

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS PRESENTES EN LOS  
CULTIVOS DE CAFÉ (*Coffea arabica*) DEL DEPARTAMENTO NORTE DE  
SANTANDER**

**CRISS F. SALAZAR TÉLLEZ**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito parcial para optar al título de  
MICROBIÓLOGO**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA  
Pamplona, 2020**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS PRESENTES EN LOS  
CULTIVOS DE CAFÉ (*Coffea arabica*) DEL DEPARTAMENTO NORTE DE  
SANTANDER**

**CRISS F. SALAZAR TÉLLEZ**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito parcial para optar al título de  
MICROBIÓLOGO**

**Directora**

**Liliana Rojas Contreras, MSc.**

**Codirectora**

**Angela Maritza Cajiao, MSc.**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA  
Pamplona, 2020**

**Nota de aceptación**

---

---

---

---

---

---

Firma jurado

---

Firma jurado

## DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico inicialmente a Dios por permitirme alcanzar cada uno de los objetivos que me planteé al momento de iniciar mi carrera profesional, ya que esta investigación refleja lo aprendido durante el tiempo que duró mi formación como estudiante.

A mi padre, Crisóstomo Salazar Estupiñán, y a mi madre, Oliva Téllez López, por guiar mis pasos desde que era niño hasta el día de hoy, por sus consejos, sus ánimos de salir adelante y alcanzar mi título profesional, por sus esfuerzos humanos, económicos, por los valores sembrados en mí y su amor incondicional. Por enseñarme a ser perseverante y persistente en alcanzar mis sueños y no dejar de ser persona sin importar los alcances que tenga. Así mismo, dedico este trabajo a cada uno de mis hermanos y familiares, por alentarme en lograr esta gran meta, por los buenos deseos y por su acompañamiento.

También, esta dedicatoria va dirigida para Adriana Lucia Bautista Ramón, mi compañera de vida, y sus padres, por el apoyo sinigual, sus consejos, sugerencias y motivación. Por su comprensión y paciencia en momentos tediosos de esta vida como estudiante y persona. Por su compañía absoluta, su amor, por su gran ayuda en el momento de tomar decisiones importantes para mi vida y por enseñarme que las cosas suceden siempre por una buena razón.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer de una manera muy especial a la docente Liliana Rojas Contreras, por instruirme y apoyarme en la realización de este trabajo, por creer en mi desde un inicio cuando apenas era un estudiante de quinto semestre y animarme para hacer parte del grupo de investigación, y sumergirme en esta otra fase que tenemos como estudiantes, además, de brindarme su sincera amistad. Así mismo, quiero agradecer muy calurosamente a los docentes Angela Cajiao y Ovidio García por brindarme las herramientas necesarias para la elaboración de este trabajo de grado, por compartir cada una de sus experiencias, conocimientos, no solo como profesionales sino como personas y también por su amistad.

Igualmente, quiero agradecer a cada uno de los docentes del programa que hacen parte y los que hicieron parte del mismo, ya que todos ellos son los responsables de que el día de hoy alcance esta gran meta, de que sea un profesional integro, tanto en lo intelectual, lo social, lo profesional, pero lo más importante, en la dimensión humana. A todos y cada uno de ellos, mil gracias por educarme en actitudes, habilidades y valores.

A mis compañeros de carrera, por su gran amistad, por el apoyo y compañía en el desarrollo de esta etapa de nuestras vidas. Finalmente, pero no menos importante, a mi amigo Walter Morales, ya que, sin el apoyo de él, este trabajo no finalizaría hoy, agradecerle por su gran amistad, sus consejos y por las experiencias vividas.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1. GENERAL .....	14
2.2. ESPECÍFICOS .....	14
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>16</b>
<b>4. MARCO REFERENCIAL</b> .....	<b>19</b>
4.1. MARCO TEÓRICO .....	19
4.1.1. <i>Generalidades del café</i> .....	19
4.1.2. <i>Taxonomía</i> .....	20
4.1.3. <i>Composición química del grano del café</i> .....	23
4.1.4. <i>Generalidades del fruto del café</i> .....	24
4.1.5. <i>El café y las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA)</i> .....	25
4.1.6. <i>Hongos asociados al café</i> .....	26
4.1.7. <i>Micotoxinas asociadas a granos de café</i> .....	27
4.1.8. <i>Biología molecular aplicada a la taxonomía de hongos filamentosos</i> ..	31
4.2. BASES LEGALES.....	33
4.3. ANTECEDENTES.....	35
4.3.1. <i>A nivel internacional</i> .....	35
4.3.2. <i>A nivel nacional</i> .....	37
4.3.3. <i>A nivel regional</i> .....	37
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	<b>39</b>
5.1. PROCESO DE MUESTREO .....	39
5.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DIRIGIDO AL AISLAMIENTO FÚNGICO.....	39
5.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS FÚNGICAS AISLADAS.....	39
5.4. ANÁLISIS FISCOQUÍMICO.....	40
5.5. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS EN MEDIOS DE CULTIVO .....	41
5.5.1. <i>Método de vapores amoniacaes</i> .....	41
5.5.2. <i>Método de emisión de fluorescencia</i> .....	41
5.6. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR .....	41
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>43</b>
6.1. CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE LAS CEPAS AISLADAS	43
6.2. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISCOQUÍMICAS ASOCIADAS AL GRANO DE CAFÉ (TIPO CEREZA) CULTIVADO EN NORTE DE SANTANDER.....	51
6.3. DETERMINACIÓN DE CEPAS CON POTENCIAL AFLATOXIGÉNICO AISLADAS A PARTIR DEL GRANO DE CAFÉ .....	57
6.3.1. <i>Determinación de aflatoxinas mediante vapores amoniacaes</i> .....	57

6.3.2. <i>Determinación de aflatoxinas mediante emisión de fluorescencia</i> .....	61
6.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS AISLADAS A PARTIR DEL GRANÓ DE CAFÉ.....	66
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>70</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>72</b>
<b>9. REFERENCIAS</b> .....	<b>73</b>
<b>10. ANEXOS</b> .....	<b>83</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructuras morfológicas de las partes del cafeto.....	19
<b>Figura 2.</b> Coffea arabica.....	21
<b>Figura 3.</b> Coffea canephora. ....	22
<b>Figura 4.</b> Coffea liberica.. ....	22
<b>Figura 5.</b> Composición de un fruto de café.. ....	24
<b>Figura 6.</b> Estructura de las aflatoxinas .....	29
<b>Figura 7.</b> Genes y ruta biosintética de las aflatoxinas. ....	30
<b>Figura 8.</b> Diagrama esquemático de la región del espaciador transcrito interno (ITS) entre el rDNA de subunidad pequeña (SSU) y el rDNA de subunidad grande (LSU), que incluye el rDNA de ITS I, ITS II y 5.8S .....	32
<b>Figura 9.</b> Diagrama de flujo de la metodología aplicada. ....	42
<b>Figura 10.</b> Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos X006, X007-2, X013-4, X025-2, X029-2 en MEA (A: reverso, B: anverso, C: textura); CYA (D: reverso y E: anverso, F: textura); G: conidióforo, H: hifas e I: esporas.. ....	44
<b>Figura 11.</b> Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos X004-2, X008-2, X014, X018, X026-2 y X030 en MEA (A: reverso, B: anverso, C: textura); CYA (D: reverso y E: anverso, F: textrua); G: conidióforo, H: hifas e I: esporas....	45
<b>Figura 12.</b> Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos X004-3, X008-1, X020, X037, X038 y X042 en CLA (A: reverso, B: anverso, C: textura); SNA (D: reverso y E: anverso, F: textrua); G: macroconidias, H: hifas e I: microconidias .....	46
<b>Figura 13.</b> Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos X003, X13-3, X019-2. X023-1 y X027-1 en MEA (A, D: reverso, B, E: anverso, C, F: textura); G, I: artrosporas, H: hifas.....	47
<b>Figura 14.</b> Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos X011 y X012 en MEA (A, D: reverso, B, E: anverso, C, F: textura); G: esporangio, H: hifas, I: esporangiosporas .....	48

<b>Figura 15.</b> Porcentajes de presencia de hongos aislados de los cultivos de café en los diferentes municipios.....	49
<b>Figura 16.</b> Porcentaje de presencia del total de los hongos aislados.....	50
<b>Figura 17.</b> Dendograma, Método del Vecino Más Cercano, Euclidean Cuadrada .....	54
<b>Figura 18.</b> Gráfica de funciones discriminantes .....	55
<b>Figura 19.</b> Departamento de Norte de Santander .....	56
<b>Figura 20.</b> Cepas negativas para la producción de aflatoxinas, sometidas a vapores amoniacales durante 6 días. A: X006 en YES; B: X007-2 en PDA; C: X013-4 en ALC; D: X015-1 en ALC; E: X024 en PDA; F: X025-2 en YES; G: X027-2 en ALC; H: X029-1 en YES; I: X029 en PDA .....	58
<b>Figura 21.</b> Control negativo y positivo en la metodología de vapores amoniacales. A, B y C: Control negativo en ALC, PDA y YES, respectivamente. D, E y F: Control positivo en ALC, PDA y YES, respectivamente. Control negativo (cepa de <i>A. brasiliensis</i> , suministrada por el cepario del programa de Microbiología de la Universidad de Pamplona); Control positivo (Cepa A052 suministrada por la directora).....	59
<b>Figura 22.</b> El color de la colonia inversa de la cepa de <i>Aspergillus flavus</i> productora de aflatoxinas cultivada en agar PDA, YES y COA después de 4 días de incubación a 25°C, mostradas en la parte superior e inferior mostradas antes y después de la exposición al vapor de amoníaco, respectivamente.....	60
<b>Figura 23.</b> Cepas negativas para la producción de aflatoxinas mediante emisión de fluorescencia. A: X006 en AEC a los 7 días; B: X007-2 en ALC a los 10 días; C: X013-4 en ACR a los 15 días; D: X015-1 en ACR a los 10 días; E: X024 en ALC a los 7 días; F: X025-2 en AEC a las 15 días; G: X027-2 en ALC a los 15 días; H: X029-1 AEC a los 10 días y I: X029-2 en ACR a los 7 días.....	63
<b>Figura 24.</b> Control negativo (A) y control positivo (B) de la metodología de emisión de fluorescencia. Control negativo (cepa de <i>A. brasiliensis</i> , suministrada por el cepario del programa de Microbiología de la Universidad de Pamplona); Control positivo (Cepa A052 suministrada por la directora) .....	64

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Promedios de la composición química del grano de café almendra, según la especie, porcentaje en base seca.....	23
<b>Tabla 2.</b> Principales micotoxinas asociadas al café, riesgos y mohos productores.....	27
<b>Tabla 3.</b> ANOVA para pH por Procedencia .....	51
<b>Tabla 4.</b> ANOVA para Aw por Procedencia.....	51
<b>Tabla 5.</b> ANOVA para % de Humedad por Procedencia .....	52
<b>Tabla 6.</b> Grupos homogéneos de las pruebas de múltiples rangos. Medias y desviaciones estándar de las variables de cada municipio.....	53
<b>Tabla 7.</b> Efecto de los medios sobre la intensidad del color rosa inducido por el vapor de amoníaco (incubación de 6 días a 25 °C) .....	57
<b>Tabla 8.</b> Intensidad de la fluorescencia emitida por los hongos seleccionados.....	61
<b>Tabla 9.</b> Identificación molecular de las cepas asociadas al grano de café con los iniciadores ITS 4 e ITS 5 mediante la comparación con bases de datos utilizando la herramienta BLAST. ....	67

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Valores promedio de variables fisicoquímicas (pH, porcentaje de humedad y actividad de agua).....	83
<b>Anexo 2.</b> Composición de los medios usados para la caracterización macroscópica y microscópica de <i>Aspergillus</i> spp. y <i>Penicillium</i> spp. ....	85
<b>Anexo 3.</b> Composición de los medios usados para la caracterización macroscópica y microscópica de <i>Fusarium</i> spp.....	86
<b>Anexo 4.</b> Composición de los medios usados para la metodología de vapores amoniacales.....	87
<b>Anexo 5.</b> Composición de los medios usados para la metodología de emisión de fluorescencia.....	88
<b>Anexo 6.</b> Secuencias ensambladas (consenso) utilizadas en la herramienta BLAST. ....	89
<b>Anexo 7.</b> Resultado de la comparación de la secuencia problema (X010-2) contra la base de datos UNITE y Warcup fungal RDP, respectivamente. ....	90
<b>Anexo 8.</b> Resultado de la comparación de la secuencia problema (X007-1) contra la base de datos UNITE y Warcup fungal RDP, respectivamente. ....	91
<b>Anexo 9.</b> Resultado de la comparación de la secuencia problema (X001) contra la base de datos UNITE y Warcup fungal RDP., respectivamente. ....	92
<b>Anexo 10.</b> Resultado de la comparación de la secuencia problema (X013-4) contra la base de datos UNITE y Warcup fungal RDP, respectivamente. ....	93

## 1. INTRODUCCIÓN

El café representa a nivel mundial el segundo producto básico de mayor importancia, y en nuestro país sigue siendo el protagonista de la economía, sin embargo, los cultivos de café o más específicamente los granos, se han visto susceptibles a contaminantes fúngicos; adicionalmente, y dado que el café es una bebida común, se han desarrollado estudios conducentes a determinar la presencia de tales contaminantes y su implicación en la salud (Gamboa, 2012).

Los granos de café son propensos a la contaminación por hongos (Peraica *et al.*, 1999) debido a que, por razones económicas, los procesos de almacenamiento no son efectuados con éxito, como, por ejemplo, la temperatura y la humedad no son controlados en dichos periodos, potencializando de esta forma la generación de micotoxinas, presentando un alto riesgo para la población que lo consume (Carrillo, 2003).

Los hongos de los géneros *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp. son los que presentan mayor prevalencia en los granos de café (Garrido *et al.*, 2018), produciendo una variedad de metabolitos secundarios como: aflatoxinas, ocratoxinas, específicamente ocratoxina A en los granos de café, así mismo, patulina, fumonisinas, zearalenona y tricotecenos como nivalenol y desoxinivalenol (Organización Mundial de la Salud, 2018).

Como se mencionó anteriormente, las micotoxinas son metabolitos secundarios que ejercen un efecto tóxico en la salud de los animales y humanos. A pesar de que presentan estructuras químicas muy diversas, son compuestos orgánicos de baja masa molecular (Peraica *et al.*, 1999) que están relacionadas con ciertas enfermedades. Una serie de estudios (Peraica *et al.*, 1999; Bolet *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2006) demuestran el riesgo que representan las micotoxinas para la salud, tales como las ocratoxinas que causan necrosis tubular en los riñones, además de tener efectos nefrotóxicos, inmunosupresores, carcinogénicos y teratogénicos; las aflatoxinas tienen efectos inmunosupresores, mutagénicos, teratogénicos, carcinogénicos, siendo el hígado el principal órgano diana; las micotoxinas como zearalenona presentan consecuencias siendo un disruptor endocrino; y adicionalmente, los tricotecenos muestran efectos de inmunosupresión, neurotoxicidad, disminución en la absorción de nutrientes.

A raíz de lo mencionado, radica la importancia de esta investigación, la cual tuvo como objetivo principal determinar la presencia de hongos presentes en la etapa de beneficio del café denominada cereza, el cual es cultivado en los diferentes municipios del departamento Norte de Santander, dicha determinación se alcanzó gracias a técnicas de la Microbiología tradicional. Adicionalmente, se realizaron pruebas fisicoquímicas (Aw, pH y porcentaje de humedad), las cuales dieron a conocer qué condiciones ofrecen los cultivos para que los hongos se desarrollen. A

partir de las muestras tomadas, se realizaron aislamientos fúngicos y su respectiva caracterización macroscópica y microscópica teniendo como referencia a Barnett & Hunter (1998); Carrillo (2003); Summerell *et al.* (2003); Leslie *et al.* (2006); Pitt y Hocking (2009); Samson *et al.* (2014); Visagie *et al.* (2014 a) y Visagie *et al.* (2014 b). Así mismo, se realizaron ensayos de detección de aflatoxinas por medio de métodos empleando medios de cultivo (vapores amoniacales y emisión de fluorescencia), además, se realizó la identificación molecular de los cuatro géneros más presentes, gracias al uso de las regiones ITS4 e ITS5. Los resultados obtenidos brindan un indicio sobre la inocuidad y seguridad del café que se cultiva en los diferentes municipios del departamento Norte de Santander.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GENERAL

Identificar los hongos aislados presentes en la etapa de beneficio del café (*Coffea arabica*) tipo cereza producido en los diferentes municipios del departamento Norte de Santander.

### 2.2. ESPECÍFICOS

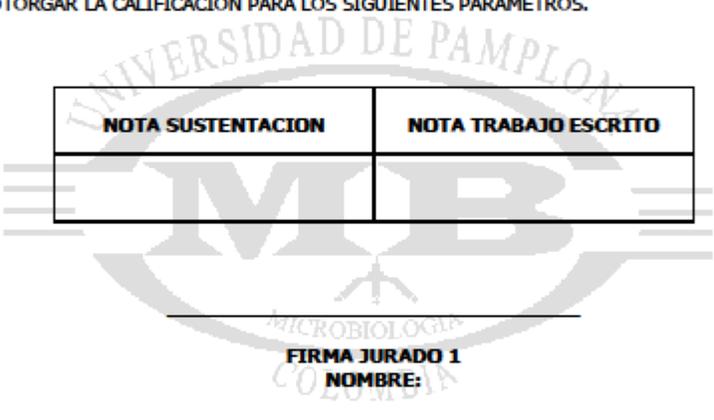
Caracterizar macroscópica y microscópicamente las cepas fúngicas aisladas de las muestras de café (*Coffea arabica*) cultivado en Norte de Santander.

Establecer las variables fisicoquímicas (pH, % humedad y  $A_w$ ) asociadas al grano de café (tipo cereza) cultivado en Norte de Santander.

Determinar cualitativamente las cepas con potencial aflatoxigénico aisladas a partir del grano de café (*Coffea arabica*) cultivado en Norte de Santander.

Identificar molecularmente los hongos asociados al grano de café (*Coffea arabica*) cultivado en Norte de Santander.



ACTA DE SUSTENTACION DE TRABAJO DE GRADO PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA		CODIGO					
		PAGINA	1 DE 1				
<b>NOMBRE ESTUDIANTE</b>	CRISS FERNANDO SALAZAR TELLEZ	<b>CODIGO</b>	1094282166				
<b>SITIO DE PRACTICA</b>	Universidad de Pamplona GIMBIO	<b>FECHA</b>	14-12-20 10.30 a.m				
<b>TITULO DEL TRABAJO</b>	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS QUE AFECTAN LOS CULTIVOS DE CAFÉ (Coffea arabica) DEL DEPARTAMENTO NORTE DE SANTANDER						
<p>DE ACUERDO AL ESTUDIO Y EVALUACION DE LOS ELEMENTOS QUE COMPONEN EL ACTO DE SUSTENTACION COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL TITULO DE MICROBIÓLOGO; LOS JURADOS BAJO CRITERIO UNIFICADO HAN DECIDIDO OTORGAR LA CALIFICACION PARA LOS SIGUIENTES PARAMETROS.</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th>NOTA SUSTENTACION</th> <th>NOTA TRABAJO ESCRITO</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="height: 40px;"></td> <td style="height: 40px;"></td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">             _____  <b>FIRMA JURADO 1</b>  <b>NOMBRE:</b> </p> <p style="text-align: center;">           _____  <b>FIRMA JURADO 2.</b>  <b>NOMBRE:</b> </p> <p style="text-align: center;">           _____  <b>FIRMA ESTUDIANTE.</b> </p>				NOTA SUSTENTACION	NOTA TRABAJO ESCRITO		
NOTA SUSTENTACION	NOTA TRABAJO ESCRITO						



### 3. JUSTIFICACIÓN

El café ha sido por más de un siglo el principal producto de la economía nacional y por tanto el que mayor incidencia ha tenido en el desarrollo económico de Colombia; se estima que existen 3,6 millones de hectáreas disponibles para la industria de la caficultura, pero sólo 970 mil hectáreas son empleadas para tal fin (Pérez, 2013). Hablar de café, es notificar que su impacto social y económico va más allá de las regiones cafeteras, debido a que es el núcleo y generador de demanda sobre otros sectores siendo de esta manera un activo estratégico del desarrollo nacional (Ramírez *et al.*, 2002), lo cual se vio reflejado para el cierre de año 2019, donde se produjo 14,8 millones de sacos de 60 kilogramos de café, representando un 9 % más que el cierre de 2018, volumen de producción que no se registraba desde hace 25 años (FNC, 2020).

Teniendo como referencia a la Organización Internacional del Café (ICO, 2019) se estima que hoy en día, en más de 50 países se produce comercialmente café y en todo el mundo, diariamente se consume más de tres mil millones de tazas del mismo, siendo Brasil el principal productor, seguido de Vietnam y variando entre el tercer y cuarto lugar, Colombia, con valores de producción porcentual de 30,2 %, 19,2 %, y 9,4 %, respectivamente en el periodo de 2008 al 2015 (Pérez, 2013; FNC, 2014; Ocampo, 2017). Con relación a las exportaciones de café, para el periodo 1990 - 2015, el análisis estadístico de la OIC, evidencia que los principales exportadores en el 2015 fueron: Vietnam (25,2 %), Brasil (22,2 %), Colombia (11,9 %) e Indonesia (6,8 %) (ICO, 2016). Para el periodo 2017 - 2018 el consumo mundial fue de 161,4 millones de sacos (FNC, 2018).

La caficultura se ve afectada por factores bióticos y abióticos que inciden en la producción de café. Entre estos, los llamados factores determinantes no son controlados por el caficultor, ya que se relacionan directamente a las condiciones climáticas como radiación, temperatura, CO<sub>2</sub>, entre otros, sin embargo, los factores limitantes, que hacen referencia a la fertilidad del suelo y los factores reductores, que son los relacionados con enfermedades y plagas, son alcanzables, es decir, en medida son controlados (Arcila, 2007). Por otro lado, como otros granos, el café, es susceptible a la contaminación en condiciones de cosecha y almacenamiento, en otras palabras, dentro de su procesamiento enfrenta diferentes retos que pueden influenciar en la calidad, pero es el factor humedad el principal responsable de incrementar la aparición de mohos sobre el grano (Jaramillo, 2011). Descrito por Santos (1999), existen más de 200 tipos de mohos toxigénicos, que, bajo condiciones requeridas por el hongo, son capaces de producir toxinas que se les conocen con el nombre de micotoxinas, siendo las aflatoxinas y las ocratoxinas las más frecuentes en granos de café. Bajo estas consideraciones, los casos de granos de café que se encuentran contaminados podrían causar no sólo una inestabilidad en la economía de los países productores, sino también, un problema de inocuidad y seguridad alimentaria. Se podría afianzar que, así como Colombia produce

cantidades considerables de café, de igual forma se empeña en investigar sobre la presencia de mohos potencialmente micotoxigénicos durante el procesamiento del café, además de la presencia de las micotoxinas en el producto final, pero la perspectiva actual es otra, ya que en nuestro país la información acerca sobre la problemática mencionada es poca o nula, y por tal motivo se hace necesario irrumpir en el estudio de la microbiota fúngica presente en el café y su potencialidad en la producción de las micotoxinas convirtiéndose en el tema principal de esta investigación.

Una de las principales limitaciones en la producción de granos de café es la contaminación por hongos. La temperatura, el contenido de humedad, las condiciones de almacenamiento y la duración del almacenamiento pueden ser factores importantes para el desarrollo de los mohos. Además, los factores relacionados con el campo, como la infestación de insectos, la susceptibilidad de la variedad de café y la composición de nutrientes del cultivo, son factores predisponentes para la invasión de hongos (Amezqueta *et al.*, 2008). Algunos estudios revelaron que los géneros de hongos toxigénicos como *Aspergillus* y *Penicillium*, son contaminantes naturales del café y están presentes desde el campo hasta el almacenamiento (Nakajima *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2000, FAO, 2006).

La presencia de hongos en los granos de café no sólo afecta la calidad sensorial de la bebida de café, sino que también presenta un riesgo para la salud atribuido a la producción de micotoxinas por algunos de estos géneros de hongos (Rezende *et al.*, 2013). Las aflatoxinas, ocratoxinas, patulina y esterigmatocistina son micotoxinas que se encuentran a menudo en el café (Soliman, 2005; Bokhari, 2007; Bokhari *et al.*, 2009; Paterson *et al.*, 2014, Culliao *et al.*, 2015). La Ocratoxina A (OTA) es una micotoxina que se encuentra naturalmente en varios productos alimenticios, incluidos los granos de café verde, el café tostado y el café instantáneo (Holzhauser *et al.*, 2003). Sin embargo, un análisis reciente del café mostró de manera convincente que el café puede estar contaminado por una gama mucho más amplia de micotoxinas, incluidos los tricotecenos, nivalenol, deoxinivalenol, toxina T-2 y HT-2, diacetoxiscirpenol, fumonisinas B1 y B2, y las micotoxinas emergentes ciclodepsipéptidos, enniatina A, enniatina A1, enniatina B, enniatina B1 y beauvericina (Moraleja *et al.*, 2015).

Hoy en día, la información disponible sobre la microbiota del café que es cultivado en el departamento Norte de Santander es muy escasa. Por tal motivo, los resultados obtenidos en esta investigación podrán ser utilizados como un referente para brindar posibles soluciones a la problemática planteada, como por ejemplo, el uso de otros hongos como biocontroladores, evitando la colonización en las primeras etapas del beneficio del café, además, hacer hincapié sobre las condiciones adecuadas en las actividades de almacenamiento del grano de café y así, eludir el crecimiento de los hongos, con el objetivo de obtener un producto inocuo y de calidad.

Este estudio, figura como un pie de apoyo para alentar nuevas investigaciones sobre hongos con potencial micotoxigénico, las cuales no se limiten a un tipo de micotoxinas sino a una pluralidad de las mismas, y de esta manera ampliar los soportes técnicos y científicos del principal producto alimentario de Colombia. Así mismo, la investigación representa un impacto social, no sólo para el departamento Norte de Santander y departamentos caficultores, sino para el país en general, debido a que demuestra el estado y calidad del café que es cultivado, y una vez teniendo este conocimiento, se buscará en mejorar la seguridad, inocuidad y calidad del producto.

## 4. MARCO REFERENCIAL

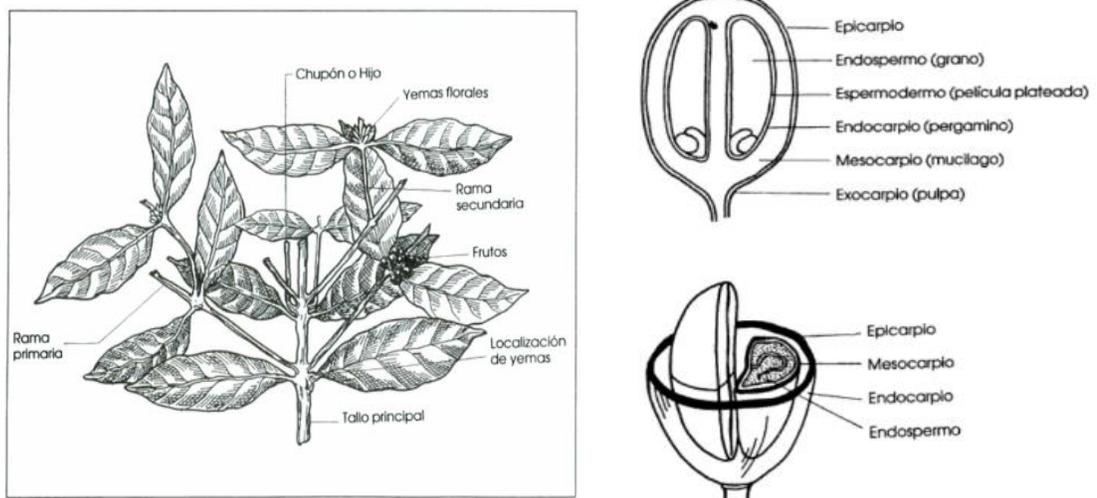
### 4.1. MARCO TEÓRICO

#### 4.1.1. Generalidades del café

El término café se deriva del árabe “kahwah” (cauá), llegando a nosotros a través del vocablo turco “kahweh” (cavé) (Jiménez, 2018), que significa “vino”. El café hace parte de la familia *Rubiaceae*, en donde se agrupan 500 géneros y más de 6000 especies, son árboles tropicales y/o arbustos que crecen en la parte baja de los bosques (Food-Info, 2017), sus hojas son persistentes y opuestas, son de pecíolo corto entre ovaladas, las flores son blancas con olor y color parecido al jazmín; los cafetos, producen frutos carnosos, rojos o púrpuras, raramente amarillos, denominados “cerezas”, con dos núcleos, cada uno con un grano de café (**Figura 1**) (Galindo, 2011). La semilla del café es de aproximadamente un centímetro de largo, que al tostarla y molerla se usa para preparar una bebida estimulante y energética (Beer *et al.*, 1998).

Otros miembros de la familia incluyen las gardenias y plantas que producen quinina entre otras sustancias útiles, pero el *Coffea* es el miembro más importante de la familia, económicamente hablando (Food-Info, 2017).

**Figura 1.** Estructuras morfológicas de las partes del cafeto. Fuente: Alvarado *et al.*, 1994



#### 4.1.2. Taxonomía

El café o cafeto como es llamado presenta la siguiente clasificación botánica:

Reino: *Plantae*  
División: *Magnoliophyta*  
Sub-división: *Angiospermae*  
Clase: *Magnoliopsida*  
Sub-clase: *Asteridae*  
Orden: *Rubiales*  
Familia: *Rubiaceae*  
Género: *Coffea*

El género *Coffea* contiene aproximadamente 100 especies. Sin embargo, sólo tres se mencionan que son cultivadas comercialmente, destacándose de acuerdo al siguiente orden: *Coffea arabica* L. (café arábica) y *Coffea canephora* (café robusta) y *Coffea liberica* (café libérica) (Alvarado *et al.*, 1994).

El café arábigo fue descrito por primera vez por Linnaeus en 1753. Las variedades más conocidas son 'Typica' y 'Bourbon' pero a partir de estas muchas cepas y cultivos han sido desarrolladas, como la caturra (Brasil, Colombia), Mundo Novo (Brasil), Tico (América Central), el enano San Ramón y la jamaicana Blue Mountain. El promedio de una planta arábica es un arbusto largo con hojas ovales verde oscuro (Food-Info, 2017), relativamente pequeñas, pero varían en anchura, promediando de 12 - 15 cm de largo y más o menos 6 cm de ancho, acuminadas, cortas, agudas en la base, algunas veces un tanto onduladas, siempre vivas. Las flores fragantes, de color blanco o cremoso, subsésiles o muy cortamente pediceladas, varias en cada axila de las hojas, de 2 - 9 o más juntas en racimos axilares muy cortos o laterales bracteolados (Jiménez, 2018). Los frutos son ovales, varían en tamaño de 8,5 a 12,7 mm de largo y maduran entre 7 a 9 meses; ellos normalmente contienen dos semillas planas (los granos de café) cuando sólo un grano se desarrolla se llama peaberry (**Figura 2**). Es genéticamente diferente de otras especies de café, teniendo cuatro sets de cromosomas en vez de dos. El café arábigo es a menudo susceptible al ataque de plagas y enfermedades, por tanto, la resistencia a estas es un objetivo primordial de los programas de cultivo de la planta. El café arábigo es cultivado en toda América Latina, en África Central y del Este, en la India y en parte de Indonesia (Food-Info, 2017). En la literatura científica se han descrito numerosas variedades botánicas y hortícolas de *C. arabica* (Jiménez, 2018).

**Figura 2.** *Coffea arabica*. Fuente: Food-Info, 2017.



El término 'robusta' es realmente el nombre de una variedad extensamente cultivada de la especie *Coffea canephora*. Es un arbusto robusto que crece hasta los 10 metros de altura, pero con un sistema de raíces poco profundas (Food-Info, 2017). Contiene hojas anchas que a veces adquieren una apariencia corrugada u ondulante, oblonga, elíptica, cortas, acuminadas, redondeadas o ampliamente acuñaadas en su base, de 15 - 30 cm de largo y 5 - 15 cm de ancho (Jiménez, 2018). Los frutos son redondeados y tardan hasta 11 meses para madurar; las semillas son ovales y más pequeñas que las de *C. arabica* (**Figura 3**) (Food-Info, 2017). Genéticamente es la especie diploide más cultivada en el mundo. Es útil en programas de mejoramiento de *Coffea arabica* por su rusticidad, buena producción y resistencia de alguna de sus líneas a plagas y enfermedades, especialmente la roya del cafeto y la enfermedad del fruto llamada CBD. Su bebida es de baja calidad y alto contenido de cafeína (Orozco, 1986). El café robusta es cultivado en África Occidental y Central, a lo largo del sureste de Asia y en algunas regiones de Brasil, donde es conocido como Conillon (Food-Info, 2017). El café robusta es nativo de los bosques ecuatoriales de África, desde la costa oeste hasta Uganda y la parte sur de Sudán, lo mismo que de la parte de África occidental, entre las latitudes de 10° norte y 10° sur, en elevaciones desde el nivel del mar hasta más o menos 1000 metros de altura (Jiménez, 2018).

**Figura 3.** *Coffea canephora*. Fuente: Méndez, 2011



El café libérica, es un árbol sumamente ornamental y pronto fue conocido en muchas otras partes del mundo, después de su descubrimiento en 1872. Su descripción botánica es la siguiente: es un arbusto o árbol liso, las hojas son más bien grandes, brillantes; la vaina ampliamente acunada en su base, ampliamente elíptica ovalada, corta, acuminada, un tanto ondulada, delgada, coriácea, tiene más o menos 20 cm de largo y 10 cm de ancho. Las flores blancas, en cantidad de 7 - 6, subsésiles, reunidas varias en racimos, axilares, alcanzan más o menos de 3 - 5 cm de largo (**Figura 4**). La semilla es de 1,27 cm o un poco más. El vigor del café liberiano, y su supuesta resistencia a la roya por hemileia, lo llevó a la popularidad en Indonesia entre 1880 y 1905, pero más tarde se le sustituyó por otras especies. Este árbol crece hasta 10 a 15 m de altura, soporta la exposición al sol mejor que la mayoría de los otros miembros del género y tiene una buena retención de sus frutos maduros (Jiménez, 2018). El café libérica es cultivado en Malasia y en África Occidental, pero sólo pequeñas cantidades son comercializadas pues la demanda por su sabor característico es baja (Food-Info, 2017).

**Figura 4.** *Coffea liberica*. Fuente: Jiménez, 2018.



### 4.1.3. Composición química del grano del café

Químicamente, el café está compuesto por agua y materia seca; esta última se constituye por minerales y sustancias orgánicas que son los carbohidratos, lípidos, proteínas, alcaloides, como la cafeína y la trigonelina, así como, por ácidos carboxílicos y fenólicos, y componentes volátiles que dan la esencia (Cenicafé, 2011).

Diferentes factores como la especie, madurez, fermentación y etapas de beneficio del café, son los responsables en la composición química y en la calidad tanto del sabor como de la acidez, cuerpo, amargor, dulzor y aromas de una bebida de café (Cenicafé, 2011).

Los granos de café almendra de las variedades de *Coffea arabica* contienen una mayor cantidad de lípidos y de sacarosa que *Coffea canephora* (Robusta), mientras que en la composición de robusta se destaca el mayor contenido de polisacáridos, cafeína, ácidos clorogénicos y cenizas (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Promedios de la composición química del grano de café almendra, según la especie, porcentaje en base seca.

Componente químico	Arábica (%)	Robusta (%)
Polisacáridos	50,8	56,40
Sacarosa	8,00	4,00
Azúcares reductores	0,10	0,40
Proteínas	9,80	9,50
Aminoácidos	0,50	0,80
Cafeína	1,20	2,20
Trigonelina	1,00	0,70
Lípidos	16,20	10,00
Ácidos alifáticos	1,10	1,20
Ácidos clorogénicos	6,90	10,40
Minerales	4,20	4,40
Compuestos aromáticos	trazas	Trazas

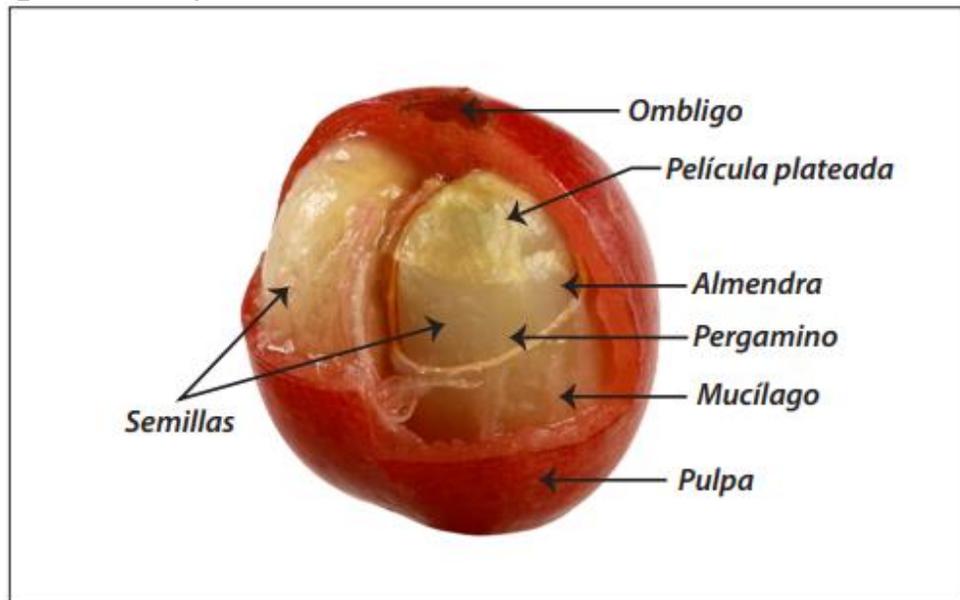
Fuente: Cenicafé, 2011.

Los granos de café poseen más de 2.000 sustancias diferentes (cafeína, minerales, lípidos, trigonelinas, aminoácidos, proteínas, ácidos alifáticos, glicósidos y carbohidratos) de tal manera que el café no es «sólo cafeína» (1,3,7-trimetilxantina), sin embargo, es el ingrediente farmacológicamente más activo. Hoy en día, la cafeína es componente de numerosas preparaciones farmacológicas y medicamentos que incluyen analgésicos y aditivos dietéticos (Echeverri, 2005).

#### 4.1.4. Generalidades del fruto del café

El fruto del café maduro, designado como café cereza, es una baya drupácea formada por el exocarpo (pulpa, epidermis) y por el mesocarpo (mucílago) que es una sustancia rica en azúcares y peptinas, que forma una capa esponjosa de 0,5 mm de espesor promedio, la cual recubre los dos granos enfrentados por su cara plana (**Figura 5**). El color de la epidermis o pulpa varía de verde a rojo, por la aparición de sustancias como la clorofila y las antocianinas, respectivamente, las tonalidades presentes sobre la epidermis del fruto indican directamente el grado de maduración. Las almendras o granos de café, de los cuales se extrae la bebida, se encuentran recubiertos por dos capas, una llamada pergamino (endocarpo), de color amarillo pálido la cual es dura y frágil, y la segunda, llamada película plateada (tegumento seminal) una membrana más fina que la anterior y adherida al grano (albumen). En la base del grano y sobre la cara interna se encuentra el embrión (germen) (Figura 5) (Roa *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2010).

**Figura 5.** Composición de un fruto de café. Fuente: Ramos *et al.*, 2010.



El fruto maduro del café (café cereza), una vez cosechado, es un material

perecedero, por lo cual debe ser transformado rápidamente a café pergamino seco, con humedad en el rango del 10 al 12 %, base húmeda, para preservar su calidad intrínseca (Rodríguez *et al.*, 2015).

#### **4.1.5. El café y las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA)**

Las Buenas Prácticas Agrícolas son promovidas por la OMS (Organización Mundial de la Salud), FDA (Administración de Medicamentos y Alimentos) y FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Tienen como objetivo que los productos y los alimentos para el consumo humano se fabriquen y elaboren en condiciones sanitarias adecuadas, con lo cual se proteja la salud de la población mundial, se reduzca el riesgo asociado al medio ambiente y consideraciones de inocuidad (Cenicafé, 2006; Giraldo *et al.*, 2017).

Las BPA son medidas preventivas que deben aplicarse para la competitividad y sostenibilidad de la caficultura en los mercados nacionales e internacionales; se fundamentan en el conocimiento y la experiencia sobre los procesos de café en la finca, adquiridos a través de la investigación científica, además, son el fundamento de sistemas de aseguramiento de la calidad y la inocuidad del café, como ISO:22000 (Cenicafé, 2006).

El café como un producto agrícola, puede contaminarse y por tanto perder su inocuidad y calidad en los procesos realizados en la finca, durante el transporte nacional e internacional, y también en los procesos industriales. Estas pérdidas, se ven influenciadas por condiciones climáticas, cuidados agronómicos, variedad sembrada, y fitosanitarios del cultivo, así como por los controles efectuados en los procesos de cosecha y postcosecha realizados por los caficultores (Cenicafé, 2006).

En Colombia, el Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente, el Ministerio de Salud y Protección Social, son los responsables de establecer los requisitos para dar cumplimiento a las BPA. Particularmente, para las actividades primarias de producción, relacionadas con preparación, mantenimiento del cultivo y recolección, se deben tener en cuenta requisitos y principios de higiene e inocuidad, que incluyen: manejo del suelo, selección de variedades, calidad y sanidad del material de propagación, fertilizaciones de acuerdo con necesidades del cultivo, rotación de cultivos, uso adecuado del agua, manejo integrado de plagas y enfermedades, manipulación, empaque, transporte y almacenamiento del producto (Cenicafé, 2015; Giraldo *et al.*, 2017).

La entidad pionera en investigaciones relacionadas con BPA para el beneficio del café, es el Centro Nacional de Investigaciones del Café (Cenicafé), el cual ha estudiado prácticas, tecnologías e instalaciones para el procesamiento del café conservando la inocuidad, higiene y calidad de los diferentes estados del grano a lo

largo del proceso de beneficio (Giraldo *et al.*, 2017).

#### 4.1.6. Hongos asociados al café

Dado que el café es una bebida común en todo el mundo, se han desarrollado varios estudios para investigar la presencia de hongos contaminantes y la importancia potencial de las micotoxinas en los granos de café.

Los hongos adquiridos en el campo son *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp., *Fusarium* spp., *Verticillium* spp., además de otros fitopatógenos; requieren generalmente una humedad relativa entre el 90 y 100 % y un contenido de agua en las semillas de 22 a 23 % para crecer, con un amplio rango de temperatura entre 0 y 30°C, aunque algunos pueden desarrollarse a 35°C o más. Otros hongos presentes en los productos almacenados son especies de *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y algunos xerófilos. Los factores que influyen en su desarrollo son el contenido de humedad del substrato, la temperatura, el tiempo, el grado de invasión fúngica antes del almacenamiento y la actividad de insectos y ácaros que facilitan la diseminación. Requieren menor humedad relativa ambiente (70 – 90 %) y contenido de agua en las semillas (15 – 20 %), pero el rango de temperatura es más amplio (0 - 45°C) y pueden crecer a menor concentración de oxígeno (Carrillo, 2003).

En el año 2012, Gamboa encontró en su estudio que los simbiontes más comunes de los granos de café fueron *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. y *Fusarium* spp. *Penicillium* spp. prefirió las semillas secas mientras que *Aspergillus* spp. mostró preferencia por los granos tostados. Ambos géneros están actualmente aislados de sustratos con bajo potencial hídrico, y esto es un problema ya que significa que pueden sobrevivir en productos secos almacenados, como por ejemplo granos de café tostados. *Aspergillus* spp., por otro lado, se encontró en este estudio como endófito común, pero preferentemente como simbiontes epífitos de los granos de café.

De igual forma, se aislaron hongos en las diferentes etapas del beneficio de café cultivado y comercializado en Toledo, Norte de Santander, siendo los de mayor frecuencia, los hongos *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp., y *Fusarium* spp., como lo informó Rojas *et al.* (2015). Adicionalmente, en un estudio realizado por Cajiao *et al.* (2016), identificaron posibles géneros fúngicos como: *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Mucor* spp. y *Rhizopus* spp., siendo los géneros *Aspergillus* spp. y *Fusarium* spp. los aislamientos de alta presencia, obtenidos a lo largo de la etapa del café cereza. Complementariamente, en el 2018, Garrido y colaboradores observaron una amplia variedad de hongos asociados a los granos de café, donde los principales fueron del género *Aspergillus* spp., dentro de los que sobresalen *A. niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus* y *A. clavatum*. Así mismo, se aislaron otros tres tipos de *Aspergillus* spp., sin identificar la especie.

Hongos del género *Fusarium* spp. y *Rhizopus* spp. fueron aislados frecuentemente, aunque en niveles muy bajos.

Todos estos grupos contienen especies bien reconocidas como productoras de toxinas, y su presencia en los granos de café debe considerarse un motivo de preocupación, dado que el café colombiano es comúnmente consumido por millones de personas en todo el mundo (Gamboa, 2012).

#### 4.1.7. Micotoxinas asociadas a granos de café

Las micotoxinas son compuestos ubicuos que difieren mucho en sus propiedades químicas, biológicas y toxicológicas, que actúan como antibióticos favoreciendo la prevalencia del moho frente a otros microorganismos, muchos de los cuales son tóxicos para plantas, animales y en humanos (Carrillo, 2003).

Las micotoxinas se generan por la multiplicación de ciertos hongos, principalmente durante la pre cosecha y almacenamiento de los granos, bajo condiciones favorables para su crecimiento (Rojas *et al.*, 2015). Los factores más importantes asociados con el crecimiento de los hongos y la producción de micotoxinas son la humedad ambiental relativa, humedad del grano, disponibilidad de agua en el grano, temperatura de almacenamiento, ventilación y niveles de oxígeno atmosférico, integridad de la cutícula del grano y presencia de material extraño en el grano (Garrido *et al.*, 2018).

En la Tabla 2, se registran las micotoxinas más relevantes asociadas al café, al igual que los riesgos y sus respectivos mohos productores.

**Tabla 2.** Principales micotoxinas asociadas al café, riesgos y mohos productores.

Micotoxina	Riesgos	Mohos
Aflatoxina B1	Inducción de cáncer hepático, mutagénesis, inmunosupresión, teratogénesis o carcinogénesis	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>
	Carcinogénica y nefrotóxica endémica de los Balcanes, Túnez	<i>Aspergillus alutaceus</i> <i>Aspergillus alliaceus</i>
Ocratoxina A	y Escandinavia; excreción por leche materna, pasa al feto; tumores en tracto urinario	<i>Aspergillus carbonarius</i> <i>Aspergillus melleus</i> <i>Aspergillus niger</i>

---

		<i>Aspergillus sclerotiorum</i> <i>Aspergillus sulphureus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> <i>Penicillium viricatum</i>
Fumonisinias	<p>Lesiones precancerosas y cancerosas en esófago Los principales síndromes que producen son: neurotóxicos (leucoencefalomelacia), nefrotóxicos, edema pulmonar y cerebral, hepatotóxicos y lesiones cardiacas. Los órganos afectados son: el cerebro, pulmón, hígado, riñón y corazón</p> <p>Diarrea, náuseas, vómitos, cefalalgia, dolor abdominal, anorexia, escalofríos, convulsiones, vértigo e inmunotoxicidad</p>	<i>Alternaria alternata spp. lycopersici</i> <i>Fusarium fujikuroi</i> <i>Fusarium nygamai</i> <i>Fusarium proliferatum</i> <i>Fusarium verticilloides</i>
Desoxinivalenol		<i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium poae</i> <i>Fusarium sporotrichioides</i>
Zearalenona	Cambios puberales precoces	<i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium crookwellense</i> <i>Fusarium equiseti (Corda)</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium heterosporum</i>

---

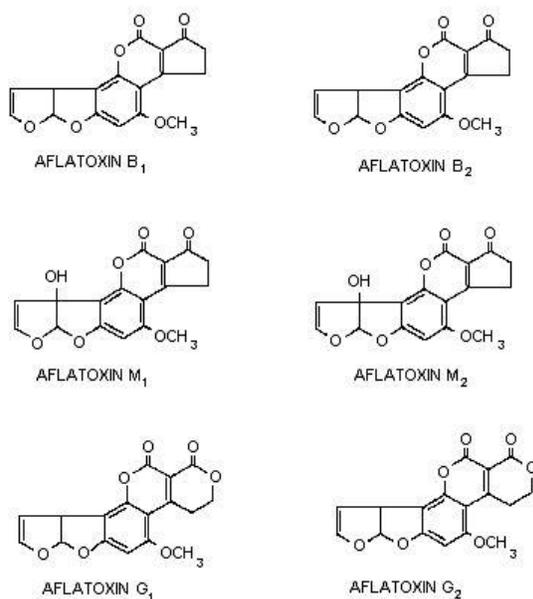
Fuente: Carrillo, 2003; Bogantes *et al.*, 2004; Requena *et al.*, 2005; Carvajal, 2013; Franco *et al.*, 2014; Rojas *et al.*, 2015; Garrido *et al.*, 2018; OMS, 2018.

#### 4.1.7.1. Aflatoxinas

Las aflatoxinas son contaminantes tóxicos producidos por cepas toxigénicas de mohos que se encuentran en alimentos, piensos, heno, vegetación en descomposición y en los granos, que con frecuencia son responsables de las preocupaciones económicas y de salud en muchos países (Ehrlich *et al.*, 2004; Dhakal *et al.*, 2020). Estos metabolitos tóxicos se producen por la acción de los hongos durante la producción, cosecha, almacenamiento y procesamiento de alimentos y piensos. La FDA considera a las aflatoxinas como contaminantes inevitables en los alimentos (Dhakal *et al.*, 2020).

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos por varias especies de *Aspergillus*, incluidas *A. flavus* y *A. pseudotamarii*, que produce aflatoxinas B1 (AFB1) y B2 (AFB2), y se cree que AFB1 es la más potente de todas las aflatoxinas. *A. parasiticus* y *A. nomius*, producen aflatoxinas B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) y G2 (AFG2). La aflatoxina M1 (AFM1) se encuentra en el caldo de fermentación de *A. parasiticus*, pero esta y la aflatoxina M2 también se desarrollan cuando un hígado infectado metaboliza AFB1 y AFB2, es decir, son la forma oxidativa de AFB1 y AFB2. Así mismo, AFM1 puede transmitirse por la leche (**Figura 6**) (Ehrlich *et al.*, 2004; Dhakal *et al.*, 2020).

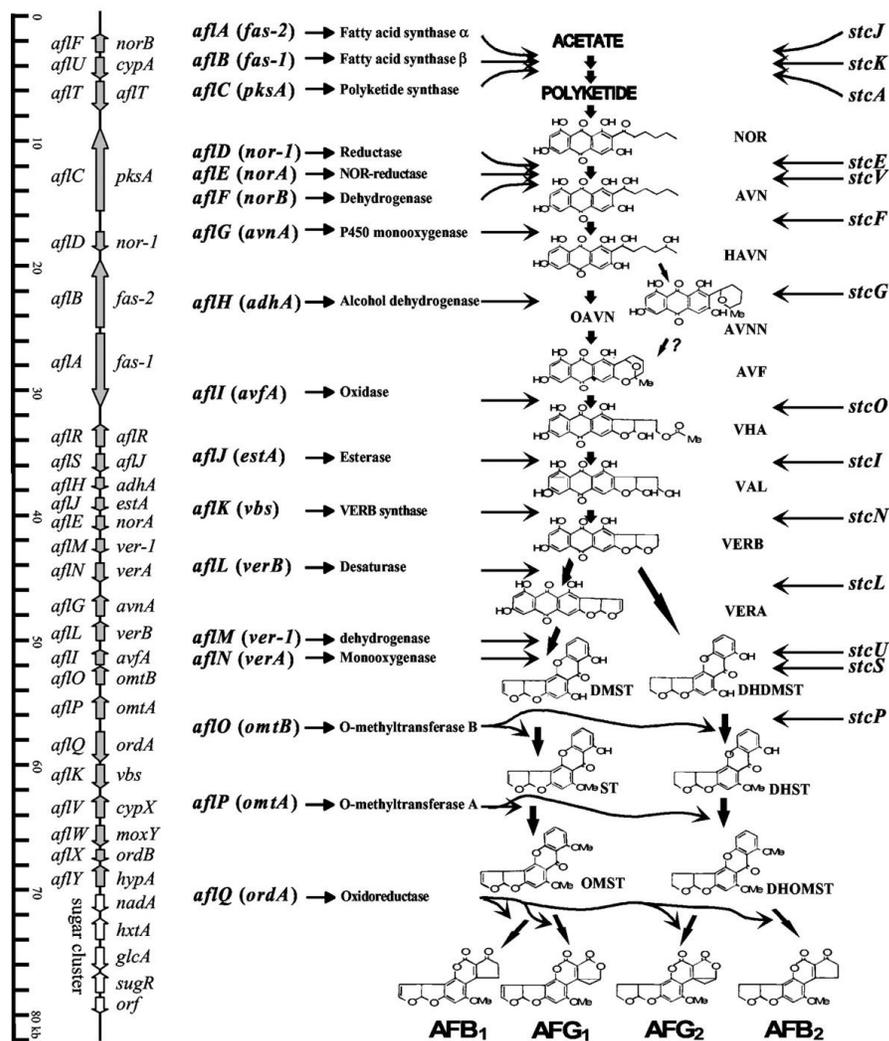
**Figura 6.** Estructura de las aflatoxinas. Fuente: Food-Info, 2017.



En relación a la biosíntesis de las aflatoxinas, el metabolismo primario forma poca o ninguna de estas toxinas. Es decir, cuando el fósforo, el nitrógeno y algunos

elementos traza son limitados el crecimiento primario se reduce. Es en este momento, cuando se acumulan varios metabolitos primarios, entre ellos, piruvato, malato, acetato y aminoácidos que estimulan e inducen la actividad de las enzimas del metabolismo secundario, por la ruta de la biosíntesis de los poliketidos, que a su vez provoca la biosíntesis de las aflatoxinas sobre la biosíntesis de los ácidos grasos en las cepas toxigénicas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Bogantes *et al.*, 2004). Se valora que en la biosíntesis de las aflatoxinas están implicadas entre 23 y 27 reacciones enzimáticas y que, además, se han identificado al menos 15 intermediarios estructuralmente bien definidos. Así mismo, se ha demostrado que de 25 a 30 genes están potencialmente involucrados en la biosíntesis (**Figura 7**), agrupados dentro de una región de ADN de 75 kb del genoma fúngico en el cromosoma III, aproximadamente a 80 kb del telómero (Yu *et al.*, 2004; Yu, 2012).

**Figura 7.** Genes y ruta biosintética de las aflatoxinas. Fuente: Yu *et al.*, 2004.



La Figura 7 muestra que la línea vertical representa el grupo de genes de la ruta biosintética de aflatoxinas de 82 kb y el grupo de genes de utilización de azúcar en *A. parasiticus* y *A. flavus*. Los nombres de los nuevos genes se dan a la izquierda de la línea vertical y los nombres de los genes antiguos se dan a la derecha. Las flechas a lo largo de la línea vertical indican la dirección de la transcripción del gen. La regla del extremo izquierdo indica los tamaños relativos de estos genes en kilobases. Los genes de la vía biosintética ST en *A. nidulans*, se indican a la derecha de la figura. Las flechas de la parte derecha, indican las conexiones de los genes a las enzimas que codifican, de las enzimas a los pasos de bioconversión en los que están involucrados y de los intermedios a los productos en los pasos de bioconversión de aflatoxinas. Abreviaturas: NOR, (ácido norsolorínico); AVN, (averantina); HAVN, (5'-hidroxiaverantina); OAVN, (oxoaverantina); AVNN, (averufanina); AVF, (averufina); VHA, (acetato de hemiacetal versiconal); VAL, (versiconal); VERBO, (versicolorina B); VERA, (versicolorina A); DMST, (demetilsterigmatocistina); DHDMST, (dihidrodemetilsterigmatocistina); ST, (esterigmatocistina); DHST, (dihidroesterigmatocistina); OMST, (O - metilsterigmatocistina) y DHOMST, (dihidro- O -metilsterigmatocistina).

En cuanto a su toxicidad, las aflatoxinas son las micotoxinas más estudiadas y controladas, ya que se consideran toxinas muy potentes, que se relacionan con la génesis del cáncer, mutaciones puntuales y múltiples alteraciones en el desarrollo fetal. Investigaciones realizadas en animales, demuestran que las aflatoxinas pueden producir toxicidad aguda y crónica. Los efectos agudos incluyen necrosis hepática, nefritis, y congestión pulmonar. Los efectos crónicos incluyen daño celular, carcinogenicidad, teratogenicidad y mutagenicidad en modelos animales (Bogantes, 2004).

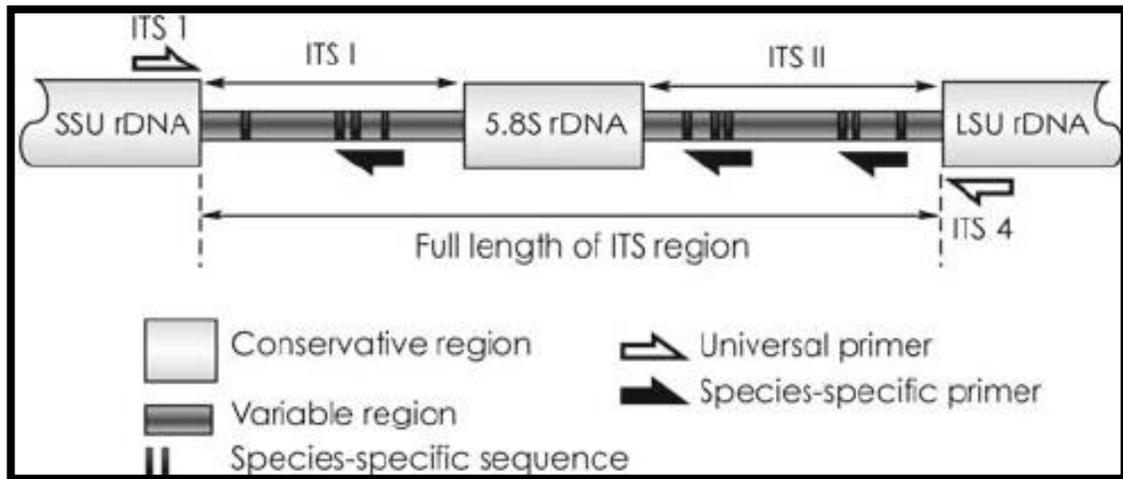
#### **4.1.8. Biología molecular aplicada a la taxonomía de hongos filamentosos**

La aplicación de técnicas de Biología Molecular, especialmente el análisis de secuencias de nucleótidos del ADN y los estudios filogenéticos derivados de ellos, han cambiado mucho los conceptos tradicionales de la taxonomía fúngica. El uso de las distintas herramientas de diagnóstico molecular constituye una alternativa, cada vez más indispensable, para la correcta y rápida identificación de los mohos filamentosos (Mercedes, 2011).

Con la adopción actual del reconocimiento consolidado de especies donde los caracteres moleculares juegan un papel predominante, la secuenciación del ADN y el análisis filogenético se han convertido en el estándar de oro para la identificación precisa de hongos (Tsang *et al.*, 2018). Cabe destacar que, existe una amplia lista de genes utilizados para estudios de identificación y/o filogenia de los hongos, siendo los genes que codifican para los ARN ribosómicos (ADNr) los más utilizados para dichos estudios, estos genes se encuentran distribuidos formando tándems (18S-5.8S-28S), separados por regiones no codificantes denominadas espaciador

interno transcrito (ITS) (**Figura 8**) y espaciador intergénico (IGS) (Mercedes, 2011). Sin embargo, las regiones ITS no siempre proporcionan una buena resolución para especies filogenéticamente próximas, y el análisis de más de un gen, puede incrementar la fiabilidad de los resultados, como es el caso de el gen de  $\beta$ -tubulina (Garzón, 2013; Acevedo, 2013).

**Figura 8.** Diagrama esquemático de la región del espaciador transcrito interno (ITS) entre el rDNA de subunidad pequeña (SSU) y el rDNA de subunidad grande (LSU), que incluye el rDNA de ITS I, ITS II y 5.8S. Fuente: Horisawa et al., 2009



Los ITS, generalmente se corresponden con secuencias altamente conservadas entre las especies fúngicas filogenéticamente próximas, en tanto que los IGS presentan una variabilidad muy elevada, incluso a nivel intraespecífico. Otra característica que determina la amplia utilización de estos genes, es el hecho de encontrarse en un número elevado de copias (hasta 200 copias), facilitando su amplificación mediante la PCR (Mercedes, 2011).

## 4.2. BASES LEGALES

En Colombia, existen normas que reglamentan los requisitos que debe cumplir el café tanto en su etapa de producción como en el producto final, dicha reglamentación busca un café inocuo y de calidad, buscando suplir las necesidades del mercado actual.

### **Leyes:**

**Ley 76 de 1927.** Sobre protección y defensa del café.

**Ley 76 de 1931.** Provee el fomento de la industria cafetera.

**Ley 11 de 1972.** Por la cual se deroga el impuesto de exportación de café y se dictan otras disposiciones.

### **Decretos:**

**Decreto 2078 de 1940.** Se dictan medidas relacionadas con la industria del café.

### **Resoluciones:**

**Resolución 030021 de 2017 Ministerio de Agricultura.** Por medio del cual se establecen los requisitos para la certificación en Buenas Prácticas Agrícolas en producción primaria de vegetales y otras especies para consumo humano.

**Resolución 355 de 2002 - Ministerio de Comercio Exterior.** Requisitos relacionados con la Inscripción en el Registro Nacional de Exportadores de Café.

**Resolución 01 de 2009 del Comité Nacional de Cafeteros.** Por medio de la cual se adopta la reglamentación para el control y la administración del registro de exportadores de Café de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia en su condición de administradora del Fondo Nacional del Café.

**Resolución 02 de 2016 del Comité Nacional de Cafeteros.** Por la cual se actualizan y unifican las normas de calidad del café verde en almendra para exportación.

### **Normas Técnicas Colombianas:**

**NTC 3314. 1992.** Café y sus productos. Vocabulario. Términos y definiciones. Define los términos más comúnmente utilizados en relación con el café y sus productos.

**NTC 3534. 2007.** Café tostado, en grano o molido. Esta norma establece los requisitos y los métodos de ensayo que debe cumplir el café tostado, en grano o molido.

### 4.3. ANTECEDENTES

#### 4.3.1. A nivel internacional

La investigación realizada por Garrido *et al.* (2018), consistió en identificar la microbiota asociada a granos de café (*Coffea* spp.) recolectados en Chiapas, México, así como la incidencia y niveles de contaminación por aflatoxinas totales y ocratoxina. Para ello, realizaron recorridos por las principales zonas productoras y de acopio en siete regiones de Chiapa, identificando los hongos a nivel de género o especie y las micotoxinas mediante ELISA. Lograron identificar 25 géneros y especies de hongos, siendo *Aspergillus* spp. el género prevalente, seguido de *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Curvularia* spp., *Rhizopus* spp., *Helminthosporium* spp. y *Pestalotia* spp. Se identificó a *A. niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus* y *A. clavatum*. Respecto a micotoxinas, hubo diferencias según tipo de grano y origen de la muestra. Las aflatoxinas totales no se encontraron en niveles altos, pero para ocratoxina A, se registraron niveles altos. Como conclusión, se obtuvo que la incidencia de hongos y la contaminación con micotoxinas es variable, dependiendo del tipo de grano de café, región y año de muestreo.

Jiménez *et al.* (2017), plantearon como objetivo aislar e identificar los hongos potencialmente micotoxigénicos presentes en cerezas de café variedad robusta y granos secos (secado natural) colectados en la región de Huatusco, Veracruz, a 700 m sobre el nivel del mar. Los resultados obtenidos en este estudio consistieron en el aislamiento de un total de 98 cepas, de las cuales 35 presentaron fluorescencia en agar coco. Los principales géneros encontrados fueron: *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Acremonium* spp., *Trichoderma* spp., *Phomopsis* spp., *Bjerkandera* spp. Es importante mencionar que dentro de las cepas identificadas se encuentran aquellos géneros productores de micotoxinas, como la ocratoxina A y la aflatoxina B1, además de patulina, fumonisina y zearalenona. Finalmente, a manera de conclusión se propuso que la cereza y grano de café presentaron una gran diversidad fúngica, aunque sólo el 35 % de las cepas son potencialmente productoras de micotoxinas representando un riesgo importante para la salud del consumidor.

Un estudio realizado por Geremew y colaboradores en el 2016 plantearon como objetivo tipificar los niveles de contaminación por hongos y micotoxinas en el café etíope consumido por la comunidad local. Para esto, recolectaron muestras de café de seis distritos principales de cultivo de café en la zona de Jimma del estado regional de Oromiya en Etiopía. Como resultado obtuvieron que la incidencia de *Aspergillus* spp. fue del 79 %, de *Fusarium* spp. el 8 % y de *Penicillium* spp. fue del 5 %, siendo los géneros toxigénicos predominantes. Las especies productoras de OTA, como *A. westerdijkiae*, *A. ochraceus* y *A. steyniise* fueron identificados por primera vez en Etiopía y se demostró que eran las especies predominantes, mientras que las especies de *Aspergillus* spp. productoras de aflatoxinas se presentaron de manera escasa. Se concluyó que los aislados de *Aspergillus*

*westerdijkiae* eran claramente los productores más potentes de OTA.

Luna *et al.* (2010) encontraron en su estudio que el 100 % de las muestras analizadas de café verde, se encontraban contaminadas con *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. productores de OTA, y el 100 % de las muestras de café analizadas presentaron concentraciones de OTA por debajo de los límites permitidos por la normatividad mexicana (1,2 a 7,7 ppb). Además, el trabajo realizado por ellos presenta una metodología combinada de detección de OTA comercial (inmunoafinidad), con la valoración de la capacidad productora de OTA por cepas nativas de *Aspergillus* en tres almacenes de café de una región productora de México.

La investigación realizada por Noonim *et al.* (2008), consistió en el aislamiento, identificación y potencial toxigénico de especies de *Aspergillus* spp. productoras de ocratoxina. A partir de granos de café cultivados en dos regiones de Tailandia, durante el 2006 y 2007, recolectaron 32 muestras de granos de café secos tailandeses (*Coffea arabica*) y 32 muestras de granos de café secos de Tailandia (*Coffea canephora* var. *Robusta*). Las muestras de granos de café arábico del norte tuvieron un promedio de 78 % de incidencia de colonización con *Aspergillus* spp. de la sección *Circumdati* con *Aspergillus westerdijkiae* y *A. melleus* como especies predominantes. *Aspergillus* spp. de la sección *Nigri* se encontraron en el 75 % de las muestras, mientras que *A. ochraceus* no se detectó. Los granos de café robusta del sur estaban contaminados en un 98 – 100 % predominantemente con *A. carbonarius* y *A. niger*. *A. westerdijkiae* sólo se encontró en una muestra. Se concluyó que la diversidad de la población de hongos probablemente se correlacionó con el origen geográfico del café, el cultivo de café y el método de procesamiento.

Suárez *et al.* (2004) reportó que los niveles de contaminación encontrados en los procesos de café fueron 80 %, 72 % y 92 %, para el café pergamino, café cereza seco y café verde, respectivamente. *Aspergillus ochraceus* fue aislado de los tres procesos representando un porcentaje de 6,6 %, 8,3 % y 3,3 % de los aislamientos totales, y *Aspergillus niger* con un porcentaje de 15 %, 13 % y 25 % de las cepas aisladas, respectivamente. El potencial toxigénico de cinco cepas de *A. ochraceus* y dos de *A. niger* se probó en medio FDA y medio de café usando la técnica de HPLC. Los resultados arrojaron que no hubo diferencia entre los procesos estudiados en términos de aislamiento y ocurrencia de hongos ocratoxigénicos.

Urbano y colaboradores, en el año 2001 encontraron que el 100 % de los granos de café estudiados estaban contaminados por mohos, de los cuales, el 33,2 % pertenecían al género *Aspergillus* spp. y de estos el 10,3 % y 22,9 % correspondían a *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus niger*, respectivamente. La suficiencia en producir ocratoxina por parte de estas dos especies, fue determinada en un total de 155 cepas, mediante el método del tampón de agar y el de extracción con cloroformo dando resultados positivos para el 88,1 % de las cepas de *A. ochraceus*

y el 11,5 % de las cepas de *A. niger*. El análisis de OTA en las muestras de café de terraza y granero mostró que, independientemente del cultivar, el año de cosecha o la región de producción, todas las muestras analizadas, excepto una, mostraron niveles de micotoxinas por debajo del límite sugerido por el Mercado Común Europeo (8 µg/kg), lo que indica que el problema es restringido y se debe a fallas severas en las prácticas de cosecha y almacenamiento.

#### **4.3.2. A nivel nacional**

Para el año 2012, Gamboa, en su investigación tomó muestras de 5.000 granos de café en diferentes estadios de su procesamiento, encontrando que taxones fúngicos potencialmente tóxicos, tales como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp. El estudio incluyó muestras desde el fruto en el árbol hasta café tostado y empacado listo para la venta en supermercados. Los resultados muestran que la distribución de estos hongos no es aleatoria entre los diferentes pasos del procesamiento del café, lo que significa que algunos pasos son más vulnerables a la infección con algunos hongos que otros. Y discutió sobre la conveniencia de establecer un programa dedicado a la detección de hongos y/o micotoxinas en productos colombianos, especialmente el café.

#### **4.3.3. A nivel regional**

En el 2016, Cajiao y colaboradores, realizaron un estudio en donde se recolectaron muestras de café cereza procedentes de diferentes municipios productores de Norte de Santander y posteriormente en el laboratorio se aislaron y caracterizaron fenotípicamente los siguientes agentes fúngicos del grano de café: *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Mucor* spp. y *Rhizopus* spp. con ayuda de claves taxonómicas. Los hongos que presentaron una alta incidencia fueron *Aspergillus* spp. y *Fusarium* spp. Entre las tres variables fisicoquímicas analizadas en el café cereza (pH, actividad de agua, % de humedad) se puede afirmar con certeza que la actividad de agua y el porcentaje de humedad influyen directamente en el número y tipo de aislamientos fúngicos obtenidos.

Rojas *et al.*, en el 2015, en su estudio recolectaron muestras de café de las diferentes etapas de producción: (Café cereza, pergamino, trillado, tostado y molido) en el municipio de Toledo, Norte de Santander - Colombia. Para la observación del crecimiento fúngico, los granos se sembraron en Agar PDA (Papa dextrosa Agar) y Sabouraud, incubándose a 25°C por 3 días. Se encontró la presencia de géneros tales como *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp. De otro lado, se evaluó la calidad fúngica del café molido, mediante el recuento de hongos y levaduras en Agar Sabouraud, se incubó a 25°C por 5 a 7 días, encontrando que el producto final (café molido) cumple con los parámetros establecidos en la NTC 3534 – 2007 Café tostado, en grano o molido. A su vez, al café en sus diferentes etapas se le determinó variables fisicoquímicas (pH, Aw, porcentaje de humedad), encontrando que a medida que avanza el procesamiento del café algunos parámetros

fisicoquímicos se ven afectados como es el caso de la  $A_w$ , a diferencia de otras variables como pH que no presentó diferencias significativas en cada una de ellas. Las variables fisicoquímicas facilitan el desarrollo de hongos en todo el proceso.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. PROCESO DE MUESTREO

Se recolectaron un total de 44 muestras de café, en la etapa de producción denominada cereza en 8 municipios del departamento Norte de Santander (Arboledas, Bochalema, Chinácota, Cucutilla, Durania, Ragonvalia, Salazar y Toledo) ubicados entre 845 msnm y 1642 msnm; las muestras fueron tomadas directamente del cafeto o arbusto. La muestra estaba compuesta por café cereza maduro y verde (aproximadamente 300 g). Todas las muestras fueron transportadas y almacenadas en cadena de frío y bajo condiciones de asepsia hasta su procesamiento.

### 5.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DIRIGIDO AL AISLAMIENTO FÚNGICO

El procesamiento microbiológico fue desarrollado atendiendo a las recomendaciones dadas por Ayala (2017), con algunas modificaciones; dicho procesamiento consistió en la siembra directa de granos de café (4 granos) en cajas de Petri con agar PDA (Papa Dextrosa Agar), las cuales fueron incubadas a una temperatura de 25°C por 5 días. Dichas modificaciones consistieron en no llevar a cabo la desinfección de los granos ya que el objetivo era aislar el total de las morfoespecies presentadas y no limitar el crecimiento de alguna de ellas. Así mismo, el tiempo de incubación se modificó, ya que este dependía del desarrollo del hongo. Posteriormente, se realizaron nuevos repiques con el objetivo de aislar todas las morfoespecies presentadas en cada muestra. Una vez se contó con las cepas en forma axénica, se procedió a conservar bajo el término de criopreservación (glicerol al 40 %) manteniendo las cepas bajo congelación a -30°C para usos posteriores (Pinzón *et al.*, 2009).

### 5.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS FÚNGICAS AISLADAS

Todas las cepas obtenidas del aislamiento fúngico fueron caracterizadas macroscópica y microscópicamente siguiendo las taxonomías y nomenclaturas dadas por Pitt y Hocking (2009); Samson *et al.* (2014) Visagie *et al.* (2014 a) y Visagie *et al.* (2014 b); en relación a la identificación de hongos de los géneros *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.* Para tal fin, los aislados fueron sembrados en los medios de cultivo MEA (Samson *et al.*, 2010) (25°C) y CYA (Pitt, 1979) (30°C) para cepas con morfoespecie típica de *Aspergillus spp.* y en el medio de cultivo MEA (25°C) para las morfoespecies peculiar de *Penicillium spp.*, por un tiempo de 7 días (**Anexo 2**).

Para la identificación de los aislados con crecimiento característico de *Fusarium* spp., se tomó como punto de partida, las taxonomías y nomenclaturas propuestas por Summerell *et al.* (2003) y Leslie *et al.* (2006). Para ello, las cepas típicas fueron sembradas en medios de cultivo como CLA (25°C) y SNA (25°C) descritos por Summerell *et al.* (2003), Leslie *et al.* (2006), Gagkaeva (2008) y Pérez (2014); siendo su periodo de incubación de 7 días (**Anexo 3**).

Con relación a los hongos con crecimiento atípico, su caracterización se llevó a cabo teniendo en cuenta la taxonomía y nomenclatura ofrecida por Barnett & Hunter (1998) y Carrillo (2003). Para esta finalidad, las cepas fueron sembradas en agar MEA (25°C) por un tiempo de incubación de 5 a 7 días.

Pasado el tiempo de incubación, se realizó la medición del diámetro de las colonias con un pie de rey marca León, además de la descripción macroscópica del reverso y anverso de las mismas, y para la de terminación del color se utilizó como guía la tabla de colores de Munsell (2000).

En cuanto a la descripción microscópica, se realizó de acuerdo al método simple descrito por Harris (2000), en donde se tomó un trozo de cinta adhesiva, la cual entró en contacto con el cultivo fúngico y posteriormente se posó sobre un portaobjetos que contenía azul de algodón de lactofenol para finalizar la preparación del montaje y observar al microscopio óptico.

#### **5.4. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO**

El procesamiento fisicoquímico fue llevado a cabo a cada una de las muestras y los análisis realizados fueron:

Actividad del agua (Aw): se utilizó el HygroPalm HP23-AWA marca Rotronic, introduciendo de 2 - 4 granos de café en el equipo.

pH: para la determinación de esta variable, se tomaron entre 4 y 5 gramos de muestra disuelta en agua destilada, y usando un pHmetro marca WTW Multi 3430 se tomaron las respectivas lecturas.

Porcentaje de humedad: se determinó el porcentaje de humedad mediante el uso de una balanza de humedad marca Precisa modelo MX 60, en donde se pesó aproximadamente 2 g de muestra, la cual fue sometida a una temperatura de 105°C hasta llevar a peso constante.

Cada determinación se realizó por duplicado y se tabuló en Microsoft Excel para su posterior tratamiento y análisis estadístico mediante el software STATGRAPHICS centurión XV (**Anexo 1**).

## 5.5. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS EN MEDIOS DE CULTIVO

### 5.5.1. Método de vapores amoniacales

Se utilizó el total de las cepas identificadas fenotípicamente como *Aspergillus* spp. Así mismo, el método descrito por Saito y Machida (1999) fue puesto a consideración, con algunas modificaciones. Cada cepa fue inoculada en el centro del medio de cultivo (PDA, YES, ALC) (**Anexo 4**) e incubadas a 25°C por un tiempo de 7 días. Posteriormente, las placas fueron puestas boca abajo y se adicionó 0,2 ml de solución de amoníaco al 25 % en la tapa de la placa, por último, se incubaron las placas nuevamente a temperaturas de 25°C por 6 días, con una revisión periódica.

### 5.5.2. Método de emisión de fluorescencia

Los aislamientos característicos de *Aspergillus* spp. se sembraron en 3 diferentes medios de cultivo con la finalidad de observar cuál de ellos proporciona mejores resultados; dichos medios fueron agar leche de coco (ALC) (**Anexo 4**), agar extracto de coco (AEC) y agar coco rallado (ACR) (**Anexo 5**); dichos medios inoculados, se incubaron a una temperatura de 25°C por un tiempo de 15 días. Consecuentemente, el reverso de ALC, AEC y ACR se expuso a longitudes de onda de luz UV (365 nm) en un ambiente oscuro con el fin de detectar las cepas aflatoxigénicas (Lin *et al.*, 1976; Dyer *et al.*, 1994; Heenan *et al.*, 1998).

## 5.6. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

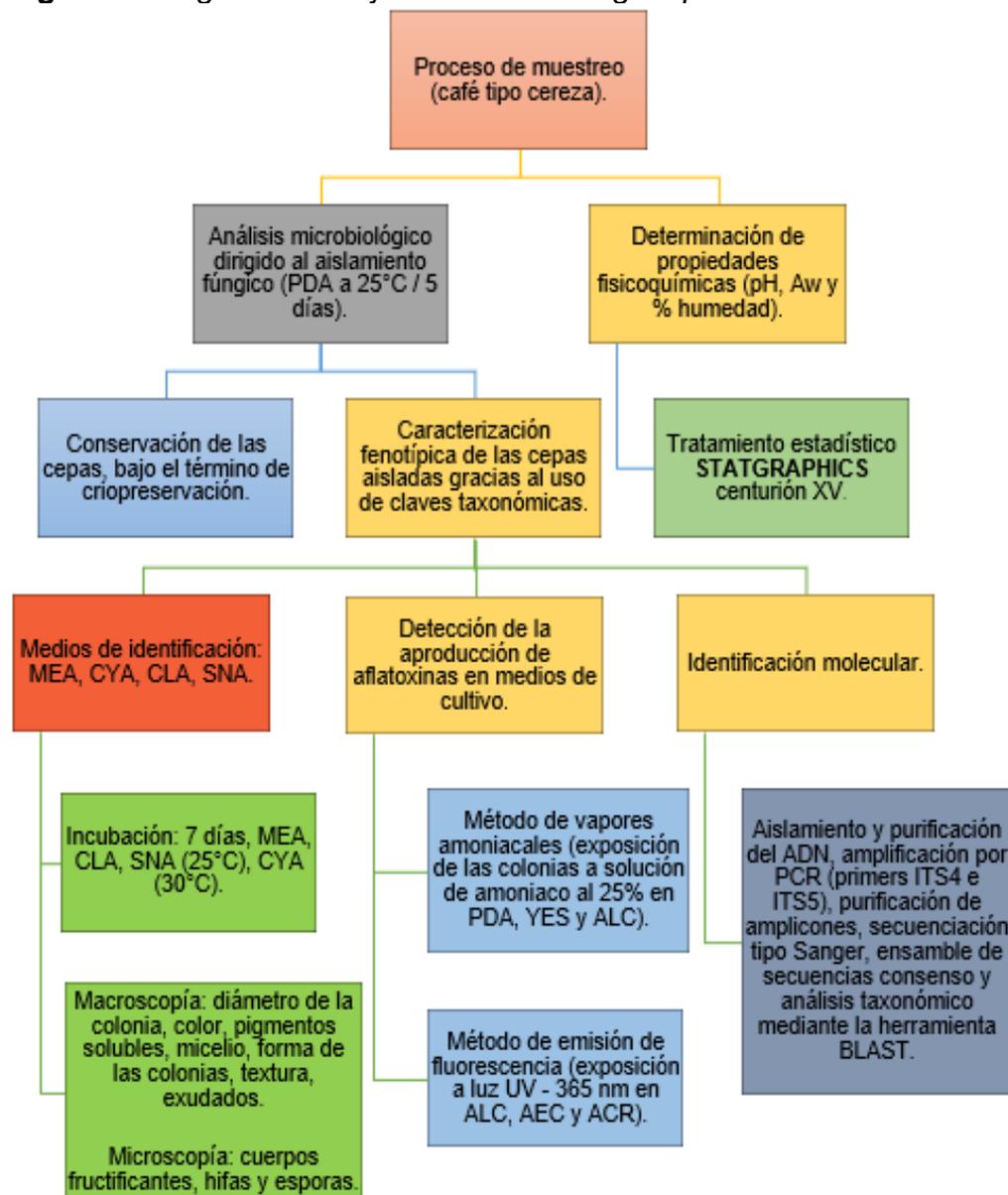
De las cepas aisladas, cuatro de ellas fueron seleccionadas para ser identificadas molecularmente, teniendo en cuenta las características fenotípicas y con el fin de identificar cepas diferentes, correspondientes a los géneros que presentaron mayor presencia. El procedimiento llevado a cabo se menciona a continuación según las especificaciones de CorpoGen (2019):

Aislamiento y purificación del DNA. Amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction) con los iniciadores ITS4 e ITS5 de la región genética denominada ITS (Internal Transcribed Spacer) del DNA ribosomal fúngico. Posteriormente, se llevó a cabo la purificación de los fragmentos de PCR y secuenciación mediante método Sanger con los iniciadores ITS4 e ITS5. Seguidamente, se realizó la limpieza y ensamblaje de las secuencias para obtener la secuencia problema. Luego se efectuó el análisis taxonómico de la secuencia mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), del NCBI (National Center for Biotechnology Information), comparando contra la colección de nucleótidos (nr/nt), del mismo NCBI, que comprende las bases de datos: GenBank, EMBL (European Molecular Biology Laboratory), DDBJ (DNA Data Bank of Japan), PDB (Protein Data Bank) y

RefSeq. Así mismo, se ejerció el análisis taxonómico de la secuencia mediante la herramienta BLAST comparando contra la base de datos de UNITE. Además, se hizo un análisis taxonómico de la secuencia mediante la herramienta “Classifier”, alojada en el sitio Web de RDP (Ribosomal Data Project), comparando contra la base de datos “Warcup Fungal ITS trainset 2”. Finalmente, se determinó la clasificación taxonómica de la secuencia consenso.

En la Figura 9 se presenta la metodología, en forma general aplicada durante el estudio.

**Figura 9.** Diagrama de flujo de la metodología aplicada. Fuente: Autor



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El café se ha visto influenciado por factores que alteran tanto la calidad del mismo, como la seguridad e inocuidad. La contaminación por mohos filamentosos es uno de los principales responsables, ya que su presencia desencadena lo mencionado anteriormente, además, pueden generar productos de su metabolismo que pueden ser tóxicos, como lo son las micotoxinas y generar problemas de salud. Es aquí donde radica la importancia de conocer los factores intrínsecos como extrínsecos implicados en el desarrollo de los mohos y las consecuencias que conllevan. Conocer la microbiota fúngica presente en los granos de café, se muestra como una ventaja a la hora de dar soluciones a los problemas que conlleva su disposición en temas de seguridad, inocuidad y regulación, por tal razón, la identificación fenotípica y genotípica es indispensable cuando de este tema se trata.

Por consiguiente, a continuación, se dan a conocer los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo de esta investigación.

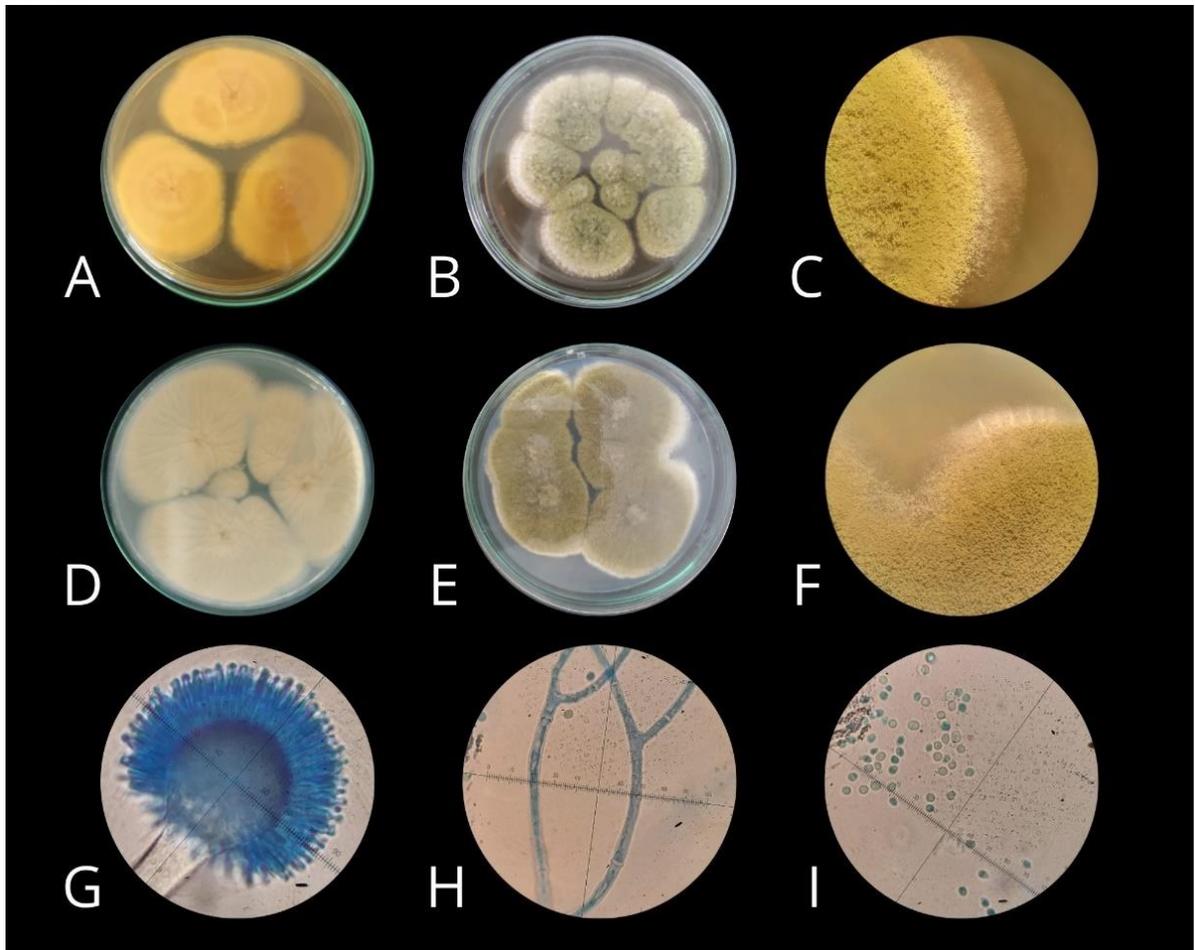
### 6.1. CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE LAS CEPAS AISLADAS

Atendiendo al objetivo principal de esta investigación, se realizó la caracterización de las cepas aisladas de los municipios muestreados; dicha caracterización se llegó hasta un nivel de género y de esta forma se determinó la microbiota implícita en el café que se cultiva en el departamento Norte de Santander. Se determinaron las características en el reverso de la placa de Petri como color, diámetro de las colonias y generación de pigmentos. En cuanto al anverso, se observaron características, tales como: color de las colonias, forma de las colonias, textura y generación de exudados. Ahora bien, la microscopía consistió en registrar características como cuerpo fructificante (estructuras reproductoras), hifas y esporas. La caracterización fenotípica de estas cepas, es de gran importancia, ya que sirve como apoyo a la hora de identificar de manera molecular las cepas de los géneros más predominantes de esta investigación, tal y como se muestra en la sesión 6.4, ya que los registros de estas características que son de la Microbiología tradicional, van ligados a la identificación molecular.

Las cepas X007-2, X013-4, X025-2, X006, y X029-2, exhibieron características macroscópicas similares en medios de cultivo MEA y CYA. En el medio de cultivo MEA presentaron las siguientes características: **Reverso:** colonia de color beige - amarillo, con diámetro de 39,40 mm, además de no presentar pigmentos. **Anverso:** colonia de color entre verde oliva a amarillo oliva, con borde blanco, sin producción de exudados, con micelio blanco a penas visibles, colonias surcadas y con textura pulverulenta o polvosa (**Figura 10: A, B y C**). En el medio de cultivo CYA contiene

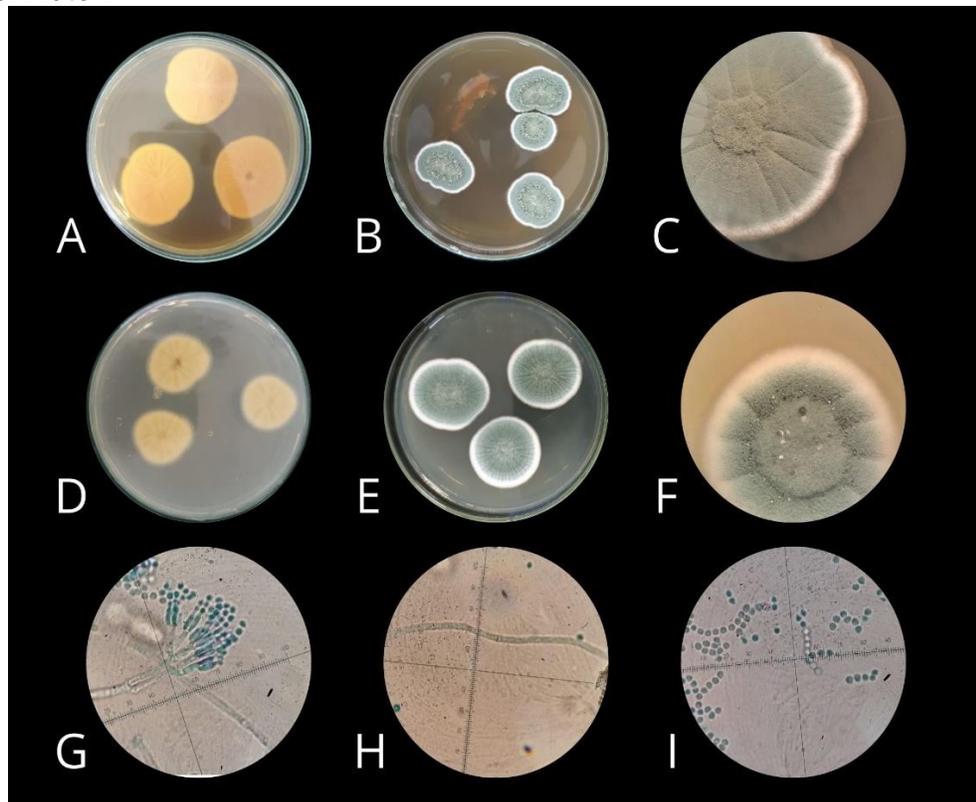
características como: **Reverso:** colonias de color beige, con diámetros de 51,51 mm y sin generación de pigmentos. **Anverso:** las colonias de color verde oliva, con bordes blancos, con micelio blanco en la mitad de las colonias siendo a penas visible, las colonias son surcadas, sin exudados y con textura polvosa (**Figura 10: D, E y F**). En cuanto a las características microscópicas, presentan conidióforos de pared delgada hialinos, cabezuelas radiadas biseriadas con diámetros de 75  $\mu\text{m}$ , vesículas esféricas con diámetros de 40  $\mu\text{m}$ , métulas con tamaños de 15  $\mu\text{m}$  aproximadamente, ocupando prácticamente toda la superficie de la vesícula y conidios globosos o elipsoidales con tamaños de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro hialinos o color verde, finalmente, hifas hialinas septadas gruesas con 5  $\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 10: G, H, I**). Según la descripción macroscópica y microscópica las cepas pertenecen al género *Aspergillus*.

**Figura 10.** Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos X006, X007-2, X013-4, X025-2, X029-2 en MEA (A: reverso, B: anverso, C: textura); CYA (D: reverso y E: anverso, F: textura); G: conidióforo, H: hifas e I: esporas. Fuente: Autor.



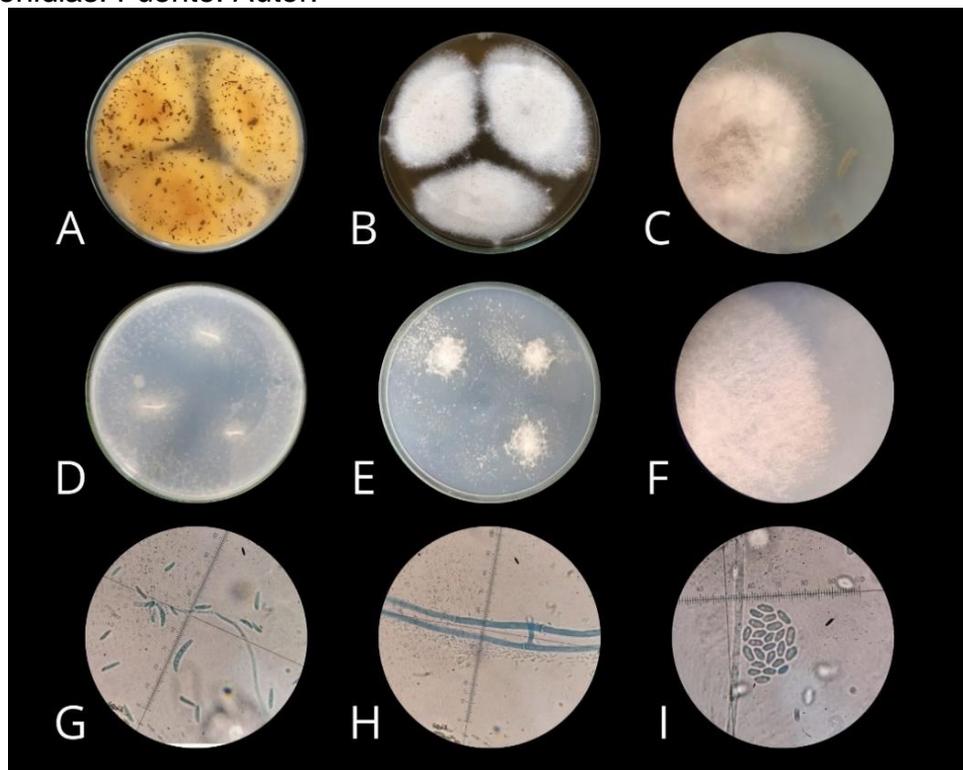
Las cepas X004-2, X008-2, X014, X018, X026-2 y X030, exhibieron características macroscópicas similares en medios de cultivo MEA y CYA. En el medio de cultivo MEA presentaron las siguientes características: **Reverso:** colonia de color amarillo, con diámetro de 32 mm, además de no presentar pigmentos. **Anverso:** colonia de color entre gris oliva y azul verdoso, con bordes blancos, sin producción de exudados, sin micelio, colonias surcadas y con textura aterciopelada (**Figura 11: A, B y C**). En el medio de cultivo CYA contiene características como: **Reverso:** colonias de color amarillo crema, con diámetros de 24,53 mm y sin generación de pigmentos. **Anverso:** las colonias de color gris oliva, con bordes blancos, sin micelio, las colonias son surcadas, con poca producción de exudados sin color y con textura aterciopelada (**Figura 11: D, E y F**). En cuanto a las características microscópicas, presentan conidióforo quaterverticilado hialino con tamaño aproximado de 60  $\mu\text{m}$ , las ramas o branch con tamaño de 25  $\mu\text{m}$ , métulas de 10  $\mu\text{m}$ , fiálides de 7 - 8  $\mu\text{m}$ , y conidios (esporas) redondas de pared gruesa con diámetros de 4 - 5  $\mu\text{m}$  de color verde oliva, finalmente, hifas hialinas septadas gruesas con 3  $\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 11: G, H, I**). Según la descripción macroscópica y microscópica las cepas pertenecen al género *Penicillium*.

**Figura 11.** Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos X004-2, X008-2, X014, X018, X026-2 y X030 en MEA (A: reverso, B: anverso, C: textura); CYA (D: reverso y E: anverso, F: textua); G: conidióforo, H: hifas e I: esporas. Fuente: Autor.



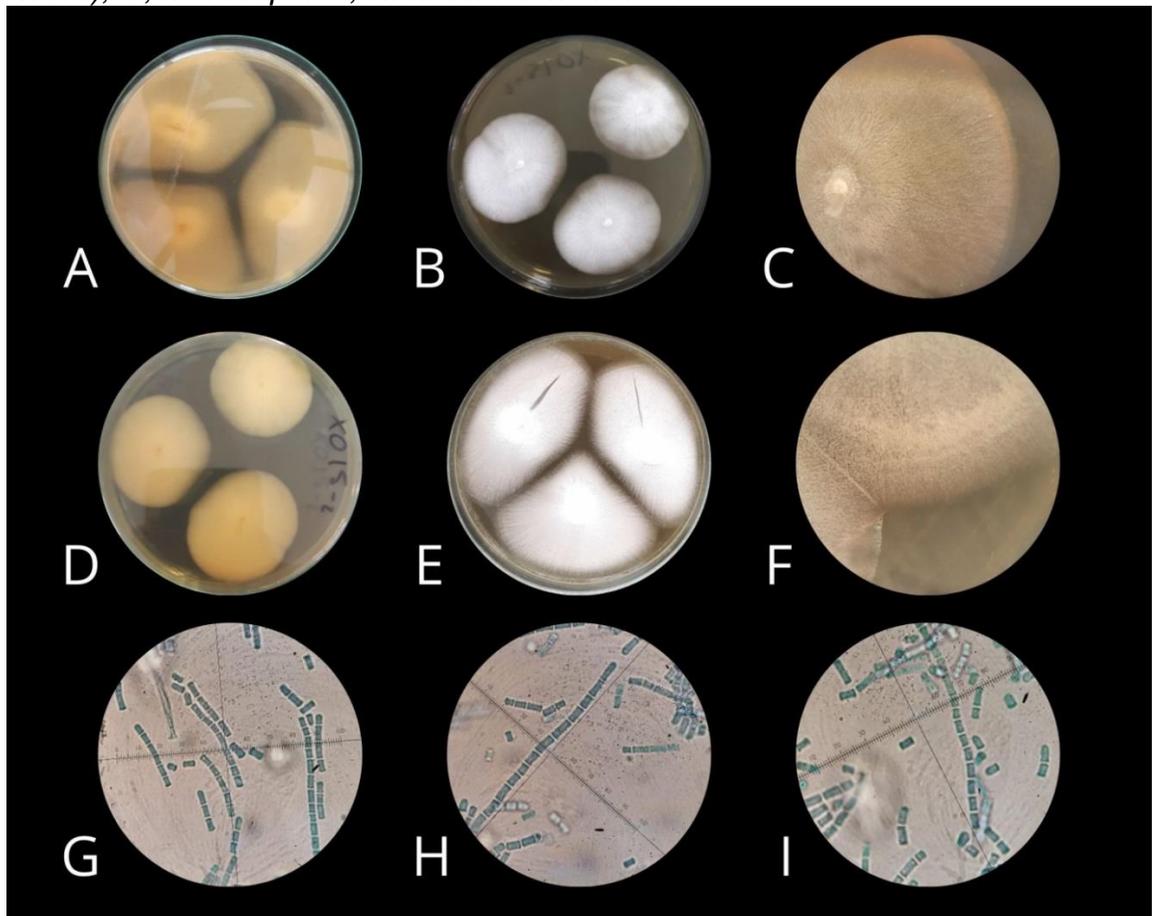
Las cepas X004-3, X008-1, X020, X037, X038 y X042, exhibieron características macroscópicas similares en medios de cultivo CLA y SNA. En el medio de cultivo CLA presentaron las siguientes características: **Reverso:** colonia de color amarillo, con diámetro de 54,23 mm, y poca producción de pigmento púrpura. **Anverso:** colonia de color blanca, crecimiento rápido y abundante micelio, sin producción de exudados, colonias con textura algodonosa (**Figura 12: A, B y C**). En el medio de cultivo SNA contiene características como: **Reverso:** colonias de color blanco, con diámetros de 37,64 mm y sin generación de pigmentos. **Anverso:** las colonias de color blanco, crecimiento lento, con micelio moderado, sin producción de exudados y textura algodonosa (**Figura 12: D, E y F**). En cuanto a las características microscópicas, presentan macroconidias hialinas con tamaños de 20  $\mu\text{m}$ , presenta dos septos y con forma curva, las células apicales tienen forma de roma y las basales apenas con muescas y se forman a partir de las monofiálides. Con respecto a las microconidias tienen formas ovoides con tamaños de 5  $\mu\text{m}$ , forman cabezas falsas con un número aproximado de 25 microconidias. No se presentan clamidosporas, mesoconidias, esporodoquia, esclerotia ni estroma. Finalmente, presenta hifas hialinas septadas con 4  $\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 12: G, H, I**). Según la descripción macroscópica y microscópica las cepas pertenecen al género *Fusarium*.

**Figura 12.** Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos X004-3, X008-1, X020, X037, X038 y X042 en CLA (A: reverso, B: anverso, C: textura); SNA (D: reverso y E: anverso, F: textrua); G: macroconidias, H: hifas e I: microconidias. Fuente: Autor.



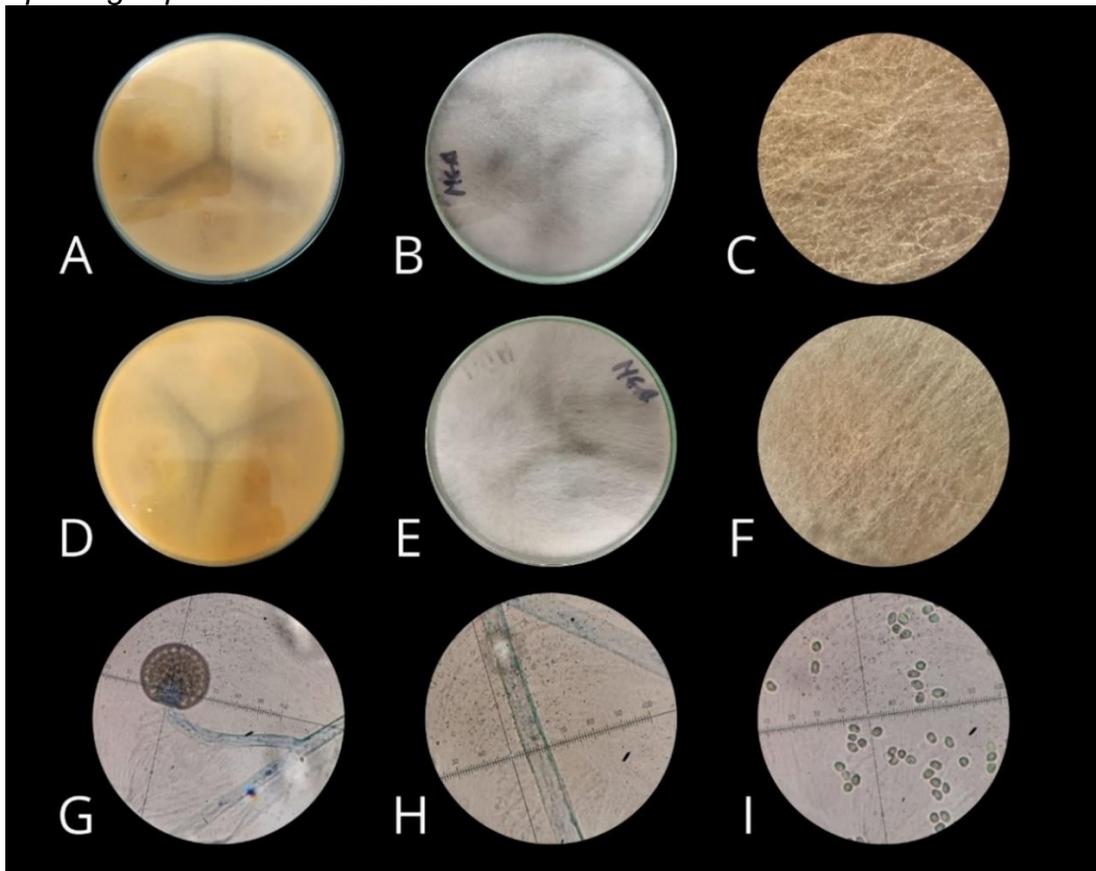
Las cepas X003, X13-3, X019-2, X023-1 y X027-1 exhibieron características macroscópicas similares en el medio de cultivo MEA. Las características son las siguientes: **Reverso:** colonia de color amarillo - beige, con diámetro de 57,83 mm, sin producción de pigmento. **Anverso:** colonia de color blanco, delgadas, extendidas, crecimiento rápido, sin presencia de micelio, sin producción de exudados, colonias con textura cremosa suave (**Figura 13: A, B, C, D, E y F**). En cuanto a las características microscópicas, presentan hifas hialinas gruesas de 4 - 5  $\mu\text{m}$ . Se presentan artroconidios o artrosporas que miden 8 - 10  $\mu\text{m}$  de largo por 4 - 5  $\mu\text{m}$  de ancho, estos se forman por la segmentación de las hifas mediante dobles septos, son hialinos, unicelulares o en cadena, con forma de barril o bastón, con extremos truncados. Los conidióforos son indefinidos o ausentes (**Figura 13: G, H, I**). Según la descripción macroscópica y microscópica las cepas pertenecen al género *Geotrichum*.

**Figura 13.** Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos X003, X13-3, X019-2, X023-1 y X027-1 en MEA (A, D: reverso, B, E: anverso, C, F: textura; G, I: artrosporas, H: hifas. Fuente: Autor



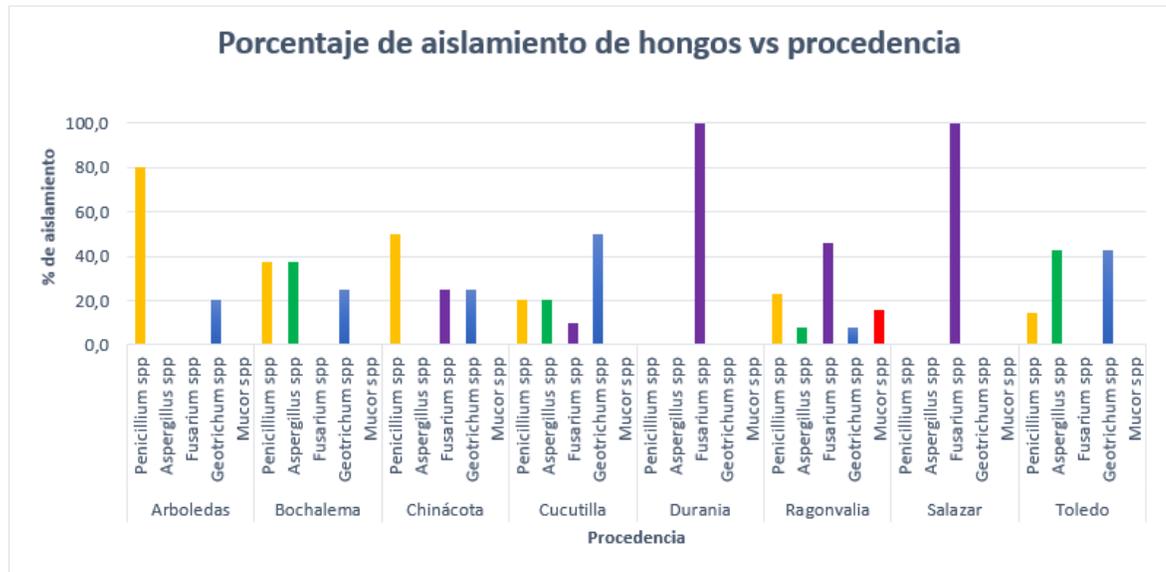
Las cepas X011 y X012 exhibieron características macroscópicas similares en el medio de cultivo MEA. Las características son las siguientes: **Reverso:** colonia de color amarillo - beige, con tamaño ilimitado (cubren el total del medio de cultivo), sin producción de pigmento. **Anverso:** colonia de color blanco al inicio del crecimiento, pero luego se torna oscuro por el crecimiento de los esporangios, no hay producción de exudados, colonias con textura o aspecto veloso – algodonoso, su crecimiento aéreo es abundante (**Figura 14: A, B, C, D, E y F**). En relación a las características microscópicas, presentan hifas hialinas, cenocíticas, gruesas (macrosifonado) de 8  $\mu\text{m}$  que son aseptadas. Presenta esporangióforo hialino, sus paredes contienen finas incrustaciones. Contiene una columnela ovoide, hialina con tamaño de 10  $\mu\text{m}$ . Carece de apófisis, estolón y rizoides. Los esporangios son esféricos con diámetro de 30  $\mu\text{m}$ , de color marrón, lleno de esporangiosporas. Las anteriores, presentan tamaños de 5  $\mu\text{m}$ , elipsoidales de paredes lisas con un color gris verdoso. (**Figura 14: G, H, I**). Según la descripción macroscópica y microscópica las cepas pertenecen al género *Mucor*.

**Figura 14.** Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos X011 y X012 en MEA (A, D: reverso, B, E: anverso, C, F: textura); G: esporangio, H: hifas, I: esporangiosporas. Fuente: Autor



Una vez obtenidos los resultados de las caracterizaciones de todos los aislados, se procedió a determinar la presencia de los mismos en relación a los municipios muestreados, obteniendo como resultado lo plasmado en la Figura 15.

**Figura 15.** Porcentajes de presencia de hongos aislados de los cultivos de café en los diferentes municipios. Fuente: Autor

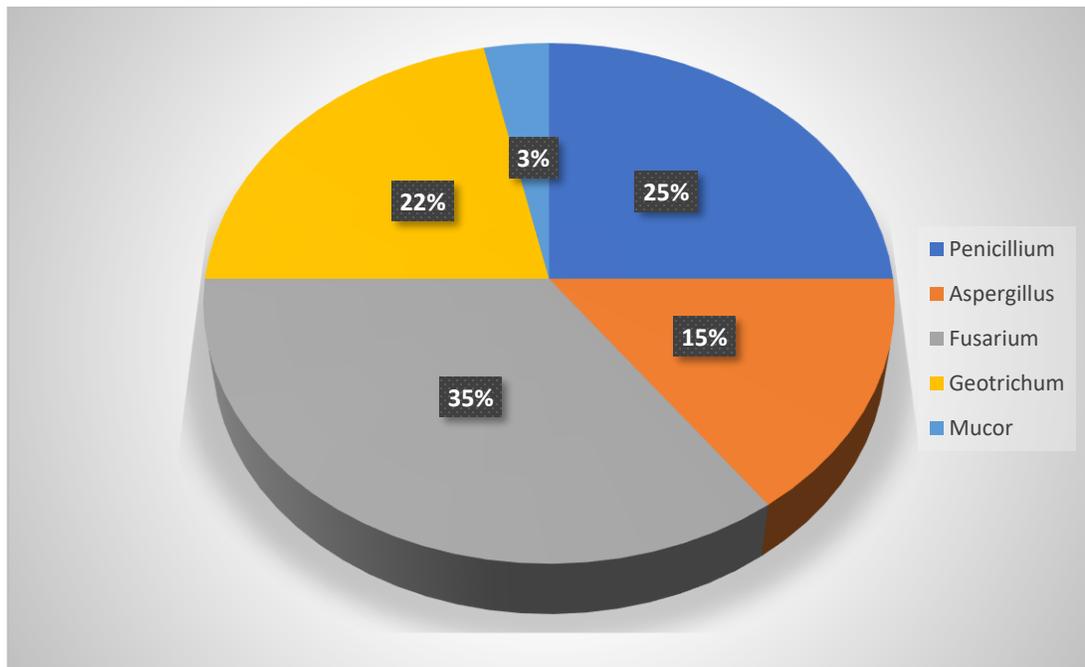


Como se puede observar en la Figura anterior, se muestrearon 8 municipios y se determinaron 5 géneros de los 60 aislados obtenidos. Dos de los municipios presentaron un 100 % de presencia del género *Fusarium*, correspondiendo a Durania y Salazar. El municipio de Arboledas, presentó dos géneros siendo estos *Penicillium* y *Geotrichum*, con un porcentaje de presencia del 80 y 20 %, respectivamente. Así mismo, los municipios de Bochalema, Chinácota y Toledo, presentaron 3 géneros diferentes con porcentajes de presencia como se muestra a continuación: Bochalema: *Penicillium* spp. (37 %), *Aspergillus* spp. (37 %), *Geotrichum* spp. (25 %). Chinácota: *Penicillium* spp. (50 %), *Fusarium* spp. (25 %) y *Geotrichum* spp. (25 %). Toledo: *Penicillium* spp. (14 %), *Aspergillus* spp. (43 %) y *Geotrichum* spp. (43 %). El municipio de Cucutilla presentó 4 géneros con presencia del 20 % (*Penicillium* spp.), 20 % (*Aspergillus* spp.), 10 % (*Fusarium* spp.) y 50 % (*Geotrichum* spp.). Por último, el municipio de Ragonvalia fue el único en presentar los 5 géneros determinados, siendo de esta manera *Penicillium* spp., con un 23 %, *Aspergillus* spp., con un 8 %, *Fusarium* spp., con un 46,2%, *Geotrichum* spp. con 8 % y *Mucor* spp., con un 15 %.

Una vez determinados los porcentajes de presencia por municipios, se establecieron los porcentajes de los géneros a nivel general (**Figura 16**) y de esta

forma caracterizar la microbiota presente en los cultivos de café de los diferentes municipios del departamento Norte de Santander.

**Figura 16.** Porcentaje de presencia del total de los hongos aislados. Fuente: Autor



Como es de apreciarse en la Figura anterior, los géneros de mayor presencia fueron *Fusarium* spp. (35 %), *Penicillium* spp. (25 %) y *Geotrichum* spp. (22 %). Por el contrario, los géneros que presentaron menor presencia fueron *Aspergillus* spp. (15 %) y *Mucor* spp. (3 %). Los anteriores resultados se relacionan con los obtenidos por Garrido *et al.* (2018), quienes lograron identificar 25 géneros y especies de hongos, siendo *Aspergillus* spp. el género prevalente, seguido de *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Curvularia* spp., *Rhizopus* spp., *Helminthosporium* spp. y *Pestalotia* spp. También con Jiménez *et al.* (2017), donde los resultados obtenidos consistieron en el aislamiento de un total de 98 cepas, y sus principales géneros encontrados fueron: *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Acremonium* spp., *Trichoderma* spp., *Phomopsis* spp., *Bjerkandera* spp. En relación al objetivo general de esta investigación, todos estos hallazgos se realizaron a partir de granos de café y es importante mencionar que se presentaron los mismos géneros entre una investigación y otra, pero con la excepción de los géneros *Geotrichum* spp. y *Mucor* spp. Por tal razón, el presente estudio sirve como un pie de apoyo para la continua investigación sobre la microbiota presente en el café tipo cereza que se cultiva en el departamento Norte de Santander, ya que sólo se ha realizado un único estudio anteriormente, reportado por Cajiao *et al.* (2016), quienes obtuvieron como resultado la caracterizaron fenotípicamente de *Aspergillus* spp.,

*Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Mucor* spp. y *Rhizopus* spp. siendo los hongos de mayor presencia, *Aspergillus* spp. y *Fusarium* spp.

## 6.2. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS ASOCIADAS AL GRANO DE CAFÉ (TIPO CEREZA) CULTIVADO EN NORTE DE SANTANDER

Considerando que la presencia de los hongos (micotoxigénicos o no) en etapas de beneficio del café, como cultivos o almacenamiento, pueden alterar los factores abióticos del grano, como lo es el pH, Aw y porcentaje de humedad, los cuales determinan si se establece el hongo o no; los resultados de un análisis de varianza de cada variable fisicoquímica se evidencian en las Tabla 3, 4 y 5.

**Tabla 3.** ANOVA para pH por Procedencia Fuente: Autor

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	295,859	7	42,2656	53,87	0,0000
Intra grupos	62,765	0	0,784562		
Total (Corr.)	358,624	87			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de pH entre un nivel de procedencia y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza.

**Tabla 4.** ANOVA para Aw por Procedencia. Fuente: Autor

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0337622	7	0,00482317	19,04	0,0000
Intra grupos	0,0202702	80	0,000253377		
Total (Corr.)	0,0540323	87			

Al igual que la tabla anterior, puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05; existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Aw entre un nivel de procedencia y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza.

**Tabla 5.** ANOVA para % de Humedad por Procedencia. Fuente: Autor

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	2507,2	7	358,171	14,24	0,0000
Intra grupos	2012,3	80	25,1538		
Total (Corr.)	4519,5	87			

Se observa, que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, por tal razón, se hace mención a que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del porcentaje de humedad entre un nivel de procedencia y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza.

Como es de apreciarse, al momento de aplicar el ANOVA para cada uno de los factores (pH, Aw y % Humedad), esta indica que existen diferencias estadísticamente significativas de cada uno de estos en relación a la procedencia, evidenciando de esta forma que las condiciones o valores de estas variables fisicoquímicas son propias de cada municipio. Es decir, el desarrollo de diferentes mohos filamentosos podría presentarse ya que cada municipio muestra valores únicos de pH, Aw y % de humedad, y dichas lecturas determinan la presencia del moho y que, además, varían dependiendo de la especie de estos organismos multicelulares. Sin embargo, vale la pena resaltar que los mohos tienen la capacidad de desarrollarse a diferentes valores de cada uno de estos factores, como, por ejemplo: tienen la facultad de soportar escalas de pH entre 2 – 9, pero con un pH óptimo en la mayoría de las especies de 5 - 6 (Andino *et al.*, 2010), así mismo, la mayor parte de mohos se desarrollan a partir de valores de Aw de 0,70 (Gimeno, 2002), lo cual es de esperarse ya que para el grano de café cereza (café verde) existe una mayor absorción de agua, permitiendo que sea más susceptible al deterioro por parte de microorganismos (Álvaro, 2010). Además, para que se produzca la germinación y/o esporulación de los mohos, estos necesitan valores de humedad relativas superiores al 90 % (Cañedo *et al.*, 2004).

En la Tabla 6, se presentan los resultados de los grupos homogéneos de las pruebas de múltiples rangos, gracias a un análisis de conglomerados adquiridos por el software STATGRAPHICS centurión XV.

**Tabla 6.** Grupos homogéneos de las pruebas de múltiples rangos. Medias y desviaciones estándar de las variables de cada municipio. Fuente: Autor.

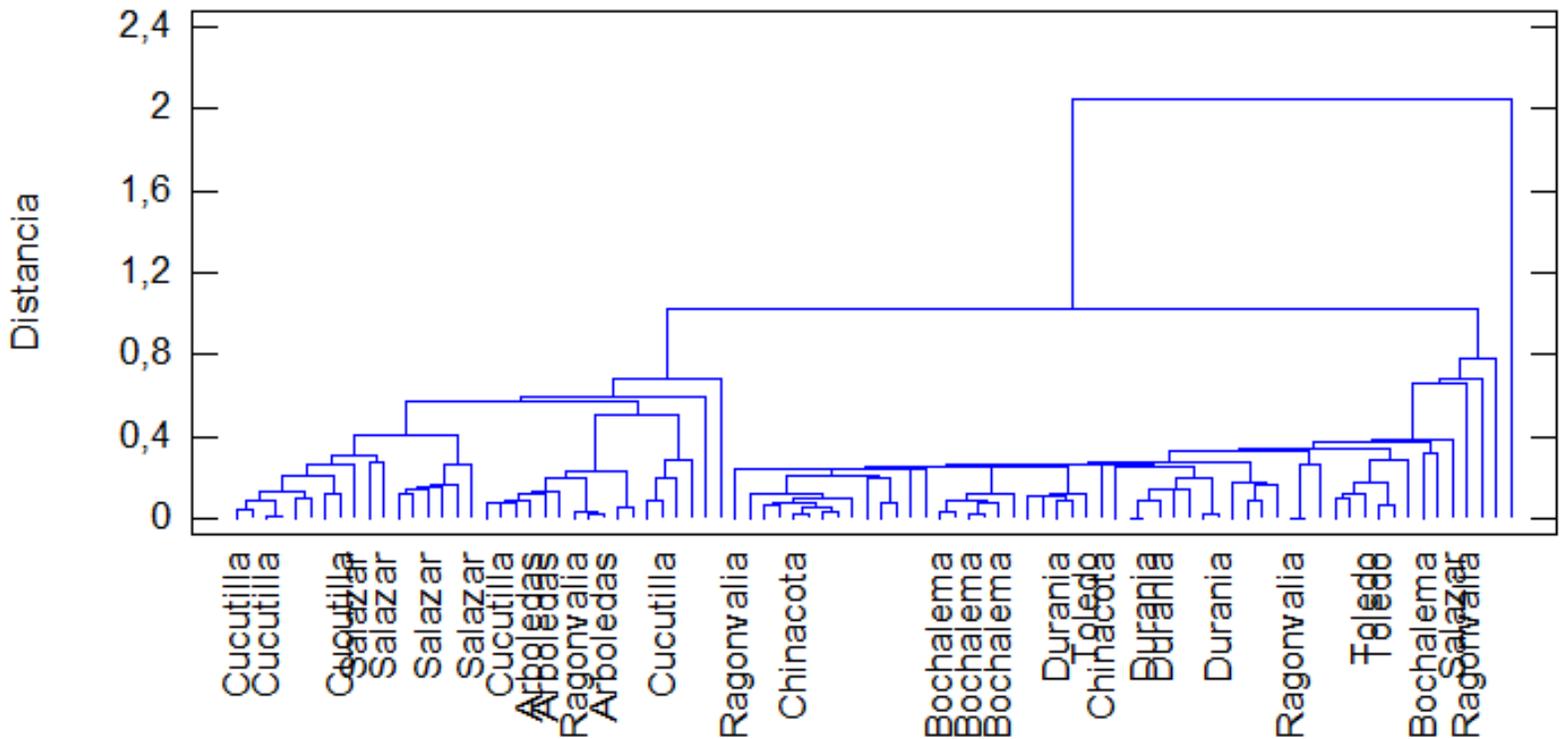
PROCEDENCIA	FACTORES FISICOQUÍMICOS		
	Aw	pH	% HUMEDAD
Arboledas	0,9139 <b>a</b>	4,7005 <b>a</b>	72,9303 <b>b c d</b>
	± 0,0121	± 0,6289	± 0,9663
Bochalema	0,9464 <b>b c</b>	8,9304 <b>c d</b>	65,6246 <b>a b</b>
	± 0,0131	± 0,2842	± 2,5401
Chinácota	0,9145 <b>a</b>	8,7815 <b>c d</b>	71,8977 <b>a b c d</b>
	± 0,0125	± 0,4182	± 2,0317
Cucutilla	0,9451 <b>b</b>	4,3907 <b>a</b>	68,5266 <b>a b c</b>
	± 0,0276	± 0,3386	± 1,4733
Durania	0,9671 <b>c d</b>	9,3348 <b>d</b>	81,908 <b>d e</b>
	± 0,0046	± 0,1082	± 6,7954
Ragonvalia	0,9236 <b>a</b>	7,8551 <b>c</b>	76,5864 <b>c d e</b>
	± 0,0202	± 1,4222	± 6,0806
Salazar	0,9539 <b>b c d</b>	6,7847 <b>b</b>	72,7356 <b>b c d</b>
	± 0,0084	± 1,5031	± 7,2914
Toledo	0,9716 <b>d</b>	8,9156 <b>c d</b>	65,2942 <b>a</b>
	± 0,0077	± 0,3520	± 4,9340

Como se muestra en la tabla anterior, los grupos homogéneos de la prueba de múltiples rangos, utilizando el método Tukey, permite detectar diferencias estrechamente relacionadas entre dos medias muestrales, para de esta forma considerar que dos tratamientos son estadísticamente diferentes. Por ejemplo: en el factor de Aw, el superíndice **a** indica que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias muestrales de Arboledas y Chinácota, con un nivel del 0,5 % (95 %), pero si entre Arboledas y Cucutilla. Este mismo análisis, se aplica para cada uno de los superíndices en cada uno de los factores fisicoquímicos. Estos resultados permiten inferir la presencia de especies diferentes o iguales de mohos filamentosos en el café de los municipios muestreados.

Al mismo tiempo, el análisis de conglomerados permite clasificar los municipios de procedencia del café, en dos grandes grupos (**Figura 17**), atendiendo a los factores

fisicoquímicos. Dichos grupos corresponden por un lado a Arboledas, Cucutilla y Salazar, y por el otro, al restante de los municipios, y esta figura (Figura 17), muestra qué tan distantes se encuentran los valores anteriormente mencionados entre sí, teniendo en cuenta la procedencia.

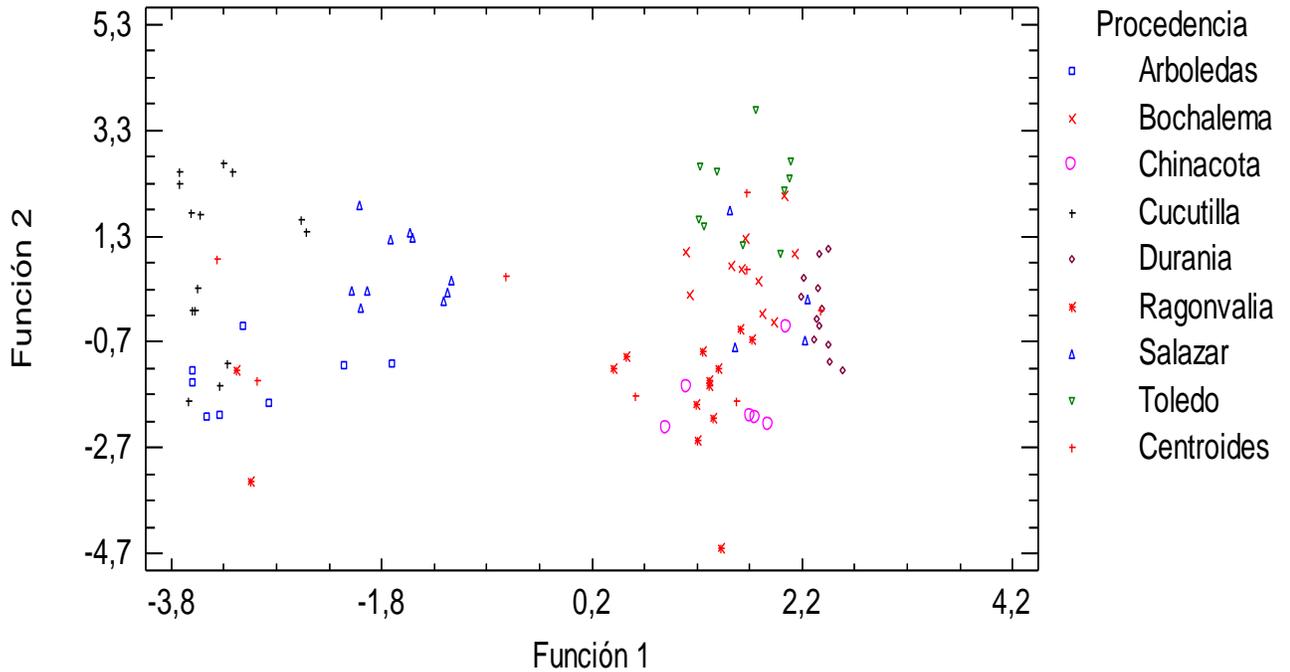
**Figura 17.** Dendograma, Método del Vecino Más Cercano, Euclideana Cuadrada.  
Fuente: Autor.



Un análisis discriminante y de clúster, arroja como resultado lo evidenciado en la Figura 17, dos grandes grupos se asocian atendiendo a las variables fisicoquímicas, uno que corresponde a las muestras procedentes de Cucutilla, Salazar y Arboledas, y un segundo grupo a los municipios restantes.

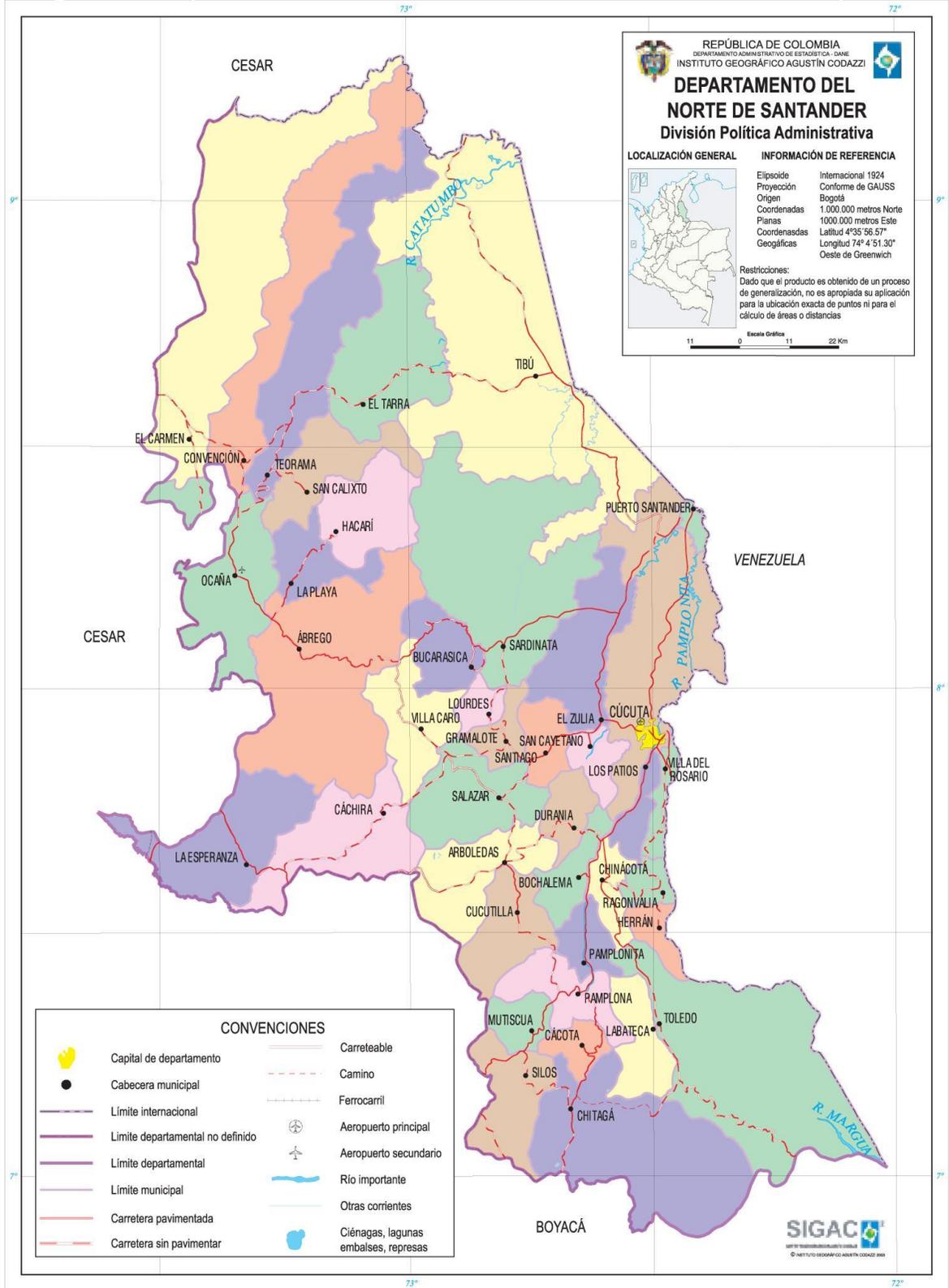
Lo anterior, se presenta en la gráfica de funciones discriminantes (**Figura 18**) donde muestra una conducta de dos grupos principales, los mencionados anteriormente, y si se observa la imagen del departamento Norte de Santander (**Figura 19**), dichos grupos, por ejemplo, Arboledas – Cucutilla - Salazar, son municipios próximos entre sí o vecinos, lo mismo sucede con las procedencias restantes. Por tal razón, se infiere que las características geo climáticas, juegan un papel importante para la obtención de estos resultados relacionados.

**Figura 18.** Gráfica de funciones discriminantes. Fuente: Autor.



Así mismo, gracias a esta gráfica (**Figura 18**) y a los coeficientes de la función de clasificación para procedencia, se pueden utilizar las funciones 1 y 2 ( $0,011289 \cdot Aw + 0,071225 \cdot \text{Humedad} + 0,991358 \cdot \text{pH}$ ), para determinar la posible procedencia de una muestra en cuestión, si reemplazamos los datos de las variables fisicoquímicas. Es decir, se obtienen dos datos, uno de cada función, y con esos valores, se identifica la posible procedencia de la muestra.

Figura 19. Departamento de Norte de Santander. Fuente: colombiamapas.net



### 6.3. DETERMINACIÓN DE CEPAS CON POTENCIAL AFLATOXIGÉNICO AISLADAS A PARTIR DEL GRANO DE CAFÉ

De acuerdo a las taxonomías y nomenclaturas sentadas por Pitt y Hocking, (2009), Samson *et al.* (2014), Visagie *et al.* (2014 a) y Visagie *et al.* (2014 b), las cepas identificadas con el género *Aspergillus* spp., además, de contener características similares a *A. flavus*, *A. parasíticus* y *A. nomius*, ya que estos son las responsables de la producción de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> (FAO/OMS, 2007) fueron sometidos a pruebas de determinación de aflatoxinas mediante el uso de medios de cultivos. En la Tabla 7 se presentan los resultados obtenidos después de inocular los aislados en los medios de cultivo YES, PDA y ALC y posterior exposición a vapores amoniacales.

#### 6.3.1. Determinación de aflatoxinas mediante vapores amoniacales

**Tabla 7.** Efecto de los medios sobre la intensidad del color rosa inducido por el vapor de amoníaco (incubación de 6 días a 25 °C). Fuente: Autor.

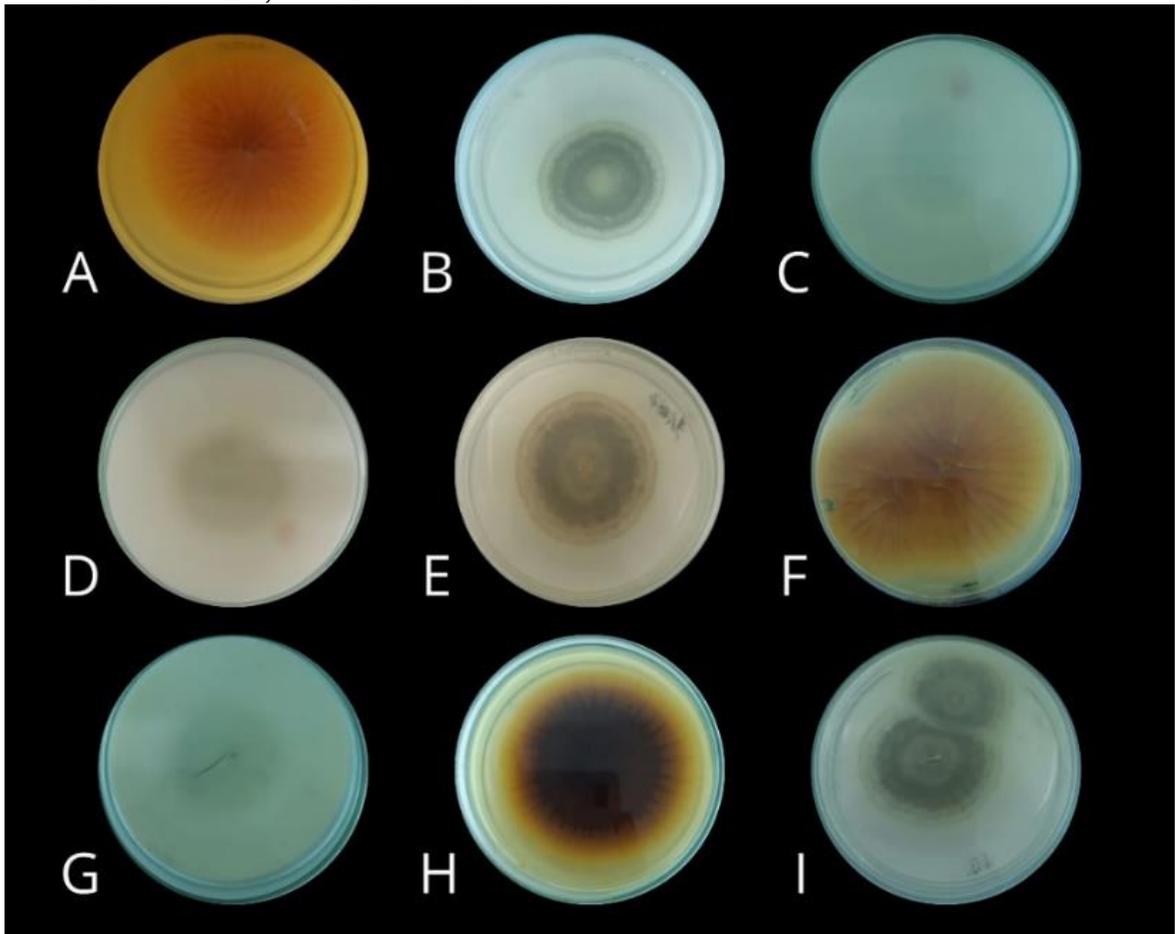
Aislamiento	Cambio de color del reverso		
	YES	PDA	ALC
X006	-	-	-
X007-2	-	-	-
X013-4	-	-	-
X015-1	-	-	-
X024	-	-	-
X025-2	-	-	-
X027-2	-	-	-
X029-1	-	-	-
X029-2	-	-	-

Intensidad del color rosa: +++: fuerte, ++: media, +: débil, -: sin cambios  
 YES: yeast extract sucrose; PDA: papa dextrosa agar; ALC: Agar leche de coco.

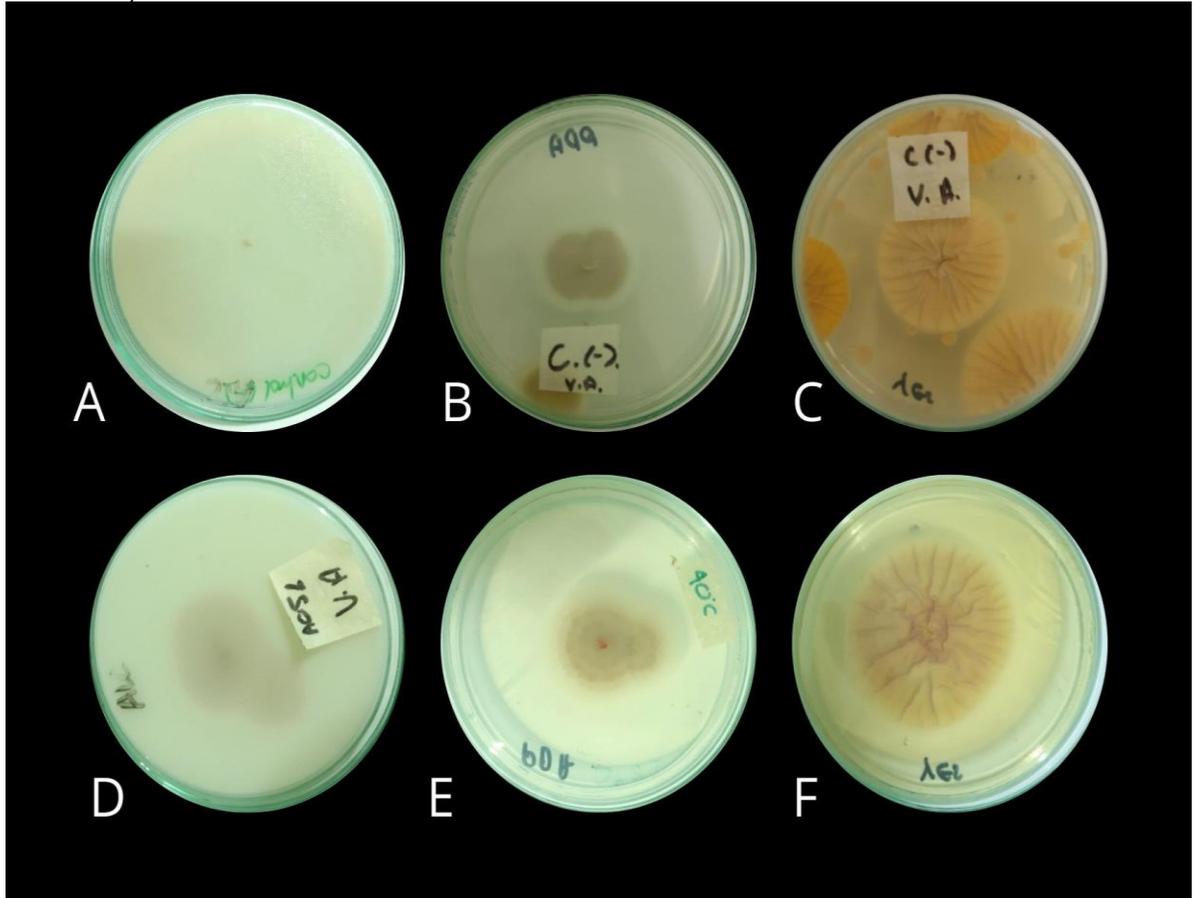
Como se muestra en la Tabla 7, ninguno de los aislamientos presentó cambio de color en el reverso de los tres medios de cultivo utilizados, indicando de esta forma la no producción de aflatoxinas por parte de las cepas evaluadas (**Figura 20**), al igual que el control negativo (**Figura 21**). Independientemente de que, los aislamientos correspondan a *A. flavus*, *A. parasíticus* y/o *A. nomius*, y de que

produzcan tanto aflatoxinas de tipo B o G, los resultados obtenidos evidencian que no todas las cepas como las mencionadas con anterioridad, tienen la capacidad de biosintetizar este metabolito secundario, sin descartar la influencia de factores tanto genéticos (reflejados en la biosíntesis) (Ehrlich *et al.*, 2004), como abióticos: temperatura, humedad, actividad de agua, interferencia de insectos, es decir, condiciones que favorezcan la generación de aflatoxinas ya sea en los cultivos, en la cosecha, el almacenaje o transporte de los granos de café (Torres *et al.*, 2014). Además, las condiciones *in vitro* que se les depara a las cepas a la hora de evaluar su potencial aflatoxigénico, juegan un papel importante en la obtención de los resultados, así como lo reporta Carvajal (2013).

**Figura 20.** Cepas negativas para la producción de aflatoxinas, sometidas a vapores amoniacales durante 6 días. A: X006 en YES; B: X007-2 en PDA; C: X013-4 en ALC; D: X015-1 en ALC; E: X024 en PDA; F: X025-2 en YES; G: X027-2 en ALC; H: X029-1 en YES; I: X029 en PDA. Fuente: Autor.



**Figura 21.** Control negativo y positivo en la metodología de vapores amoniacaes. A, B y C: Control negativo en ALC, PDA y YES, respectivamente. D, E y F: Control positivo en ALC, PDA y YES, respectivamente. Control negativo (cepa de *A. brasiliensis*, suministrada por el cepario del programa de Microbiología de la Universidad de Pamplona); Control positivo (Cepa A052 suministrada por la directora). Fuente: Autor.

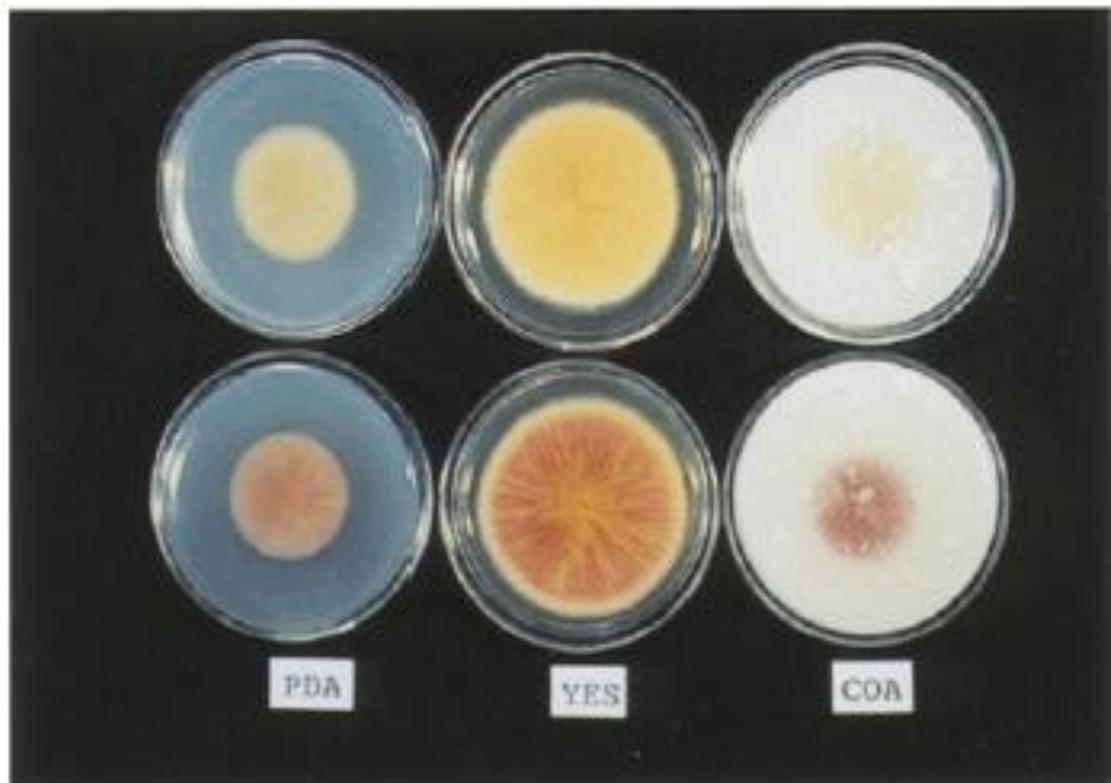


En relación con la metodología empleada para la obtención de los resultados de la sesión 6.3.1, se compara con los resultados obtenidos por Saito *et al.* (1999), quienes reportaron que de un total de 83 cepas de *A. flavus*, 55 resultaron productoras y 28 no productoras; las 13 cepas de *A. parasiticus* resultaron productoras; de las 19 cepas de *A. oryzae* y las 5 de *A. sojae*, todas resultaron no productoras para aflatoxinas.

Estos autores determinaron positivo para la producción de aflatoxinas, cuando después de la incubación de los medios y la posterior supeditación de las placas a vapores amoniacaes, en estas se observa un cambio de color rosa en el reverso de la colonia (**Figura 22**), al igual que en el control positivo (**Figura 21**). Adicionalmente, observaron el mayor cambio de color en colonias cultivadas en

medios de extracto de levadura-sacarosa (YES) y coco (ALC), un cambio de color menos intenso en agar papa dextrosa (PDA) y el menor cambio de color en medios de glucosa-sales minerales, todos los cuales favorecen la producción de aflatoxinas. Sin embargo, no se observó ningún cambio de color en las sales minerales de peptona y en los medios en solución de Czapek, que no favorecen la producción de aflatoxinas. Además, informaron que, la prueba de vapor de hidróxido de amonio tiene un 11 % de falsos positivos y un 6 % de falsos negativos de aflatoxigenicidad.

**Figura 22.** El color de la colonia inversa de la cepa de *Aspergillus flavus* productora de aflatoxinas cultivada en agar PDA, YES y COA después de 4 días de incubación a 25°C, mostradas en la parte superior e inferior mostradas antes y después de la exposición al vapor de amoníaco, respectivamente. Fuente: Saito et al. (1999).



Alkhersan *et al.* (2016) mencionaron en su investigación que, 26 aislamientos (52 %) de un total de 50 de *A. flavus* resultaron positivos mediante la detección de vapor de amoníaco, ya que las colonias de *A. flavus* aflatoxigénicas se volvió rosa, mientras que no hubo cambio de color con los aislados no aflatoxigénicos. Tal resultado fue igual, mediante la detección de emisión de fluorescencia por luz UV a 365 nm, como se comentará posteriormente.

Abbas *et al.* (2004) realizaron la comparación de métodos de cultivo y analíticos para la determinación de aflatoxinas, encontrando como resultados que existían diferencias significativas en cuanto a la confiabilidad de los métodos de cultivo para distinguir entre los aislamientos aflatoxigénicos y no aflatoxigénicos. Y tal y como ellos mencionan: “*La idoneidad de los diferentes métodos depende de la aplicación particular*”. Es decir, la respuesta de color al vapor de amoníaco estuvo en un 100 % de acuerdo con la prueba de ELISA en la identificación de los aislados no aflatoxigénicos (con una tasa de falsos positivos del 0 %). Sin embargo, fue el método con la menor concordancia con ELISA para identificar los aislados aflatoxigénicos, para los cuales tuvo una tasa de falsos negativos de alrededor del 30 %. De igual manera, comunican sobre el uso de una pigmentación amarilla combinada con la prueba de vapor de hidróxido de amonio para reducir los falsos negativos al 7 %.

Yazdani *et al.* (2010), informaron que para cepas de *A. flavus* hubo producción de toxinas demostrándose con técnicas analíticas como TLC y HPLC pero no hubo pigmentación rosada cuando se empleó el test de vapores amoniacales. Por tanto, ellos notifican que la prueba de hidróxido de amonio no era una prueba fiable para la detección de aflatoxinas, ya que se produjeron falsos negativos y positivos. Kumar *et al.* (2007) informaron una eficacia del 92 % para la prueba de vapor de amonio con un 8 % de falsos negativos.

Por tal motivo, fue necesario cerciorarse que los resultados que se obtuvieron (**Tabla 7**) no correspondieran a falsos negativos, y para esto se empleó la metodología de la emisión de fluorescencia, presentando los resultados en la Tabla 8.

### 6.3.2. Determinación de aflatoxinas mediante emisión de fluorescencia

**Tabla 8.** *Intensidad de la fluorescencia emitida por los hongos seleccionados.*  
Fuente: Autor.

Aislamiento	Intensidad de fluorescencia								
	7 días			10 días			15 días		
	ALC	AEC	ACR	ALC	AEC	ACR	ALC	AEC	ACR
X006	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X007-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X013-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X015-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X024	-	-	-	-	-	-	-	-	-

X025-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X027-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X029-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X029-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

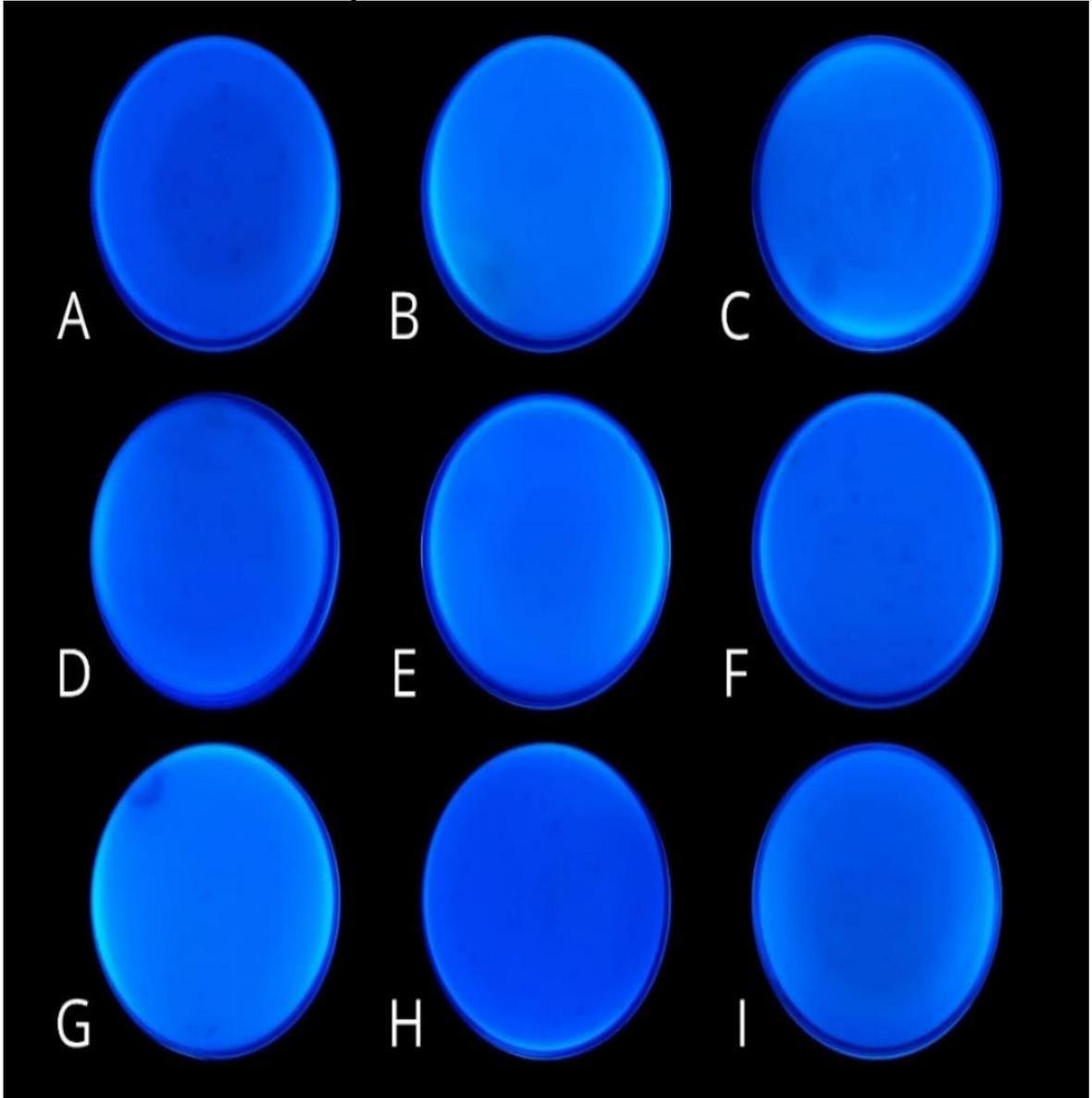
+++ : Fluorescencia fuerte, ++ : fluorescencia media, + : fluorescencia débil, - : no fluorescencia

ALC : Agar leche de coco; AEC : Agar extracto de coco; ACR : Agar coco rallado

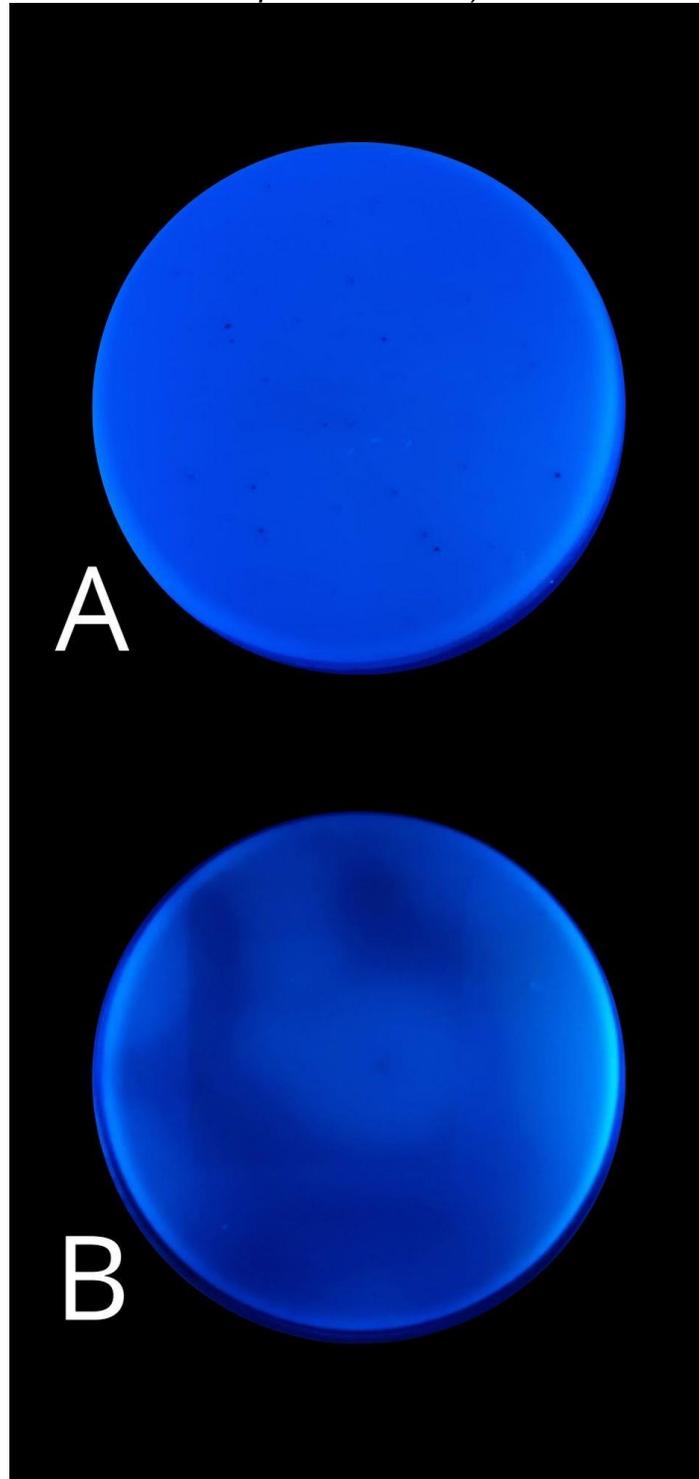
Como se presenta en la Tabla 8, es evidente que ninguna de las cepas de *Aspergillus* spp. presentó fluorescencia, demostrando la ausencia del metabolito secundario que es producido por cepas de este género (**Figura 23**), así como en el control negativo (**Figura 24**). Estos resultados son confirmados de manera parcial por Lin *et al.* (1976) atendiendo a que obtuvieron que, 20 de 27 aislados brasileños de *A. flavus* no dieron positivo en la producción de aflatoxinas utilizando la misma metodología. Así mismo, estos autores hacen mención de una producción de pigmentación en asociación a la producción de aflatoxinas, dicha pigmentación (color amarillo anaranjado) en agar coco que fue asociada constantemente con la producción de fluorescencia y a la capacidad de producción de aflatoxinas de *Aspergillus* spp. no fue observada en ningún medio de cultivo, ni en los tres diferentes tiempos. Ahora bien, Abbas *et al.* (2004) investigaron la base bioquímica de la prueba de Saito *et al.* (1999) (vapores amoniacales), utilizando metanol para extraer pigmentos de cultivos liofilizados de *A. flavus* aflatoxigénico cultivados en PDA. Los extractos contenían pigmentos amarillos, que presumiblemente son los mismos pigmentos amarillos que son la base de la prueba de aflatoxigenicidad de Lin *et al.* (1976). También, hacen mención que su estudio es el primero en examinar todos los pigmentos amarillos producidos por una cepa aflatoxigénica de *A. flavus* y en utilizar la purificación guiada por ensayo para proporcionar evidencia de que los mismos pigmentos amarillos forman la base tanto de la prueba de pigmento amarillo de Lin *et al.* (1976) y la prueba de cambio de color inducida por vapor de hidróxido de amonio de Saito *et al.* (1999).

La identificación de los pigmentos amarillos como intermediarios biosintéticos de aflatoxinas proporciona una justificación para la eficacia de estas dos pruebas empíricas y una base para predecir algunas condiciones en las que se puede esperar que se produzcan falsos positivos y falsos negativos. Sin embargo, Davis *et al.* (1987) concluyeron en su investigación que la producción del pigmento amarillo no era un predictor confiable de la cantidad de aflatoxina en todos los medios.

**Figura 23.** Cepas negativas para la producción de aflatoxinas mediante emisión de fluorescencia. A: X006 en AEC a los 7 días; B: X007-2 en ALC a los 10 días; C: X013-4 en ACR a los 15 días; D: X015-1 en ACR a los 10 días; E: X024 en ALC a los 7 días; F: X025-2 en AEC a las 15 días; G: X027-2 en ALC a los 15 días; H: X029-1 AEC a los 10 días y I: X029-2 en ACR a los 7 días. Fuente: Autor.



**Figura 24.** Control negativo (A) y control positivo (B) de la metodología de emisión de fluorescencia. Control negativo (cepa de *A. brasiliensis*, suministrada por el cepario del programa de Microbiología de la Universidad de Pamplona); Control positivo (Cepa A052 suministrada por la directora). Fuente: Autor.



Por otro lado, Ouattara *et al.* (2012), realizaron la comparación entre la emisión de fluorescencia en agar coco (30°C) debido a la producción de aflatoxinas y a la cuantificación de este metabolito mediante HPLC producido en caldo coco. En sus resultados obtuvieron que la cepa *A. flavus* NRRL484 no presentó emisión y consecuentemente, no se detectó mediante HPLC, así mismo, la cepa *A. parasiticus* CDCB4571 dio como resultado  $\pm$  (ligero) en emisión de fluorescencia, pero posteriormente si fue detectado por la técnica analítica. Lo anterior, demuestra que no todas las cepas de *A. flavus* producen aflatoxinas, específicamente las de tipo B como lo menciona Ehrlich *et al.* (2004), y al igual que, *A. flavus* y *A. parasiticus* no tienen esta capacidad en todas sus cepas (Davis *et al.*, 1987).

Finalmente, para confirmar lo anterior, Alkhersan *et al.* (2016), reportaron que del 100 % de los aislamientos de *A. flavus*, el 52 % resultaron positivos para aflatoxinas mediante la detección de luz ultravioleta, emitiendo fluorescencia azul verdosa en agar coco, como lo demuestra el control positivo (**Figura 24**), por el contrario, el 48 % restante no emitieron ningún tipo de fluorescencia, resultando como negativo para la producción de aflatoxinas.

Ahora bien, la presencia de inductores en los medios de cultivo, han demostrado tener efectividad en aumentar la emisión de la fluorescencia cuando hay producción de aflatoxinas, sin embargo, la utilización de medios sin inductores es considerado un excelente método preliminar para la determinación de las aflatoxinas, tal y como lo comenta Medina *et al.* (2002). Ellos mismos, observaron un aumento en todos los medios de cultivo con inductores (Zn, sacarosa, extracto de levadura) y más aún, cuando se combinaron todos estos. Así mismo, las ciclodextrinas se han relacionado como promotoras de la respuesta fluorescente de las aflatoxinas; las ciclodextrinas (CD), también conocidas como cicloamilosas y cicloglucoamilosas, comprenden una familia de oligosacáridos cíclicos obtenidos del almidón por degradación enzimática de la ciclodextrinanglicolasa. La propiedad más característica de estos oligómeros es su notable capacidad de formar complejos de inclusión con una amplia variedad de moléculas que pueden ser desde compuestos orgánicos o inorgánicos de naturaleza neutral o iónica hasta gases nobles (Rojas, 2005).

Para el año 1988, Francis *et al.*, estudiaron las interacciones entre la  $\beta$ -CD y las aflatoxinas en sistemas de purificación y observaron que los complejos formados mostraban un gran incremento en la intensidad de la fluorescencia. Fente *et al.* (2001) demostraron que la adición de  $\beta$ -CD y un derivado de CD metilado a un medio de agar adecuado mejora la detección de la producción de aflatoxinas por *A. flavus* y *A. parasiticus* por fluorescencia azul bajo luz de 365 nm.

Hara *et al.* (1974), determinaron el efecto que tiene el cambio de una serie de componentes en el medio de cultivo solución de agar de Czapek, en relación a la intensidad de la fluorescencia, utilizando cepas aflatoxigénicas de *A. flavus* y *A. parasiticus* suministradas por Northern Regional Research Laboratory (NRRL).

Efectivamente, el uso de varias fuentes de carbono como por ejemplo: urea, peptona, alanina, ácido glutámico,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4) \text{H}_2\text{PO}_4$ ; la presencia de varios inhibidores enzimáticos y suplementos nutricionales tales como: metionina, licor de maceración de maíz,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{ICHCOOH}$ ,  $\text{NaN}_3$ ,  $\alpha, \alpha'$ -dipiridil,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ , demostraron tener influencia en los cambios de color e intensidad de la emisión de fluorescencia, producida por las cepas aflatoxigénicas.

Indistintamente de los métodos de cultivo que se emplean para la detección de aflatoxinas, todos estos incluyen una serie de ventajas, entre las cuales, se resalta el bajo precio, la falta de necesidad de equipos sofisticados, las habilidades técnicas necesarias para el desarrollo de los ensayos, están disponibles en países desarrollados y en desarrollo. Y se espera que la evaluación por métodos culturales sea definitiva, es decir, que no se requiera la convalidación de otras metodologías.

Pero también existe una serie de desventajas, por ejemplo: los resultados positivos no son específicos con respecto al tipo de micotoxina, también, pueden ser cuantitativos con respecto a la cantidad de hongos en la muestra, pero la cantidad de micotoxina presente no necesariamente se correlacionará con el nivel de infestación; se considera menos sensible que los métodos analíticos y varía con respecto a los límites de detección, precisión, requisitos y aplicaciones (Abbas *et al.*, 2004).

#### **6.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS AISLADAS A PARTIR DEL GRANÓ DE CAFÉ**

En este estudio se realizó la identificación molecular a cuatro (4) cepas del total de los aislamientos, ya que teniendo en cuenta los resultados adquiridos en la sesión 6.1. y como se contempla en la Figura 15, los géneros: *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Geotrichum* spp. y *Aspergillus* spp., corresponden a los géneros de mayor presencia. Cada cepa aislada, corresponde a uno de los géneros mencionados con anterioridad. Así como se muestra en la Tabla 9, dos (2) cepas se identificaron hasta llegar al taxón de especie (X001 y X013-4) y las restantes sólo hasta el taxón de género, gracias al uso de espaciador transcrito interno (ITS).

**Tabla 9.** Identificación molecular de las cepas asociadas al grano de café con los iniciadores ITS 4 e ITS 5 mediante la comparación con bases de datos utilizando la herramienta BLAST. Fuente: CorpoGen (2019).

AISLAMIENTO	Longitud de la secuencia ensamblada (Anexo 6)	Bases de datos			Conclusión
		NCBI	UNITE	Warcup Fungal ITS	
X010-2	577 pb	<i>F. tricinctum</i> <i>F. avenaceum</i> <i>O. sinensis</i>	<i>G. avenacea</i> <i>O. sinensis</i>	<i>Gibberella</i> <i>spp.</i>	Género: <i>Fusarium</i> Especie: ver análisis
X007-1	585 pb	<i>P. expansum</i> <i>P. crustosum</i>	<i>Penicillium</i> <i>Solitum</i>	<i>Eupenicillium</i> <i>spp.</i>	Género: <i>Penicillium</i> Especie: ver análisis
X001	404 pb	<i>G. candidum</i>	<i>D. geotrichum</i>	<i>Geotrichum</i> <i>spp.</i>	Género: <i>Geotrichum</i> Especie: <i>G. candidum</i>
X013-4	607 pb	<i>A. oryzae</i> <i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	Género: <i>Aspergillus</i> Especie: <i>A. flavus</i>

Para el aislamiento X010-2, los resultados del análisis taxonómico de esta secuencia de 577 pb contra la base de datos nr/nt del NCBI, indican que la secuencia problema tiene un 100 % de identidad en el 100 % de su longitud con secuencias de ITS pertenecientes a las especies: *Fusarium tricinctum*, *Fusarium avenaceum* y *Ophiocordyceps sinensis*.

Este mismo análisis fue realizado contra la base de datos UNITE, el cual indica que la secuencia problema tiene mayor similitud con secuencias de ITS pertenecientes a las especies *Gibberella avenacea* y *Ophiocordyceps sinensis* (**Anexo 7**). Usando la herramienta “Classifier”, perteneciente al sitio Web de RDP, al comparar con la base de datos “Warcup Fungal ITS trainset 2”, especializada en hongos, indica que la secuencia problema tiene mayor similitud con el género *Gibberella* spp. (**Anexo 7**). De acuerdo con el anterior resultado, y teniendo en cuenta la metodología utilizada, la secuencia tiene una alta probabilidad de pertenecer al género *Fusarium*. No es posible definir la especie ya que la región ITS aporta muy poca información para este fin en el caso de este género.

Para lograr identificar la especie es necesario analizar otras regiones (genes) *Fusarium* como: factor de elongación de translocación-1 $\alpha$  (tef-1 $\alpha$ ), ARN polimerasa 1 y 2 (RPB1 y RPB2),  $\beta$ -tubulina (tub) e histona (his). La secuencia problema se enfrentó a las bases de datos mencionadas en la referencia bibliográfica (*Fusarium*

ID, *Fusarium* MSLT) y también concluyeron que se trataba del género *Fusarium* (Summerell, 2019). Sin embargo, Acevedo (2013) hace mención que en la actualidad, las regiones más utilizadas para la identificación de *Fusarium* a nivel de especie son el gen del factor de elongación de la traducción 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), y los genes de la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB2 y RPB1), los cuales fueron empleados para alcanzar el principal objetivo del autor, ya que estos, poseen una mayor diversidad nucleotídica comparado con otros loci como Calmodulina, IGS, ITS 1 y 2. Adicionalmente, otras regiones también estudiadas con fines de identificación a nivel de especie incluyen, genes de apareamiento (MAT), genes que codifican para la Celobiosa-C y la Topoisomerasa II, el gen que codifica para la  $\beta$ -tubulina, Calmodulina, entre otros, ya que las regiones ribosomales tienen poca utilidad para la identificación de *Fusarium* hasta el taxón de especie, porque dichas regiones son demasiado conservadas y por lo tanto, tienen menor capacidad de resolución y han generado taxonomías y filogenias erróneas y junto con ello, el bajo grado de confiabilidad en procesos de identificación (Acevedo, 2013).

Para el caso de la especie *Ophiocordyceps sinensis*, que pertenece al mismo Orden (*Hypocreales*) del género *Fusarium*, se cuenta con tan sólo una secuencia, reportada en 2016, de *Ophiocordyceps sinensis*, como se puede ver en los resultados del BLAST, y que no fue publicada en una revista indexada, por lo cual es factible que haya errores en dicha secuencia y por lo tanto, a pesar de la similitud encontrada, este resultado hay que tomarlo con precaución.

Por otro lado, en el aislamiento X007-1 los resultados del análisis taxonómico de esta secuencia de 585 pb contra la base de datos nr/nt del NCBI, indican que la secuencia problema ensamblada resultante muestra un 99 % de identidad en el 100 % de su longitud con secuencias de las especies *Penicillium expansum* y *Penicillium crustosum*.

Este mismo análisis fue realizado contra la base de datos UNITE, el cual mostró que la mayor similitud de la secuencia estudiada esta con la especie *Penicillium solitum* (**Anexo 8**). Usando la herramienta "Classifier", perteneciente al sitio Web de RDP, al comparar con la base de datos "Warcup Fungal ITS trainset 2", especializada en hongos, indica que la secuencia problema tiene mayor similitud con el género *Eupenicillium* spp. (**Anexo 8**). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de las bases de datos, el aislamiento X007-1 se puede clasificar como perteneciente al género *Penicillium*, pero no es posible diferenciar entre las diferentes especies ya que la región de ITS, aunque se acepta como código de barras de ADN oficial para los hongos, también se ha reconocido como una región muy conservada (en el caso de *Penicillium*) y no brinda suficiente información para tal fin.

Para lograr identificar la especie se recomienda realizar la secuenciación de múltiples marcadores genéticos, particularmente los genes de la  $\beta$ -tubulina (*benA*) y la calmodulina (*cmdA* o *CaM*). Los exones de estos genes están muy conservados

y, por lo tanto, son buenas ubicaciones para la unión del cebador, mientras que los intrones entre los exones actúan como la principal fuente de variación de secuencia. Aunque también existe una tercera opción, el segundo gen de la subunidad más grande de la ARN polimerasa II (*rpb2*), su falta de intrones permite una alineación robusta y fácil para el análisis filogenético, pero no se seleccionó sobre *benA* o *cmdA* porque *rpb2* a veces es difícil de amplificar y la base de datos está incompleta. No obstante, cuando se dispone de recursos, se recomienda secuenciar los cuatro marcadores genéticos (*ITS*, *benA*, *cmdA* y *rpb2*) para ayudar a la identificación, especialmente cuando se diagnostican nuevas especies (Visagie *et al.*, 2014; Tsang *et al.*, 2018).

Ahora, los resultados del análisis taxonómico de la cepa X001 de la secuencia de 404 pb contra la base de datos nr/nt del NCBI, indican que la secuencia problema ensamblada resultante muestra un 98 % de identidad en el 97 % de su longitud con secuencias de la especie *Geotrichum candidum*. Este mismo análisis fue realizado contra la base de datos UNITE, el cual mostró que, la mayor similitud de la secuencia estudiada correspondió con el género *Dipodascus geotrichum*, nombre sinónimo de *Geotrichum candidum* (**Anexo 9**). Usando la herramienta “Classifier”, perteneciente al sitio Web de RDP, al comparar con la base de datos “Warcup Fungal ITS trainset 2”, especializada en hongos, indica que la secuencia problema tiene mayor similitud con el género *Geotrichum* spp. (**Anexo 9**). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de las bases de datos, el aislamiento X001 se puede clasificar como perteneciente a la especie *Geotrichum candidum*.

Finalmente, en cuanto a la cepa X013-4, los resultados del análisis taxonómico de esta secuencia de 607 pb contra la base de datos nr/nt del NCBI, indican que la secuencia problema ensamblada resultante muestra un 99 % de identidad en el 98 % de su longitud con secuencias de las especies *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus flavus*. Este mismo análisis fue realizado contra la base de datos UNITE, el cual mostró que la mayor similitud de la secuencia estudiada está con la especie *Aspergillus flavus* (**Anexo 10**). Usando la herramienta “Classifier”, perteneciente al sitio Web de RDP, al comparar con la base de datos “Warcup Fungal ITS trainset 2”, especializada en hongos, indica que la secuencia problema tiene mayor similitud con la especie *Aspergillus flavus* (**Anexo 10**). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de las bases de datos, el aislamiento X013-4 se puede clasificar como perteneciente a la especie *Aspergillus flavus*.

## 7. CONCLUSIONES

A partir del café tipo cereza cultivado en los municipios de Arboledas, Bochalema, Durania, Chinácota, Cucutilla, Ragonvalia, Salazar y Toledo, se logró aislar y determinar 60 cepas axénicas de mohos filamentosos, gracias a la caracterización macroscópica y microscópica y al uso de claves taxonómicas. Tales aislamientos correspondieron a 5 géneros como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Geotrichum* spp., *Mucor* spp. y *Penicillium* spp.

En este estudio se logró determinar que la presencia de los hongos en las diferentes procedencias varió desde municipios con el 100 % de un sólo género aislado hasta, municipios con presencias de 4 y 5 morfoespecies diferentes de mohos filamentosos, encontrando que las condiciones geo-climáticas, establecen la presencia de los mohos en los diferentes municipios.

De acuerdo a la caracterización fenotípica, los géneros de mayor presencia corresponden a *Fusarium* spp. con un 35 %, *Penicillium* spp. con un 25 % y *Geotrichum* spp. con un 22 %. No obstante, de los géneros *Aspergillus* spp. y *Mucor* spp. exhibieron menor presencia con un 15 % y 3 %, respectivamente, indicando que también están asociados a los cultivos de café del departamento Norte de Santander.

El uso específico de medios de cultivo para el crecimiento y su posterior caracterización muestran diferencias marcadas tanto en la macroscopía, como en la microscopía. Dichas diferencias permiten la identificación exitosa del género de cada uno de los aislamientos y son una herramienta complementaria en las técnicas de identificación molecular.

Las diferentes variables fisicoquímicas (pH,  $A_w$  y porcentaje de humedad) condicionan el crecimiento y proliferación de los hongos en el grano de café, dicho comportamiento juega un papel importante en las condiciones medioambientales requeridas por estos hongos, ya que este tipo de café contiene un alto porcentaje de humedad y valores de  $A_w$ , además, los valores de pH son óptimos para el crecimiento de los mismos, y esto hace que el café tipo cereza sea más susceptible a la colonización de mohos tanto toxigénicos como los que no tienen este potencial.

Con base a los análisis de varianza por procedencia, a los resultados de los grupos homogéneos de las pruebas de múltiples rangos y al análisis discriminante y de clúster, se logró determinar que existen diferencias estadísticamente significativas y similitudes entre los municipios muestreados, estableciendo de esta manera dos grandes grupos correlacionados entre sí, uno correspondió a Arboledas, Cucutilla y Salazar y el otro, al restante de los municipios, todo esto, de acuerdo a las variables fisicoquímicas.

Se demostró que el 100 % de los aislamientos característicos de *Aspergillus* spp., aislados de los diferentes municipios, no tienen la facultad de producir aflatoxinas, lo cual indica que este tipo de café no representa un riesgo para la salud de los consumidores en asociación a este tipo de toxina y que el café cultivado no presenta entre su microbiota autóctona, cepas aflatoxigénicas, sin embargo, la corroboración de tales resultados resultaría factible.

El empleo de medios de cultivo para la determinación de aflatoxinas, resulta ser una herramienta rápida, fácil, sencilla y económica para tal fin; esto se ha demostrado gracias al frecuente uso de esta metodología y a los resultados confiables que se han obtenido. Así mismo, el uso de dos métodos diferentes pero considerados como medios de cultivo, convalidan los resultados que se alcanzan entre sí, ya que la respuesta del color rosa de las colonias cuando es sometida a vapores amoniacaes permite la rápida identificación de cepas productoras de aflatoxinas con la utilización de la iluminación UV.

La identificación molecular mediante el uso de las regiones ITS1 e ITS2, permitió confirmar la identidad de cuatro (4) de los cinco (5) géneros determinados por la caracterización fenotípica, correspondiendo a los géneros *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Geotrichum* spp. y *Penicillium* spp. Sin embargo, dos (2) de estos aislamientos pudieron ser identificados a nivel de especie, como lo es *Aspergillus flavus* y *Geotrichum candidum*, mientras que *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp. sólo se identificaron hasta el taxón de género, indicando de esta forma, que los marcadores moleculares empleados, no aportaron la suficiente información para alcanzar el objetivo.

## 8. RECOMENDACIONES

Como se menciona anteriormente, este estudio se realizó en 8 municipios del departamento Norte de Santander, con el objetivo de determinar la presencia de los hongos asociados al café tipo cereza, sin embargo, sería conveniente realizar un muestreo mayor por procedencia y en todos los municipios del departamento que cultivan este fruto.

Realizar la identificación molecular del total de las cepas que fueron aisladas a partir del café tipo cereza, con el fin de establecer la identidad de los aislamientos y de esta manera conocer con mayor profundidad la microbiota autóctona y su presencia.

Se recomienda que para próximas investigaciones donde se empleen medios de cultivo para la detección de aflatoxinas, se realice una comparación y corroboración de los resultados, mediante técnicas analíticas e inmunológicas, ya que estos análisis contienen límites de detección y son más sensibles para la cuantificación, además de poder especificar el tipo de micotoxina, que los métodos culturales no permiten.

Con la finalidad de advertir sobre la seguridad e inocuidad del café que se produce en el departamento Norte de Santander y en general en Colombia, se sugiere que, para futuras investigaciones, se realice una detección y determinación de un mayor número de micotoxinas (aflatoxinas, OTA, fumonisinas, desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, entre otras), además de realizar estos hallazgos no sólo en la primera etapa de beneficio del café, sino en cada una de sus etapas.

Como nos ha demostrado esta investigación, la utilidad de las regiones ITS1 e ITS2 para establecer la identidad de las especies, ha sido moderadamente airoso, por tal motivo, el uso de otros marcadores moleculares o del análisis multilocus, permitiría solventar el bajo nivel de utilidad de los marcadores utilizados y establecer con acierto la identidad de las especies aisladas.

## 9. REFERENCIAS

- Abbas, H., Zablotowicz, R., Weaver, M., Horn, B., Xie, W., Shier, W. (2004). Comparison of cultural and analytical methods for determination of aflatoxin production by Mississippi Delta *Aspergillus* isolates. *Can. J. Microbiol.* 50: 193–199. doi: 10.1139/W04-006.
- Abbas, H., Shier, W., Horn, B., Weaver, M. (2004). Cultural Methods for Aflatoxin Detection. *Journal of Toxicology TOXIN REVIEWS*. Vol. 23, Nos. 2 & 3, pp. 295-315. DOI: 10.1081ITXR-200027854
- Acevedo, Y. (2013). Taxonomía molecular de aislamientos de *Fusarium* obtenidos a partir de muestras clínicas. (Tesis de grado/ Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Alkhersan, RN, Khudor, MH y Abbas, BA (2016). Detección rápida de cepas de *Aspergillus flavus* productoras de aflatoxígenos a partir de alimentos para aves de corral mediante luz ultravioleta y vapor de amoníaco. Inédito. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.36371.02086>
- Alvarado M. Rojas, G. (1994). Cultivo y Beneficiado del Café. Primera edición. San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia.
- Álvaro, M. (2010). Estudio de las condiciones de almacenamiento de café verde y café pergamino (*Coffea arabica*). (Tesis de grado/ Tesis de maestría). UNIVERSIDAD VERACRUZANA Xalapa de Enríquez, Veracruz, México.
- Amezqueta, S., Gonzalez, E., Murillo, M., Lopez, A. (2008). Ochratoxin A decontamination: a review *Food Control*, 20, pp. 326-333
- Andino, F., & Castillo, Y. (2010). Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria. Curso Microbiología de los alimentos: Universidad Nacional de Ingeniería UNI – Norte. Estelí, Nicaragua.
- Arcila, J. (2007). Factores que determinan la productividad del cafetal. Sistemas de producción de café en Colombia. *Cenicafé*. Pp. 61-86. Recuperado de <https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/720/4/3.%20Factores%20que%20determinan%20productividad%20cafetal.pdf>. Consultado 08/08/2020.
- Ayala, A. (2017). Identificación de hongos potencialmente micotoxigénicos, asociados al café tostado. (Trabajo de grado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, México.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. St. Paul,

Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.

- Beer, J.; Muschler, R.; Kass D. y Somarriba, E. (1998). Shade management in coffee and cacao plantations. *Agroforestry Systems*, 38: 139–164.
- Bogantes, P., Bogantes, D., Bogantes, S. (2004). Aflatoxinas. *Acta Médica Costarricense*, 46(4), 174-178. Recuperado de [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-60022004000400004&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022004000400004&lng=en&tlng=es)
- Bokhari, F. (2007). Mycotoxins and toxigenic fungi in Arabic coffee beans in Saudi Arabia. *Advances in Biological Research*, 1, pp.56-66.
- Bokhari, F. & Aly, M. (2009). Evolution of traditional means of roasting and mycotoxins contaminated coffee beans in Saudi Arabia *Advances in Biological Research*, 3, pp.71-78
- Bolet, M. & Socarrás, M. (2005). Micotoxinas y cáncer. *Rev Cubana Invest Biomed*; 24(1):54-59
- Cajiao, A., Rojas, L., Ayala, C., Sánchez, E. (2016). Aislamiento de hongos asociados al grano de café provenientes de las zonas productoras en Norte de Santander- Colombia. @LIMENTECH CIENCIA Y TECNOLOGÍA ALIMENTARIA ISSN 1692-7125. Volumen 14 No. 1, p. 49 – 57
- Cañedo, V. y Ames, T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Lima: Centro internacional de la papa. Recuperado de: <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>
- Carvajal, M. (2013). Transformación de aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1-ADN. DR © TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 16 (2): 109-120. Recuperado en 19 de noviembre de 2020, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-888X2013000200004&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2013000200004&lng=es&tlng=es).
- Carrillo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Salta.
- Dhakal A, Sbar E. Aflatoxin Toxicity. [Updated 2020 Nov 10]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557781/>
- Colombiamapas.net (s.f.). Mapa político de Norte de Santander. Recuperado de <https://www.colombiamapas.net/mapa/mapa-norte-de-santander->

[mapamundi.html](#)

- Cotty, P.J. 1988. Simple fluorescence method for rapid estimation of aflatoxin levels in a solid culture medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 274-276.
- Culliao, A. & Barcelo. (2015). Fungal and mycotoxin contamination of coffee beans in Benguet province, Philippines. *Food Additives and Contaminants*, 32, pp. 250-260.
- Davis, N., Iyer, S., Diener, U. (1987). Improved Method of Screening for Aflatoxin with a Coconut Agar Medium. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Vol. 53, No. 7, p. 1593-1595.
- Dyer, S.K., McCammon, S., 1994. Detection of toxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and related species on coconut cream agar. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 75–78.
- Duarte, S. & Villamil, L. (2006). Micotoxins in Public Health. *Rev. salud pública. Sup.* 8(1): 129-135.
- Echeverri, D., Buitrago, L., Montes, F., Mejía, I., González, M. (2005). Coffee for cardiologist. *Revista colombiana de cardiología*, Vol. 11 No. 8 ISSN 0120-5633
- Ehrlich, K., Chang, P., Yu, J., Cotty, P. (2004). Aflatoxin Biosynthesis Cluster Gene *cypA* Is Required for G Aflatoxin Formation. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Vol. 70, No. 11, p. 6518–6524 DOI: 10.1128/AEM.70.11.6518–6524.2004
- FAO. (2006). Reducing Ochratoxin A in Coffea. Recuperado de <http://www.coffee-ota.org>. Consultado 08/08/2020.
- FAO/OMS. (2007). Documento de debate sobre la contaminación de los higos secos por aflatoxinas. programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comité del codex sobre contaminantes de los alimentos 1ª reunión, Beijing (China), 16 – 20 de abril de 2007. Recuperado de [http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCCF/cccf1/cf01\\_20s.pdf](http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCCF/cccf1/cf01_20s.pdf)
- FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS (2014). Comportamiento de la industria cafetera colombiana. Recuperado de [https://federaciondefeteros.org/static/files/Informe\\_Industrial\\_2014\\_Web.pdf](https://federaciondefeteros.org/static/files/Informe_Industrial_2014_Web.pdf). Consultado 07/08/2020.
- FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS (2018). Comportamiento de la industria cafetera colombiana. Recuperado de

[https://federaciondecafeteros.org/app/uploads/2019/10/Informe de la Industria Cafetera 20182.pdf](https://federaciondecafeteros.org/app/uploads/2019/10/Informe_de_la_Industria_Cafetera_20182.pdf). Consultado 07/08/2020.

- FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS. (2020). Producción de café de Colombia cerró en 14,8 millones de sacos. Recuperado de <https://federaciondecafeteros.org/wp/listado-noticias/produccion-de-cafe-de-colombia-cerro-el-2019-en-148-millones-de-sacos/>. Consultado 07/08/2020.
- Fente, C., Jaimez, J., Vázquez, B., Franco, C., Cepeda, A. (2001). New Additive for Culture Media for Rapid Identification of Aflatoxin-Producing *Aspergillus* Strains. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Vol. 67, No. 10 p. 4858–486. DOI: 10.1128/AEM.67.10.4858–4862.2001
- Food-Info.net. (2017). La planta de café. Recuperado de: <http://www.food-info.net/es/products/coffee/plant.htm> Consultado 10/08/2020
- Food-Info. Net. (2017). Aflatoxinas. Recuperado de <http://www.food-info.net/uk/tox/afla.htm>
- Francis, O., Kirschenheuter, J., Ware, G., Carmen, A., Kuan, S. (1988).  $\beta$ -Cyclodextrin post-column fluorescence enhancement of aflatoxins for reverse-phase liquid chromatographic determination in corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71: 725-728.
- Franco, H., Vega, A., Reyes, S., De León, J., Bonilla, A. (2014). Niveles de Ocratoxina A y Aflatoxinas totales en cafés de exportación de Panamá por un método de ELISA. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 64 (1).
- Galindo, X. (2011). Producción e industrialización de café soluble caso: café instantáneo. (Tesis de pregrado, Universidad de Guayaquil. Recuperado de <http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2017/01/Galindo-Veliz-Xiomara-Raiza.pdf>. Consultado 10/08/2020
- Gagkaeva, T. (2008). Introduction to *Fusarium* taxonomy. Laboratory of Mycology and Phytopathology, All-Russian Institute of Plant Protection. St. Petersburg, Russia
- Gamboa, M.A. (2012). Presence of *Aspergillus* and other fungal symbionts in coffee beans from Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 17(1), 39-50.
- Garrido, E., Hernández, E., Espinosa, N., Camas R., Quiroga, R., Rincón, M., Farrera, L. (2018). Identification of fungi and mycotoxins associated to coffee beans (*coffea l.*) in chiapas, Mexico. *Agroproductividad*: Vol. 11, Núm. 12, pp: 57-64. <https://doi.org/10.32854/agrop.v11i12.1307>

- Garzón, N. (2013). Caracterización e identificación molecular de hongos de suelo aislados de los páramos de guasca y cruz verde, Cundinamarca, Colombia. (Tesis de grado/ Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Gimeno, A. (2002). Principales factores condicionantes para el desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas. Recuperado de <https://www.engormix.com/micotoxinas/articulos/principales-factores-condicionantes-desarrollo-t26065.htm>
- Geremew, T., Abate, D., Landschoot, S., Haesaert, G., Audenaert, K. (2016). Occurrence of toxigenic fungi and ochratoxin A in Ethiopian coffee for local consumption. *Food Control* Vol 69, Pages 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.025>
- Giraldo, J., Niño, C., Vianchá, Z. (2017). Análisis de buenas prácticas en el proceso de beneficio del café: experiencia de estudio en el municipio de Viotá (Cundinamarca, Colombia), *Ingeniería Solidaria*, vol. 13, (22), pp. 121-135. doi: <http://dx.doi.org/10.16925/in.v13i22.1839>
- Hara, S., Fennell, D., Hesseltine, C. (1974). Aflatoxin-Producing Strains of *Aspergillus flavus* Detected by Fluorescence of Agar Medium Under Ultraviolet Light. *APPLIED MICROBIOLOGY*, Vol. 27, No. 6 p.1118-1123.
- Harris J. L. (2000). Safe, low-distortion tape touch method for fungal slide mounts. *Journal of clinical microbiology*, 38(12), 4683–4684. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.12.4683-4684.2000>
- Heenan, C.N.; Shaw, K.J.; Pitt, J.I. (1998) Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *J. Food Mycol.* 1, 67–72.
- Holzhauser, D., Delatour, T., Marin, M., Junod, S., Guignard, G., Pigué, D., Richoz, J., Bezencon, C., Schilter, B., Cavin, C. (2003). Ochratoxin A: toxicity and carcinogenicity. *Toxicology Letters*, 144, p.s65
- Horisawa, S., Sakuma, Y., Doi, S. (2009). Qualitative and quantitative PCR methods using species-specific primer for detection and identification of wood rot fungi. *Journal of Wood Science*, DOI 10.1007/s10086-008-1011-3.
- International Coffee Organization –ICO-. (2016). Exportable production by all exporting countries. London: ICO. Retrieved from [http://www.ico.org/new\\_historical.asp?section=Statistics](http://www.ico.org/new_historical.asp?section=Statistics) Consultado 07/08/2020.

- International Coffee Organization –ICO-. (2019). Informe de la OIC sobre desarrollo cafetero de 2019. Recuperado de <http://www.ico.org/documents/cy2018-19/ed-2318c-overview-flagship-report.pdf>. Consultado 07/08/2020.
- Jaramillo, E. (2011). Prevalencia de aflatoxinas en la producción de café tostado. Proyecto final de graduación presentado como requisito parcial para optar por el título de Master en administración de programas sanitarios con énfasis en inocuidad de alimentos, Universidad para la Cooperación Internacional, Costa Rica.
- Jiménez, F., Varela, L., Perraud, I., Morales, A., Rodríguez, G. (2017). Biodiversidad de hongos potencialmente micotoxigénicos presente en cerezas y grano de café de la región de Huatusco, Veracruz. Trabajo presentado en XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Puerto Vallarta, Jalisco.
- Jiménez, H. (2018). Generalidades del cultivo del café. Diplomado en producción sostenible y empresarial de café. Recuperado de [file:///C:/Users/HP\\_14R021LA/Downloads/1-1-aspectos-generales.pdf](file:///C:/Users/HP_14R021LA/Downloads/1-1-aspectos-generales.pdf). Consultado 10/08/2020.
- Kumar S, Shekhar M, Ali KA, Sharma P (2007). A rapid technique for detection of toxigenic and non-toxigenic strain of *Aspergillus flavus* from maize grain. *Ind. Phytopathol.* 1: 31-34.
- Lin, M. & Dianese, J. (1976). A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology*, 66: 1466-1469.
- Leslie, J. & Summerell, B. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Luna, A. (2010). Aislamiento de cepas de *Aspergillus niger*, productoras de ocratoxina A, en café verde (*Coffea arabica*) almacenado; *Revista mexicana de micología* 32: 63-68
- Medina, M., Namijira, J., Alcarraz, M. (2002). Determinación de aflatoxinas en algunos productos naturales utilizando el medio agar coco y Elisa ligada. *Ciencia e investigación* Vol, (2), pp. 46-54.
- Méndez, I. (2011). Paquete tecnológico Café Robusta (*Coffea canephora*). Recuperado de [file:///C:/Users/HP\\_14R021LA/Downloads/Paquete tecnologico cafe robusta Paquete.pdf](file:///C:/Users/HP_14R021LA/Downloads/Paquete_tecnologico_cafe_robusta_Paquete.pdf). Consultado 11/08/2020.

- Mercedes, H. (2011). Caracterización fenotípica y molecular de hongos filamentos oportunistas: *Scedosporium*, *Acremonium*, *Phialemonium*, *Lecythophora* y *Paecilomyces*. (Tesis de grado/ tesis doctoral). Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, Cataluña, España.
- Moraleja, A., Font, G., Manes, J., Ferrer, E. (2015). Simultaneous determination of mycotoxin in commercial coffee. *Food Control*, 57, pp. 282-292
- Munsell Color Company (2000). Munsell Soil Color Charts. Munsell Color GretagMacbeth, New Windsor, New York.
- 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*
- 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): p. 197-202.
- Ocampo, O. & Álvarez, L. (2017). Tendencia de la producción y el consumo del café en Colombia. *Apuntes CENES* 36(64): p 139-165. DOI: <https://doi.org/10.19053/01203053.v36.n64.2017.5419>
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2018). Micotoxinas. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>. Consultado 05/08/ 2020.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2018). Aflatoxinas. Recuperado de [https://www.who.int/foodsafety/FSDigest\\_Aflatoxins\\_SP.pdf?ua=1](https://www.who.int/foodsafety/FSDigest_Aflatoxins_SP.pdf?ua=1). Consultado 20/08/2020
- Orozco, F. (1986). Descripción de especies y variedades de café. Cenicafé. Recuperado de <https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/597/1/011.pdf>. Consultado 11/08/2020
- Ouattara, P., Nikiema, P., Barro, N., Savadogo, A., Traore, A. (2012). Aflatoxigenic potential of *Aspergillus* spp. isolated from groundnut seeds, in Burkina Faso, West Africa. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(11), pp. 2603-2609. DOI: 10.5897/AJMR11.791
- Paterson, R., Lima, N., Taniwaki, M. (2014). Coffee, mycotoxins and climate change. *Food Research International*, 61, pp. 1-15

- Peraica, M., B. Radic, A. Lucic, M. Pavlovic, (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization* 77: 754-766.
- Pérez, J. (2013). Economía cafetera y desarrollo económico en Colombia. Recuperado de [https://www.utadeo.edu.co/files/node/publication/field\\_attached\\_file/pdf-\\_economia\\_cafetera- web- pag- 24-09-15.pdf](https://www.utadeo.edu.co/files/node/publication/field_attached_file/pdf-_economia_cafetera- web- pag- 24-09-15.pdf). Consultado 07/08/2020.
- Pérez, L. (2014). Evolution to Fusarium Taxonomy: Morphological, Biological and Phylogenetic Diagnostic Concepts. Featured in Regional Workshop on Prevention and diagnostic of Fusarium Wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical Race 4 (TR4), Port Spain, Trinidad and Tobago.
- Pinzón, Y., Bustamante, S., Buitrago, G. (2009). Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame. *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol XI N° 2.
- Pitt, J. & Hocking, A. (2009). *Fungi and food spoilage*. Third edition. New York: Springer-Verlag.
- Puerta, G. (2015). Buenas Prácticas: estrategias para asegurar la calidad del café. (Cenicafé). VIII cumbre del servicio de extensión rural: retos para una caficultura productiva y de calidad (comité Tolima). Recuperado de <https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/600/1/38911.pdf>. Consultado 15/08/2020.
- Puerta, G. (2006). Buenas Prácticas Agrícolas para el Café. (Cenicafé). Recuperado de <https://www.cenicafe.org/es/publications/avt0349.pdf>. Consultado 15/08/2020.
- Puerta, G. (2011). Composición química de una taza de café. (Cenicafé) 414; 1-12. Recuperado de <https://www.cenicafe.org/es/publications/avt04142.pdf>. Consultado 15/08/2020.
- Ramos P., Sanz J., Oliveros, C. (2010). Identificación y clasificación de frutos de café en tiempo real a través de la medición de color. *Cenicafé*, 61(4):315-326.
- Requena, F.; Saume, E.; León, A. 2005. Micotoxinas: Riesgos y prevención. *Zootecnia Trop.* vol.23, No. 4.
- Rezende, E., Borges, J., Cirillo, M., Prado, G., Paiva, L., Batista, L. (2013). Ochratoxigenic fungi associated with green coffee beans (*Coffea*

- arabica L.) in conventional and organic cultivation in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, pp. 377-384
- Roa, G., Oliveros, C., Álvarez, J., Ramírez, C., Sanz, J., Dávila, M., Álvarez, J. R., Zambrano, D., Puerta, G., Rodríguez, N. (1999). Beneficio ecológico del café. Chinchiná: Cenicafé, 300 p.
- Rodríguez, N., Rodríguez, J., Oliveros, C., Ramírez C. (2015). Beneficio del café en Colombia. FNC – Cenicafé. p. 5.
- Rojas C. Liliana, Cajiao Angela, Cárdenas Roberth, Quevedo, Hussey. Aislamiento de hongos en las diferentes etapas del beneficio de café cultivado y comercializado en Toledo, Norte de Santander. (2015). @limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria. ISSN 1692-7125. Volumen 13, No. 2, p. 96-107.
- Rojas, T. (2005). Contribución al desarrollo de métodos de diagnóstico de cepas aflatoxigénicas en alimentos y piensos. (Tesis de grado/Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Saito, M. & Machida, S. (1999). A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience*, 40(2): 205-208.
- Samson, R., Visagie, C., Houbraken, J., Hong, S., Hubka, V., & Klaassen, C. *et al.*, (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies In Mycology*, 78, 141-173. Doi: 10.1016/j.simyco.2014.07.004
- Santos, O. (1999). Importancia y efectos de la Aflatoxina en los seres humanos. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Bucaramanga. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/b55c/81a62861a4db758cd8708b9a11a636381ebe.pdf>. Consultado 08/08/2020
- Silva, C., Schwan, R., Dias, E., Wheals, A. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 60, pp. 251-260.
- Soliman, K. (2005). Effect of variety, locality and processing of coffee beans on the detection and determination of aflatoxin. *International Journal of Agriculture and Biology*, 7, pp. 5-10.
- Suárez, M., Gonzalez, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr, S., Pierre J. (2004). Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. *International Journal Of Food Science And Technology*, 39(5), 501-507.

- Summerell, B., Salleh, B., Leslie, J. (2003). A utilitarian Approach to Fusarium identification. *Plant Disease*, 87 (2): pp. 117-128.
- Summerell, Brett A. (2019). "Resolving Fusarium: Current Status of the Genus." *Annual review of phytopathology* vol. 57: 323-339. doi:10.1146/annurev-phyto-082718-100204
- Torres, M., Aparicio, J., García, J. (2014). La aflatoxicosis: un problema a resolver dentro de la medicina veterinaria. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*. vol. 15, pp. 1-34. [Fecha de Consulta 19 de noviembre de 2020]. ISSN:. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=636/63632380010>
- Tsang, C., Tang, J., Lau, S., Woo, P. (2018). "Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era - Past, present and future." *Computational and structural biotechnology journal* vol. 16: 197-210. doi:10.1016/j.csbj.2018.05.003
- Urbano, G.R., Taniwaki, M.H., Leitao, M.F.D.F. & Vicentini, M.C. (2001). Occurrence of ochratoxin A producing fungus in raw Brazilian coffee. *Journal of Food Protection*, 68, 1226–1230.
- Visagie, C., Houbraken, J., Frisvad, J., Hong, S., Klaassen, C., & Perrone, G. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies In Mycology*, 78, 343-371. doi: 10.1016/j.simyco.2014.09.001
- Visagie, C., Varga, J., Houbraken, J., Meijer, M., Kocsubé, S., & Yilmaz, N. *et al.* (2014). Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Studies In Mycology*, 78, 1-61. doi: 10.1016/j.simyco.2014.07.
- Yazdani, D., Zainal, M., Tan, Y., Kamaruzaman, S. (2010). Evaluation of the detection techniques of toxigenic *Aspergillus* isolates. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(45), pp. 7654-7659. DOI: 10.5897/AJB10.1128
- Yu J. (2012). Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins*, 4(11), 1024–1057. Doi: <https://doi.org/10.3390/toxins4111024>
- Yu, J., Chang, P., Ehrlich, K., Cary, J., Bhatnagar, D., Cleveland, T., Payne, G., Linz, J., Woloshuk, C., Bennett, J. (2004). Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Vol. 70, No. 3p. 1253–1262. DOI: 10.1128/AEM.70.3.1253–1262.2004

## 10. ANEXOS

**Anexo 1.** *Valores promedio de variables fisicoquímicas (pH, porcentaje de humedad y actividad de agua)*

<b>CODIGO</b>	<b>PROCEDENCIA</b>	<b>pH</b>	<b>Aw</b>	<b>HUMEDAD</b>
X001	Cucutilla	4,08	0,96	66,86 %
X002	Cucutilla	4,48	0,90	67,68 %
X003	Cucutilla	4,19	0,96	68,98 %
X004	Cucutilla	4,48	0,97	67,37 %
X005	Cucutilla	5,10	0,96	69,60 %
X006	Cucutilla	4,18	0,91	68,70 %
X007	Cucutilla	4,19	0,93	70,46 %
X008	Ragonvalia	8,54	0,89	78,56 %
X009	Ragonvalia	7,76	0,92	73,40 %
X010	Ragonvalia	8,22	0,93	88,07 %
X011	Ragonvalia	4,59	0,89	73,14 %
X012	Ragonvalia	8,56	0,92	71,48 %
X013	Ragonvalia	8,43	0,93	80,44 %
X014	Arboledas	4,61	0,90	71,76 %
X015	Arboledas	5,63	0,92	72,69 %
X016	Arboledas	4,40	0,91	74,04 %
X017	Arboledas	4,14	0,91	73,21 %
X018	Chinácota	8,26	0,91	73,25 %
X019	Chinácota	9,14	0,92	71,10 %
X020	Chinácota	8,94	0,90	71,33 %
X021	Ragonvalia	8,86	0,93	70,98 %
X022	Bochalema	8,99	0,94	68,40 %
X023	Bochalema	9,15	0,95	67,43 %
X024	Bochalema	9,15	0,95	65,26 %
X025	Bochalema	8,48	0,93	61,44 %
X026	Bochalema	8,85	0,95	66,08 %

---

X027	Toledo	8,62	0,96	70,90 %
X028	Toledo	8,86	0,97	67,71 %
X029	Toledo	9,23	0,97	66,60 %
X030	Toledo	9,23	0,97	57,71 %
X031	Toledo	8,61	0,97	63,54 %
X032	Salazar	8,79	0,94	67,38 %
X033	Salazar	9,26	0,95	79,01 %
X034	Salazar	6,11	0,95	72,37 %
X035	Salazar	6,85	0,94	62,60 %
X036	Salazar	5,51	0,95	78,29 %
X037	Salazar	6,01	0,93	72,99 %
X038	Salazar	5,57	0,95	76,49 %
X039	Durania	9,18	0,97	85,51 %
X040	Durania	9,31	0,96	75,83 %
X041	Durania	9,33	0,96	62,77 %
X042	Durania	9,38	0,96	88,78 %
X043	Durania	9,49	0,96	71,68 %
X044	Durania	9,29	0,96	86,43 %

---

**Anexo 2. Composición de los medios usados para la caracterización macroscópica y microscópica de *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp.**

**Solución Czapek concentrada - (Pitt, 1979)**

NaNO <sub>3</sub>	30 g
KCl	5 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	5 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
Agua destilada	100 ml

**Solución elementos traza**

CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,5 g
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
Agua destilada	100 ml

**CYA - (Pitt, 1979)**

Solución Czapek concentrada	10 ml
sacarosa	30 g
Extracto de levadura	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Solución de elementos traza	1ml
Agar bacteriológico	20 g
Agua destilada	1000 ml

**MEA - (Samson et al. 2010)**

Extracto de malta - agar	50 g
Solución metales traza	1 g
Agua destilada	1000 ml

Fuente: Visagie et al., 2014.

**Anexo 3. Composición de los medios usados para la caracterización macroscópica y microscópica de *Fusarium* spp.**

**Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA).**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
KNO <sub>3</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
KCl	0,5 g
Glucose	0,2 g
Sucrose	0,2 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

**Carnation Leaf-Piece Agar (CLA)**

Agar *	20 g
Trozos de hojas de clavel	-
Agua destilada	1000 ml

Fuente: Leslie et al., 2006.

\* Se realizó un cambio de agar-agar por agar PDA, con su respectiva cantidad descrita para un litro de medio de cultivo según la casa comercial OXOID. -: se adicionan trozos de hoja de clavel considerando que todas las placas de Petri contengan el residuo vegetal por todas las partes.

**Anexo 4.** *Composición de los medios usados para la metodología de vapores amoniacales.*

<b>Agar leche de coco (ALC)</b>	
Leche de coco	100 ml
Agar	2 g
Agua destilada	100 ml
<b>Papa Dextrosa Agar (PDA)</b>	
Extracto de patata	4 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
Medio comercial (OXOID)	39 g
<b>Yeast Extact Sucrose (YES)</b>	
Extracto de lavadura	20 g
Sacarosa	150 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

---

Fuente: Heenan et al.,1998; Saito et al., 1999.

**Anexo 5.** *Composición de los medios usados para la metodología de emisión de fluorescencia.*

<b>Agar extracto de coco (AEC)</b>	
Extracto de coco	100 ml
Agar	2 g
Agua destilada	100 ml

<b>Agar coco rallado (ACR)</b>	
Coco rallado comercial	100 g
Agar	6 g
Agua destilada	300 ml

Fuente: Cotty, 1988; Dyer et al., 1994. Heenan et al., 1998.

**Anexo 6. Secuencias ensambladas (consenso) utilizadas en la herramienta BLAST.**

Aislamiento	Secuencia consenso
X010-2	5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCAT TACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTTAATGTTGCCCTCGGCG GATCAGCCCGCGCCCGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCAAACTCTA ATGTTTCTTATTGTAACCTTCTGAGTAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACA ACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAA TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGC TGGTATTCCGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCG GGTGGTGGTGGGGATCGGCTCTGCCTTCTGGCGGTGCCGCCCGGAAATAC ATTGGCGGTCTCGCTGCAGCCTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGG AACGCGGCGCGGCCATGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATC AGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA 3'
X007-1	5' ACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCC CTCTGGGTCCAACCTCCCCACCCGTGTTTATTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGC CCGCCTTAACCTGGCCGCCGGGGGCTTACGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGA AGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATT TAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA AATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGC ACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTG CCCTCAAGCCCGGCTTGNTGTGTTGGGCCCGTCCCCGATCTCCGGGGGACG GGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTT GTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGGCGATCAACCCAAATTTTTNA TCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAAC TTAAGCATATC3'
X001	5' GGAAAGTAAAAAGCTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT CATTAAAGAATTGATAATATTTGTGAAATTTACACAGCAAACAATAATCATAYAATC AAAACAAAATAATCAAAACTTTTAAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGTATCGATGA AGAACGCAGCGAAACGCGATATTTCTTGTGAATTGCAGAAGTGAATCATCAGTTT TTGAACGCACATTGCACTTTGGGGTATCCCCAAAGTATACTTGTTTGAGCGTTG TTTCTCTCTTGAATTGCATTGCTTTTCTAAAATTTCGAATCAAATTCGTTTGAAAA ACAACACTATTCAACCTCAGATCAAGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATC ATAAGCCGGGAGGAAAA3'
X013-4	5' AAAAAAGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAG TGTAGGGTTCTAGCGAGCCCAACCTNCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTT GCTTCGGCGGGCCCGCCATTTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCC GCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGAT TGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGAT GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCGATGAATCA TCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGT CCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGCTCGTCCC CTCTCCGGGGGGGACGGGCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCT CGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGA ACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTG AACTTAAGCATATCATATAA3'

**Anexo 7. Resultado de la comparación de la secuencia problema (X010-2) contra la base de datos UNITE y Warcup fungal RDP, respectivamente.**



Searching for homologs of sequence NoName  
Please wait...

Database(s) used: UNITE (fungi) + INSD ( = GenBank, EMBL, DDBJ) + Envir.  
BLASTN 2.2.29+

Reference: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Database: data/unite\_full\_blastn.fas  
927,240 sequences; 515,440,443 total letters

Query= NoName  
Length=577

Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value
<a href="#">MF509747</a>	Gibberella avenacea	1041	0.0
<a href="#">KX237742</a>	Ophiocordyceps sinensis	1041	0.0
<a href="#">KT963799</a>	Gibberella avenacea	1041	0.0
<a href="#">KT768324</a>	Nectriaceae	1041	0.0
<a href="#">KT768307</a>	Nectriaceae	1041	0.0
<a href="#">KT768224</a>	Nectriaceae	1041	0.0
<a href="#">KT768223</a>	Nectriaceae	1041	0.0
<a href="#">KT759296</a>	Nectriaceae	1041	0.0
<a href="#">KT759285</a>	Nectriaceae	1041	0.0
<a href="#">KT759245</a>	Nectriaceae	1041	0.0
<a href="#">KT759178</a>	Nectriaceae	1041	0.0
<a href="#">KT268767</a>	Fusarium	1041	0.0
<a href="#">KF385354</a>	Fusarium	1041	0.0
<a href="#">KF385271</a>	Fusarium	1041	0.0
<a href="#">KC753424</a>	Fusarium	1041	0.0
<a href="#">HG936695</a>	Nectriaceae	1041	0.0
<a href="#">KQ25692</a>	Nectriaceae	1041	0.0

### Classifier :: Hierarchy View

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.11, September 2015  
 Taxonomical Hierarchy: Warcup Fungal ITS trainset 2  
 Query File: classifier\_seq\_upload9056834540041191997.FASTA  
 Query Submit Date:

Display depth:  Confidence threshold:

domain	%	Library
Fungi	100.0	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: #800000;"></div>

Hierarchy View (click a node to make it the root -- only show sequences assigned to that node with confidence above the threshold):

- norank Root (1 sequences) [show assignment detail for Root only]
- » » domain Fungi (1)
- » » » phylum Ascomycota (1)
- » » » » subphylum Pezizomycotina (1)
- » » » » » class Sordariomycetes (1)
- » » » » » » subclass Hypocreomycetidae (1)
- » » » » » » » order Hypocreales (1)
- » » » » » » » » family Nectriaceae (1)
- » » » » » » » » » genus Gibberella (1)
- » » » » » » » » » » unclassified\_Gibberella (1)

**Anexo 8. Resultado de la comparación de la secuencia problema (X007-1) contra la base de datos UNITE y Warcup fungal RDP, respectivamente.**

**unite**  
community

Searching for homologs of sequence NoName  
Please wait...

Database(s) used: UNITE (fungi) + INSD (= GenBank, EMBL, DDBJ) + Envir.

BLASTN 2.2.29+

Reference: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Database: data/unite\_full\_blastn.fas  
927,240 sequences; 515,440,443 total letters

Query= NoName  
Length=585

Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value
<a href="#">JX317421</a>	Penicillium	1040	0.0
<a href="#">KX462903</a>	Penicillium	1032	0.0
<a href="#">MG009431</a>	Penicillium solitum	1031	0.0
<a href="#">LTS58920</a>	Penicillium solitum	1031	0.0
<a href="#">KY906188</a>	Penicillium solitum	1031	0.0
<a href="#">KY906187</a>	Penicillium solitum	1031	0.0
<a href="#">KY906186</a>	Penicillium solitum	1031	0.0
<a href="#">KY174328</a>	Penicillium commune	1031	0.0
<a href="#">KX674626</a>	Penicillium commune	1031	0.0
<a href="#">KX243326</a>	Penicillium expansum	1031	0.0
<a href="#">KR012904</a>	Penicillium commune	1031	0.0
<a href="#">KF367509</a>	Penicillium	1031	0.0
<a href="#">KF367508</a>	Penicillium	1031	0.0
<a href="#">KF367507</a>	Penicillium	1031	0.0
<a href="#">KF367505</a>	Penicillium	1031	0.0
<a href="#">KC193255</a>	Penicillium solitum	1031	0.0
<a href="#">KX462903</a>	Penicillium	1031	0.0

**Classifier :: Hierarchy View**

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.11, September 2015  
 Taxonomical Hierarchy: Warcup Fungal ITS trainset 2  
 Query File: classifier\_seq\_upload6476479124696312716.FASTA  
 Query Submit Date:

Display depth:  Confidence threshold:

domain	%	Library
Fungi	100.0	

Hierarchy View (click a node to make it the root -- only show sequences assigned to that node with confidence above the threshold):

norank Root (1 sequences) [show assignment detail for Root only]

- » » domain Fungi (1)
  - » » » phylum Ascomycota (1)
    - » » » » subphylum Pezizomycotina (1)
      - » » » » » class Eurotiomycetes (1)
        - » » » » » » subclass Eurotiomycetidae (1)
          - » » » » » » » order Eurotiales (1)
            - » » » » » » » » family Trichomaceae (1)
              - » » » » » » » » » genus Eupenicillium (1)
                - » » » » » » » » » » unclassified\_Eupenicillium (1)

**Anexo 9. Resultado de la comparación de la secuencia problema (X001) contra la base de datos UNITE y Warcup fungal RDP., respectivamente.**



Searching for homologs of sequence NoName  
Please wait...

Database(s) used: UNITE (fungi) + INSD (= GenBank, EMBL, DDBJ) + Envir.

BLASTN 2.2.29+

Reference: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Database: data/unite\_full\_blastn.fas  
927,240 sequences; 515,440,443 total letters

Query= NoName  
Length=404

Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value
<a href="#">HG936031</a>	Dipodascaceae	684	0.0
<a href="#">HG936028</a>	Dipodascaceae	684	0.0
<a href="#">HG936022</a>	Dipodascaceae	684	0.0
<a href="#">HG936021</a>	Dipodascaceae	684	0.0
<a href="#">HG936005</a>	Dipodascaceae	684	0.0
<a href="#">KF112070</a>	Dipodascus geotrichum	681	0.0
<a href="#">MF782775</a>	Dipodascus geotrichum	679	0.0
<a href="#">KF493938</a>	Dipodascaceae	679	0.0
<a href="#">KC143750</a>	Dipodascaceae	679	0.0
<a href="#">KC143430</a>	Dipodascaceae	679	0.0
<a href="#">KC143429</a>	Dipodascaceae	679	0.0
<a href="#">KC143421</a>	Dipodascaceae	679	0.0
<a href="#">KC143420</a>	Dipodascaceae	679	0.0
<a href="#">KC143413</a>	Dipodascaceae	679	0.0
<a href="#">KC143412</a>	Dipodascaceae	679	0.0
<a href="#">KC143410</a>	Dipodascaceae	679	0.0

**Classifier :: Hierarchy View**

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.11, September 2015  
 Taxonomical Hierarchy: Warcup Fungal ITS trainset 2  
 Query File: classifier\_seq\_upload3901357151904447272.FASTA  
 Query Submit Date:

Display depth:  Confidence threshold:

domain	%	Library
Fungi	100.0	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: #800000;"></div>

Hierarchy View (click a node to make it the root -- only show sequences assigned to that node with confidence above the threshold):

- norank Root (1 sequences) [show assignment detail for Root only]
- » » domain Fungi (1)
- » » » phylum Ascomycota (1)
- » » » » subphylum Saccharomycotina (1)
- » » » » » class Saccharomycetes (1)
- » » » » » » subclass Saccharomycetidae (1)
- » » » » » » » order Saccharomycetales (1)
- » » » » » » » » family Dipodascaceae (1)
- » » » » » » » » » genus Geotrichum (1)
- » » » » » » » » » » unclassified\_Geotrichum (1)

**Anexo 10. Resultado de la comparación de la secuencia problema (X013-4) contra la base de datos UNITE y Warcup fungal RDP, respectivamente.**



Searching for homologs of sequence NoName  
Please wait...

Database(s) used: UNITE (fungi) + INSD ( = GenBank, EMBL, DDBJ) + Envir.

BLASTN 2.2.29+

Reference: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Database: data/unite\_full\_blastn.fas  
927,240 sequences; 515,440,443 total letters

Query= NoName  
Length=607

Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value
<a href="#">KY643754</a>	Aspergillus	1074	0.0
<a href="#">MG734749</a>	Aspergillus flavus	1068	0.0
<a href="#">LC385527</a>	Aspergillus flavus	1068	0.0
<a href="#">KY643757</a>	Aspergillus	1068	0.0
<a href="#">JX232269</a>	Aspergillus flavus	1068	0.0
<a href="#">MH746006</a>	Aspergillus flavus	1067	0.0
<a href="#">MH578599</a>	Aspergillus flavus	1067	0.0
<a href="#">MH279454</a>	Aspergillus flavus	1067	0.0
<a href="#">MH279453</a>	Aspergillus flavus	1067	0.0
<a href="#">MH279451</a>	Aspergillus flavus	1067	0.0
<a href="#">MH279414</a>	Aspergillus flavus	1067	0.0
<a href="#">MH279413</a>	Aspergillus flavus	1067	0.0
<a href="#">MH279412</a>	Aspergillus flavus	1067	0.0
<a href="#">MH279411</a>	Aspergillus flavus	1067	0.0
<a href="#">MH279409</a>	Aspergillus flavus	1067	0.0
<a href="#">MH279407</a>	Aspergillus flavus	1067	0.0

**Classifier :: Hierarchy View**

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.11, September 2015  
 Taxonomical Hierarchy: Warcup Fungal ITS trainset 2  
 Query File: classifier\_seq\_upload468221697917987280.FASTA  
 Query Submit Date:

Display depth:  Confidence threshold:

domain	%	Library
Fungi	100.0	

Hierarchy View (click a node to make it the root -- only show sequences assigned to that node with confidence above the threshold):

- norank Root (1 sequences) [show assignment detail for Root only]
- » » domain Fungi (1)
- » » » phylum Ascomycota (1)
- » » » » subphylum Pezizomycotina (1)
- » » » » » class Eurotiomycetes (1)
- » » » » » » subclass Eurotiomycetidae (1)
- » » » » » » » order Eurotiales (1)
- » » » » » » » » family Trichocomaceae (1)
- » » » » » » » » » genus Petromyces (1)
- » » » » » » » » » » species Aspergillus flavus (1)