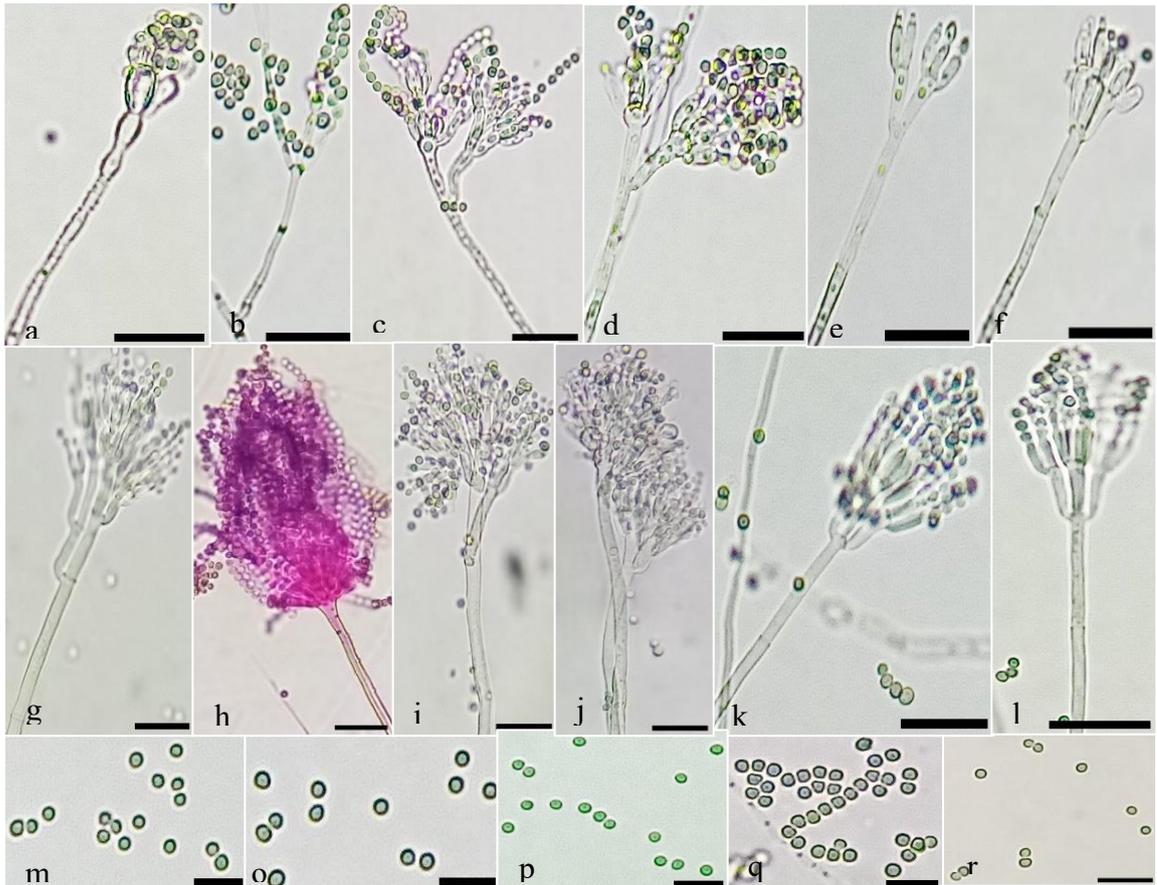


Figura 24

Colonias de aislados no productores de ácido: P. viridicatum (SOS5, SOS6), después de 7 días de incubación a 25°C; anverso (a, c, e, g); reverso (b, d, f, h)

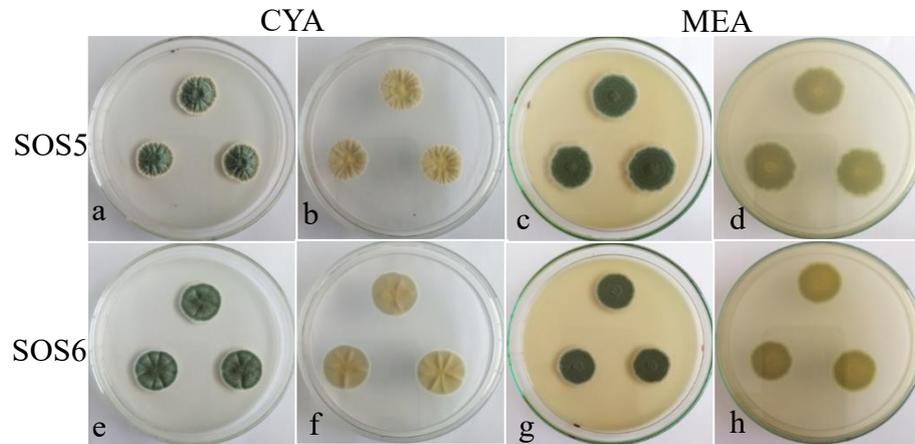


Figura 25

P. viridicatum (a, b, c, d, e, f, g), después de 7 días a 25°C; penicilos (a, b, c, d, e) con barras de 20 µm, conidios (f, g) de 10 µm

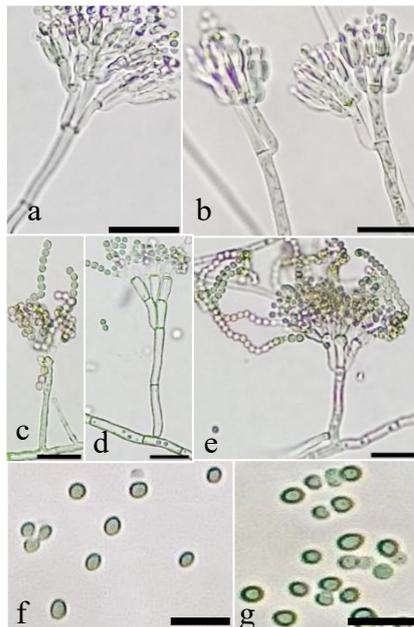


Tabla 7

Descripción macroscópica y microscópica de colonias del género Penicillium aisladas de la colecta 2

Código	Características macroscópicas y microscópicas
SOS5	<i>P. viridicatum</i> Westling
	Colonias en CYA de 20.04 mm de diámetro, radialmente sulcadas, densas, velutinosas; micelio blanco discreto; producción de conidios de moderada a intensa, verde grisáceo; reverso en tonos amarillo pálido. Colonias en MEA de 28.50 mm de diámetro, planas, velutinosas a granulares y centralmente flocosas; micelio blanco en los bordes; formación de conidios moderada, de colores verdosos similares a los de CYA; inverso marrón amarillento. Colonias en G25N de 14.13 mm de diámetro, planas, densas, granulares en la superficie; producción de conidios azul grisáceo; reverso pálido.
	Conidióforos nacidos de hifas superficiales, estipes de 27.88 µm de largo, con penicilos grandes adpresos, generalmente terverticilados; fialides ampuliformes de 10.26 µm de largo; conidios subesferoidales a elipsoidales, de 3.38 µm de largo, con paredes lisas o finamente rugosas, sostenidos en cadenas desordenadas.
SOS12	<i>P. brevicompactum</i> Dierckx
	Colonias en CYA de 23.28 mm de diámetro, radialmente sulcadas, moderadamente profundas, densas, textura velutinosa; micelio blanco; formación de conidios de color verde grisáceo; el reverso es pálido. Colonias en MEA de 22.64 mm de diámetro, planas, velutinosas; micelio blanco; conidios abundantes de color verde oscuro; reverso pálido. Colonias en G25N de 25.19 mm de diámetro, planas o radialmente sulcadas, textura granular, conidios de color verde claro; reverso pálido.
	Conidióforos nacidos del micelio de la superficie, estipes anchos, de 46.13 µm de largo, con penicilos biverticilados anchos y compactos; métulas en grupos divergentes, cortas y anchas, de 13.08 µm de largo; fialides en verticilos divergentes, ampuliformes, de 7.30 µm de largo; conidios

Código	Características macroscópicas y microscópicas
	elipsoidales, de 3.29 μm de largo, sostenidos en cadenas divergentes y desordenadas.
	<i>P. brevicompactum</i> Dierckx
SOS14	<p>Colonias en CYA de 21.76 mm de diámetro, radialmente sulcadas, moderadamente profundas, densas, textura velutinosa; micelio blanco; formación de conidios de color verde claro a moderado; el reverso es pálido. Colonias en MEA de 21.76 mm de diámetro, planas, velutinosas; micelio blanco; conidios abundantes de color verde opaco a verde oscuro; reverso pálido. Colonias en G25N de 18.75 mm de diámetro, planas o radialmente sulcadas, textura granular, conidios de color verde claro a moderado; reverso pálido.</p> <p>Conidióforos nacidos del micelio de la superficie, estipes anchos, de 27.38 μm de largo, con penicilos terverticilados anchos y compactos; métulas en grupos divergentes, cortas y anchas, de 15.11 μm de largo; fialides en verticilos divergentes, ampuliformes, de 7.86 μm de largo; conidios elipsoidales, de 3.24 μm de largo, sostenidos en cadenas divergentes y desordenadas.</p>
	<i>Penicillium</i> sp.
SOS32	<p>Colonias en CYA de 21.09 mm de diámetro, radialmente sulcadas, micelio blanco discreto en los márgenes; producción moderada de conidios verde grisáceo; reverso amarillo pálido. Colonias en MEA de 28.60 mm de diámetro, planas, velutinosas a granulares y centralmente floccosas; micelio blanco en los bordes; formación de conidios abundantes verde claro; inverso incoloro. Colonias en G25N de 20.06 mm de diámetro, planas, densas, granulares en la superficie; producción de conidios azul grisáceo; reverso pálido.</p> <p>Conidióforos nacidos de hifas superficiales, estipes de 18.73 μm de largo, con penicilos biverticilado; métulas lisas de 10.42 μm de largo; fialides</p>

Código	Características macroscópicas y microscópicas
	ampuliformes de 7.69 μm de largo; conidios esferoidales 2.54 μm de largo sostenidos en cadenas desordenadas.

Figura 26

Encuesta realizada a los productores de café de la provincia de Rodríguez de Mendoza

Datos de cada agricultor en el Campo	
1.	¿Cuántas hectáreas tiene de café y cuál es la densidad de siembra?
2.	¿Cuál es la variedad de café cultivado?
3.	Edad de la plantación (si tiene diferentes edades, indicar el área)
4.	Observar si la plantación tiene malahierbas o no y preguntar al productor su impresión sobre este punto.
5.	¿Si realiza fertilización orgánica (abono) o con fertilizantes comerciales?
6.	¿Cuándo fue la última fertilización orgánica (abono) o fertilización con productos comerciales?
7.	¿Cuál es la frecuencia de abono/ fertilización?
8.	¿Son realizadas análisis de suelo?
9.	¿Cuánto produce de café (productividad por año o por campaña)?
10.	Preguntar más o menos cuánto ganan por campaña, para tener noción de la rentabilidad.
11.	¿El café es cultivado con sombra? ¿Qué tipo de sombra (especies de árboles que son utilizadas y cuál es la distancia entre los árboles o densidad de siembra)?
12.	Pendiente y localización del área de cultivo (Google Maps – coordenadas)
13.	¿Qué problemas sanitarios tiene en el campo (broca u otros insectos, roya, ojo de pollo, cercospora, arañero, pie negro (Roselinia), nemátodo)?
a.	Indicar la intensidad de la enfermedad (alto o bajo)
14.	¿Aplican fungicida, insecticida o cualquier otro agroquímico?
15.	¿Con que frecuencia y cuál fue la última vez?
16.	¿Quién está contestando a todas las preguntas (padre de familia, hijo etc., o sea, cuál es el perfil de la persona encuestada)?
17.	¿Pertenece a una cooperativa y a cuál cooperativa y/o a quién venden el café?
18.	¿Cuál es la apreciación de la calidad de la plantación (creen que está muy buena, está regular o está bajo, o sea, la apariencia de las plantas, sombra etc)? Sacar fotos panorámicas.
19.	¿Llovió esta última semana? (para saber las condiciones ambientales que fueron sometidas las muestras que será recolectadas)
20.	¿Hace cuantas horas está fermentando el grano muestreado?
21.	¿Hace cuánto tiempo está almacenado el grano muestreado?
22.	Sacar foto de cada local de muestreo.
23.	Verificar si tienen producción animal, animales domésticos, aves etc.
24.	Verificar la región alrededor (situación geográfica o en que parte del paisaje está la plantación – morro, parte baja, cerca de ríos, montañas etc.)
Incluir la coleta de muestra de suelo (para análisis de caracterización, microbiológica y de nematodos)	
No preguntar solamente, ir a verificar las informaciones dadas por el agricultor	
Preguntar al productor lo que está haciendo falta y si podríamos apoyar en algo	