



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Determinación de la actividad antifúngica de biomasa y lipopéptidos de un aislamiento de *Bacillus subtilis* durante la antibiosis contra hongos filamentosos de la poscosecha de cacao

Palacios Gonzaga, María Fernanda

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria

Ing. Falconí Saá, César Eduardo., Ph.D

2 de septiembre de 2021

Urkund AnalysisResult

Analysed Document: D99273940 Título del trabajo de titulación
Determinación de la actividad antifúngica de biomasa y lipopéptidos de
un aislamiento de Bacillus subtilis durante la antibiosis contra hongos
filamentosos de la poscosecha de cacao

aprobado.pdf (D110949229) Submitted: Fecha y hora 8/3/2021
1:42:00 AM

Submitted By: César E. Falconí Saá correo institucional cefalconi@espe.edu.ec

Significance: 6 %

Sources included in the report:

"Determinación de la actividad antifúngica de biomasa y lipopéptidos de un aislamiento de Bacillus subtilis durante la antibiosis contra hongos filamentosos de la poscosecha de cacao (D11094922)

Firma:



Firmado electrónicamente por:
**CESAR EDUARDO
FALCONI SAA**

.....
PhD. Falconi Saá, César Eduardo
C. C. 06015564594
DIRECTOR



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación "**Determinación de la actividad antifúngica de biomasa y lipopéptidos de un aislamiento de *Bacillus subtilis* durante la antibiosis contra hongos filamentosos de la poscosecha de cacao**" fue realizado por la señorita **Palacios Gonzaga, María Fernanda** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 03 de agosto de 2021

Firma:



firmado electrónicamente por:
**CESAR EDUARDO
FALCONI SAA**

Ing. Falconí Saá, César Eduardo Ph.D

C.C.: 0601556459



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Palacios Gonzaga, María Fernanda**, con cédula de ciudadanía N° 2100394648 declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Determinación de la actividad antifúngica de biomasa y lipopéptidos de un aislamiento de *Bacillus subtilis* durante la antibiosis contra hongos filamentosos de la poscosecha de cacao** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 3 de agosto de 2021

.....
Palacios Gonzaga, María Fernanda

C.C.: 2100394648



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Palacios Gonzaga, María Fernanda** con cédula de ciudadanía N° 2100394648, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Determinación de la actividad antifúngica de biomasa y lipopéptidos de un aislamiento de *Bacillus subtilis* durante la antibiosis contra hongos filamentosos de la poscosecha de cacao”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 3 de agosto de 2021

.....
Palacios Gonzaga, María Fernanda

C.C.: 2100394648

Dedicatoria

¡Que la gloria y honra sea siempre de Nuestro Señor Jesús!

A mi madre y hermana, Estela y Jhosselin, por brindarme su amor, tiempo y consejos para seguir adelante, por siempre haber confiado en mí y motivado a cumplir mis sueños.

A mi padre, José Rubén, por su cariño y su ayuda siempre que la necesito.

A mi familia, quienes me han apoyado y acompañado en cada momento de mi vida, a ellos les dedico este trabajo.

Agradecimientos

A la Carrera de Ingeniería Agropecuaria de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, a todo su personal docente, administrativo y de servicios por haberme acogido durante todo mi proceso de formación profesional.

Al Ing. César Falconí Saá, por todos sus valiosos conocimientos y consejos compartidos, a siempre persistir, además de su apoyo y confianza incondicional durante la realización de este proyecto de investigación.

A la Dirección General de Investigación y Vinculación de la Universidad de las Américas, en especial a la Dra. Viviana Yáñez Mendizábal, por enseñarme que la actitud y el compromiso a nuestro trabajo es lo que nos hace diferentes.

A mis amigos, quienes han sido mi soporte y hemos compartido maravillosas aventuras que las guardo en mi corazón.

Índice de contenidos

Carátula	1
Reporte Urkund.....	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de contenidos	8
Índice de tablas.....	13
Índice de figuras	14
Resumen.....	15
Abstract.....	16
Capítulo I.....	17
Introducción	17
Antecedentes	17
Justificación	19
Objetivos.....	20
<i>Objetivo general</i>	20
<i>Objetivos específicos</i>	20

Hipótesis	21
Capítulo II.....	22
Marco Referencial.....	22
Cacao CCN-51	22
Proceso de la fermentación del cacao	22
<i>Pulpa de cacao</i>	22
<i>Fermentación microbiana</i>	23
<i>Levaduras</i>	24
<i>Bacterias ácido lácticas</i>	25
<i>Bacterias ácido acéticas</i>	26
<i>Bacterias formadoras de esporas</i>	26
Hongos filamentosos	28
<i>Aspergillus sp.</i>	28
<i>Penicillium sp.</i>	29
<i>Bacillus subtilis</i>	30
<i>Características</i>	30
<i>Lipopéptidos</i>	30
Biología molecular	32
<i>Identificación molecular de hongos</i>	32
<i>Espaciador transcrito interno-ITS</i>	32
<i>β-tubulina (βenA)</i>	32

Capítulo III.....	34
Materiales y Métodos	34
Ubicación y características del área de estudio	34
<i>Fase de campo</i>	34
Ubicación política.	34
Ubicación geográfica.	34
Ubicación ecológica.	34
<i>Fase de laboratorio</i>	34
Ubicación geográfica.	35
Aislamiento de hongos filamentosos de la fermentación del cacao	35
<i>Cultivos puros</i>	35
Identificación de hongos filamentosos	36
<i>Identificación macroscópica</i>	36
<i>Identificación microscópica</i>	36
<i>Identificación molecular</i>	36
<i>Amplificación por PCR</i>	37
<i>Secuenciación</i>	38
Producción de biomasa y extracción de lipopéptidos de <i>Bacillus subtilis</i>	38
<i>Cultivo de Bacillus subtilis</i>	38
<i>Obtención de biomasa y extracción de lipopéptidos</i>	39
Pruebas de antagonismo	39

Diseño experimental.....	40
<i>Modelo matemático</i>	40
Capítulo IV	42
Resultados y Discusión	42
Resultados	42
Características macroscópicas y microscópicas de hongos aislados de la fermentación del cacao CCN-51.....	42
<i>Penicillium angulare</i>	42
<i>Penicillium crustosum</i>	43
<i>Aspergillus</i> sp.	44
<i>Aspergillus protuberus</i>	45
<i>Aspergillus versicolor</i>	47
<i>Neosartorya hiratsukae</i>	48
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	51
<i>Cladosporium ramotenellum</i>	52
<i>Humicola fuscoatra</i>	53
<i>Gliomastix murorum</i>	54
Identificación molecular.....	56
Pruebas de antagonismo	60
Discusión	62
<i>Aislamiento e identificación de hongos</i>	62
<i>Actividad antifúngica</i>	65

Capítulo V	67
Conclusiones y Recomendaciones	67
Conclusiones	67
Recomendaciones	68
Bibliografía	69

Índice de tablas

Tabla 1 Información de primers para identificación molecular de hongos.....	37
Tabla 2 Master mix para amplificación por PCR	38
Tabla 3 Características macroscópicas y microscópicas de especies de <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i> aislados de la fermentación del cacao	50
Tabla 4 Características macroscópicas y microscópicas de diferentes especies aisladas de la fermentación del cacao	55
Tabla 5 Resultados BLAST en base al % de similitud para secuencias de bases nitrogenadas de la región ITS	57
Tabla 6 Porcentaje de inhibición \pm desviación estándar de <i>B. subtilis</i> contra hongos de la fermentación del cacao	60

Índice de figuras

Figura 1	<i>Proceso de la fermentación del cacao</i>	24
Figura 2	<i>Precursores internos y externos del aroma del cacao</i>	27
Figura 3	<i>Penicillium angulare</i>	43
Figura 4	<i>Penicillium crustosum</i>	44
Figura 5	<i>Aspergillus</i> sp.	45
Figura 6	<i>Aspergillus protuberus</i>	46
Figura 7	<i>Aspergillus versicolor</i>	47
Figura 8	<i>Neosartorya hiratsukae</i>	49
Figura 9	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	51
Figura 10	<i>Cladosporium ramotenellum</i>	52
Figura 11	<i>Humicola fuscoatra</i>	53
Figura 12	<i>Gliomastix murorum</i>	54
Figura 13	<i>Amplificación de ADN usando primers de betatubulina (βenA)</i>	56
Figura 14	<i>Actividad antifúngica de biomasa de B. subtilis frente a hongos filamentosos presentes en la fermentación de almendra de cacao luego de 6 días de incubación a 25°C.</i>	61

Resumen

El cacao ecuatoriano se distingue por su calidad en aroma y sabor, el cual debido a malos procesos durante la poscosecha se contamina por hongos, los cuales constituyen un riesgo para la salud del consumidor y a su vez deterioran los atributos de la almendra. *Bacillus subtilis* ha demostrado una consistente capacidad antifúngica contra una diversidad de fitopatógenos, por ello el presente estudio se centró en determinar si *B. subtilis* Ctpx S2-1 puede inhibir el crecimiento de hongos filamentosos presentes en la fermentación del cacao, para ello se aisló e identificó diez hongos con el apoyo de marcadores moleculares como betatubulina (βenA) e ITS, encontrándose géneros como *Penicillium*, *Aspergillus* y *Cladosporium*, además de otras especies como *Humicola fuscoatra*, *Gliomastix murorum* y *Neosartorya hiratsukae*. Para las pruebas en cultivo dual se eligieron a hongos que producen micotoxinas nocivas entre ellos *Aspergillus versicolor* y *Cladosporium cladosporioides*, y de tal manera, se encontró un efecto significativo de la bacteria sobre el crecimiento de hongos, es así que la biomasa de *B. subtilis* presentó un mayor porcentaje de inhibición para *N. hiratsukae* con un 39,35% y *Penicillium crustosum* con el 38,13%, mientras que los lipopéptidos inhibieron a *P. crustosum* en un 32,18%.

Palabras clave: Cacao, *Bacillus subtilis*, Marcadores moleculares, Lipopéptidos.

Abstract

Ecuadorian cocoa is distinguished by its aroma and flavor quality, which due to bad processes during post-harvest is contaminated by fungi, which constitute a risk to consumer health, and in turn deteriorate the attributes of the kernel. *Bacillus subtilis* has demonstrated a consistent antifungal capacity against a diversity of phytopathogens, for that reason, the present study focused on determining if *B. subtilis* Ctpx S2-1 can inhibit the growth of filamentous fungi present in cocoa fermentation. Ten fungi were isolated and identified with the support of molecular markers such as betatubulin (β enA) and ITS, finding genres such as *Penicillium*, *Aspergillus* and *Cladosporium*, as well as other species such as *Humicola fuscoatra*, *Gliomastix murorum* and *Neosartorya hiratsukae*. For the dual cultivation tests, fungi that produce harmful mycotoxins were chosen, among them *Aspergillus versicolor* y *Cladosporium cladosporioides*, and thus, a significant effect of the bacteria on fungal growth was found; hence, the biomass of *B. subtilis* presented a higher percentage of inhibition for *N. hiratsukae* with 39.35%, and *Penicillium crustosum* with 38.13%, while the lipopeptides inhibited *P. crustosum* by 32.18%.

Key words: *Cocoa, Bacillus subtilis, Molecular markers, Lipopeptides.*

Capítulo I

Introducción

Antecedentes

El continente africano es el principal productor mundial de cacao, con una producción total de 3 518 000 t al año 2017, seguido de América Latina que alcanza las 752 000 t y finalmente Asia y Oceanía con 368 300 t (CAF, 2018). De tal manera, la industria del chocolate genera cada año alrededor de 95 billones de dólares con un crecimiento anual del 2 al 3%, y representa el ingreso económico más importante para cerca de 6 millones de agricultores y beneficia de manera indirecta a 45 millones de personas (Kongor et al., 2016).

El aroma y sabor del cacao está relacionado con una serie de factores que van desde la genética de la planta, manejo agronómico, tipo de suelo, edad de la plantación y procesos poscosecha como: fermentación, secado y almacenamiento de la almendra (Kongor et al., 2016). Los microorganismos desempeñan un papel importante durante el proceso de la fermentación del cacao es así que levaduras y bacterias son capaces de elaborar sustancias como el etanol para transformarlo en ácido acético, provocando cambios físicos, químicos y bioquímicos en la almendra, pero, dentro de toda esta microbiota presente en la fermentación, también se encuentran los hongos, los mismos que, en el caso de géneros como *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. elaboran sustancias nocivas que afectan la salud del consumidor así como la calidad del cacao (Petyaev & Bashmakov, 2016).

El proceso de la fermentación del cacao se desarrolla en alrededor de 7 días y en sus etapas iniciales se encuentran levaduras y bacterias ácido lácticas, seguido de

bacterias ácido acéticas y bacterias formadoras de esporas (Schwan & Wheals, 2004); estas últimas representadas mayoritariamente por bacterias del género *Bacillus* sp., mismas que favorecen la síntesis de pirazinas, entre ellas la tetrametilpirazina, que le confiere un sabor terroso/tostado a la almendra de cacao antes del proceso del tostado, ideal en procesos de manufactura (Zak et al., 1972). Además, *Bacillus* sp. favorece la síntesis de 2,3-butadiol, sustancia que le otorga a las almendras de cacao un aroma dulce, y junto con levaduras elaboran enzimas pectinolíticas que ayudan a degradar la pulpa del cacao (Castro-Alayo et al., 2019). Asimismo, *Bacillus* sp. ha sido utilizado en programas de control biológico, debido a que posee gran potencial para producir antibióticos.

Bacillus subtilis presenta una elevada actividad antagónica contra hongos, de tal manera que, cepas como: UMAF 6614, UMAF6619, Ctpx S1-1, Ctpx S3-5, Ctpx S2-1, Ctpx Z2, Ctpx Z3, CPA-8, han demostrado consistentemente controlar a patógenos como: *Lasiodiplodia theobromae*, *Monilinia laxa*, *Monilinia frutícola*, *Podosphaera fusca* y *Colletotrichum acutatum* (Romero et al., 2007; Sajitha & Dev, 2016; Yáñez-Mendizábal et al., 2012; Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2018); debido a que exhiben gran potencial para producir lipopéptidos, incluidos en familias de las fengicinas, iturrinas, surfactinas, baciliomicina, micosubtilina y bacilisina (Sajitha & Dev, 2016).

Penicillium y *Aspergillus* representan las especies de hongos más contaminantes de alimentos encontrándose en cereales, café, cacao, además de frutas secas como: pasas, ciruelas (Hocking et al., 2006). Estos hongos también se encuentran en ambientes cerrados y ocasionan el deterioro de alimentos debido a sus

micotoxinas como aflatoxinas y ocratoxina A (OTA) (Moullia et al., 2014), que están presentes durante todo el proceso de comercialización del cacao.

Justificación

Ecuador es el tercer productor mundial de cacao, mismo que se distingue por su calidad en aroma y sabor, es así que las exportaciones alcanzaron las 315 571 t al año 2018, de este rubro el 6,33% pertenece a productos semielaborados como: licor, polvo y torta de cacao (Anecacao, 2019). El 62 % de la producción mundial de cacao fino de aroma contribuye Ecuador, producto de 560 387 ha sembradas y con la participación de 150 000 familias (CAF, 2018). La mejora de la calidad del cacao ecuatoriano se realiza a través de la integración de buenas prácticas agrícolas, comercio justo y manejo adecuado de procesos como cosecha y poscosecha (CAF, 2018). El cacao de tipo Nacional de arriba, también conocido como fino de aroma, presenta características organolépticas únicas en aroma y sabor a flores y frutas, mientras que, el cacao CCN-51 contiene un elevado contenido de grasa y altos rendimientos y es el que mayormente se encuentra difundido en el país (Anecacao, 2019).

La calidad en aroma y sabor del cacao, se puede ver deteriorada por un mal manejo agronómico del cultivo, así como en procesos de cosecha y poscosecha; debido a una inadecuada fermentación, falta de remoción de las almendras, periodos prolongados de secado e inapropiado almacenamiento que favorecen la proliferación de hongos (Akinfala et al., 2020).

La presencia de hongos filamentosos durante la fermentación, afecta a la calidad del cacao y salud del consumidor, debido a que estos hongos elaboran sustancias con propiedades neurotóxicas, carcinogénicas y nefrotóxicas como la ocratoxina (OTA),

metabolito secundario producido por hongos pertenecientes al género *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp., la presencia de esta micotoxina se ha reportado en el 99,7 % de muestras de chocolate (Mounjouenpou et al., 2008). Además, se ha aislado *Penicillium citrinum* de muestras de cacao y café almacenado demostrando su capacidad para producir ocratoxina A entre 4,64 a 25,26 ug/g (Moullia et al., 2014).

Este estudio tiene como finalidad evaluar la capacidad de *Bacillus subtilis* para inhibir el crecimiento de hongos filamentosos presentes en la fermentación del cacao *in vitro* a través de biomasa y sus lipopéptidos, de tal manera que *Bacillus subtilis* pueda ser utilizado como una alternativa de control biológico, mejorando así la calidad e inocuidad del cacao.

Objetivos

Objetivo general

Determinar la actividad antifúngica de biomasa y lipopéptidos de un aislamiento de *Bacillus subtilis* mediante pruebas de antibiosis contra hongos filamentosos de la poscosecha del cacao.

Objetivos específicos

Caracterizar morfológica y molecularmente hongos de la fermentación del cacao CCN-51.

Evaluar *in vitro* biomasa y lipopéptidos de *Bacillus subtilis* cepa CtpxS2-1 frente a hongos filamentosos de la fermentación del cacao.

Hipótesis

H0: Biomasa y lipopéptidos producidos por *Bacillus subtilis* cepa CtpxS2-1 no inhiben el crecimiento de hongos filamentosos de la fermentación del cacao.

H1: Biomasa y lipopéptidos producidos por *Bacillus subtilis* cepa CtpxS2-1 inhiben el crecimiento de hongos filamentosos de la fermentación del cacao.

Capítulo II

Marco Referencial

Cacao CCN-51

El cacao CCN-51 (Colección Castro Naranjal) surge como necesidad de crear una variedad resistente a enfermedades y altamente productiva, para ello, se cruzó los clones ICS-95 (trinitario) y IMC-67 (forastero), el híbrido obtenido fue nuevamente cruzado con un híbrido “canelos” (forastero) (Carrión, 2012; Cedeño, 2011).

El clon CCN-51 posee grandes beneficios, alcanza rendimientos entre 2 a 2,5 t/ha, tolerancia a escoba de bruja, almendras grandes, precocidad, alto contenido de manteca (54%) y se puede cultivar hasta los 1000 msnm (Carrión, 2012; Cedeño, 2011).

Proceso de la fermentación del cacao

Pulpa de cacao

La pulpa de cacao constituye el sustrato para el desarrollo de microorganismos precursores del aroma y sabor del cacao, la cual está integrada por fructosa, glucosa, 1-1,5% pectina, ácido cítrico, proteínas, vitaminas, minerales y agua. La concentración de cada una de estas sustancias determinará el tratamiento poscosecha a realizar y la calidad del cacao (Kongor, y otros, 2016; Schwan & Wheals, 2004). Un elevado contenido de pulpa puede provocar un marcado descenso del pH durante la fermentación, por lo tanto un sabor ácido (Kongor et al., 2016; Schwan & Wheals, 2004).

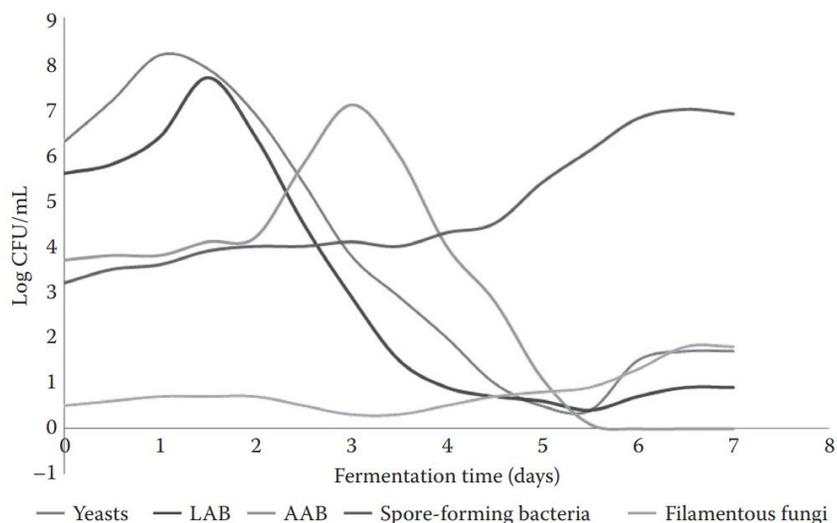
Fermentación microbiana

La fermentación del cacao es el proceso a través del cual ocurre una serie de cambios físicos, químicos y bioquímicos en la pulpa y el cotiledón de la almendra debido a la acción de microorganismos. Durante este proceso se desarrollarán sabores y aromas característicos del cacao, debido a cambios en la temperatura, pH y disponibilidad de oxígeno que ocurren gracias a la acción microbiana y el manejo poscosecha del grano (Kongor et al., 2016). El tiempo de fermentación depende del genotipo, en cacao trinitario y criollo, la fermentación se lleva a cabo entre 5 a 7 días, mientras que, en cacao forastero la fermentación será de 3 días (Hatmi et al., 2015).

Un complejo conglomerado de microorganismos entre levaduras, bacterias ácido lácticas y acéticas permiten la formación de etanol para transformarlo en ácido acético, mientras que, enzimas pectinolíticas favorecen la desintegración de la pulpa. Estas sustancias junto a ácidos orgánicos y agua se difunden en el cotiledón del grano de cacao y actúan como solventes en zonas de reacciones enzimáticas lugar dónde se encuentran los precursores del sabor y aroma (Illeghems et al., 2012; Lagunes Gálvez et al., 2007).

Figura 1

Proceso de la fermentación del cacao



Nota. Tomado de Schwan et al., (2014).

Levaduras

Las levaduras desempeñan roles fundamentales en la fermentación del cacao, la primera consiste en la producción de etanol, donde azúcares como: glucosa, fructosa y sacarosa se transforman en etanol y CO₂, tras este proceso la temperatura del medio se incrementa hasta los 40°C y la pulpa se descompone por acción de enzimas pectinolíticas; segundo, las levaduras metabolizan el ácido cítrico, con este proceso el pH del medio se incrementa favoreciendo la proliferación de bacterias, pero además, también propician la síntesis de otros ácidos orgánicos como el oxálico, fosfórico, succínico y málico, y aunque se encuentran en bajas concentraciones tienen un efecto amortiguador del pH (Lagunes Gálvez et al., 2007; Schwan & Wheals, 2004). Otra función de las levaduras es la producción de compuestos volátiles como acetato de etilo

e isopropilo, butanodiol, succinato de dietilo las cuales son importantes para el aroma del cacao (Schwan & Wheals, 2004).

Dentro de las especies más representativas de levaduras presentes en la fermentación del cacao encontramos: *Candida inconspicua*, *Pichia fermentans*, *Hanseniaspora guillermondii*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida zeylanoides* la mayoría de ellas presentes dentro de las primeras 72 horas de fermentación (Lagunes Gálvez et al., 2007); y especies como: *Saccharomyses cerevisiae*, *Candida rugopeliculosa*, *Kloeckera thermotolerans*, muestran una elevada actividad pectinolítica (Schwan & Wheals, 2004).

Bacterias ácido lácticas

Aparecen dentro de las primeras 36 a 48 horas del proceso fermentativo (Ho et al., 2015) al disminuir la cantidad de mucílago del cacao y aumentar el consumo de ácido cítrico (Erazo, 2019). Estas bacterias realizan tres funciones metabólicas importantes: fermentan los azúcares de la pulpa, utilizan el ácido cítrico y reducen la fructosa en manitol (Schwan et al., 2014). La producción de ácido láctico depende de la composición de la pulpa de cacao, algunas bacterias metabolizan glucosa y fructosa a partir de hexosa monofosfato producto de esto se forma ácido láctico, etanol, ácido acético, glicerol, manitol y CO₂, mientras que, otras especies utilizan la vía Embden-Meyerhof para producir ácido láctico en un 85% (Schwan & Wheals, 2004).

La cantidad de ácido láctico y grado de aireación presente en la fermentación determinará la acidez del cacao, debido a que el ácido láctico y acético afectan al pH interno de la almendra y por lo tanto, a su actividad enzimática (Ho et al., 2015).

Las especies más representativas de bacterias ácido lácticas corresponden a *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus gasserii*, *Lactobacillus kandleri* (Schwan & Wheals, 2004).

Bacterias ácido acéticas

Las bacterias ácido acéticas oxidan azúcares y ácidos de la pulpa y el etanol en ácido acético los mismos que se difunden al interior de la almendra provocando la muerte del embrión y la desorganización celular que junto a un descenso del pH activan reacciones que permiten liberar el sabor y color del chocolate. Este proceso es bastante exotérmico por lo que la temperatura alcanza más de 50 °C (Schwan et al., 2014).

Entre las bacterias ácido acéticas más importantes asociadas a la fermentación del cacao encontramos a *Acetobacter aceti* subsp. *liquefaciens*, *Acetobacter ascendens*, *A. pasteurianus*, *A. peroxydans*, *A. rancens*, *A. xylinum*, *Acetobacter lovaniensis*, *A. xylinum*, *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* (Schwan & Wheals, 2004).

Bacterias formadoras de esporas

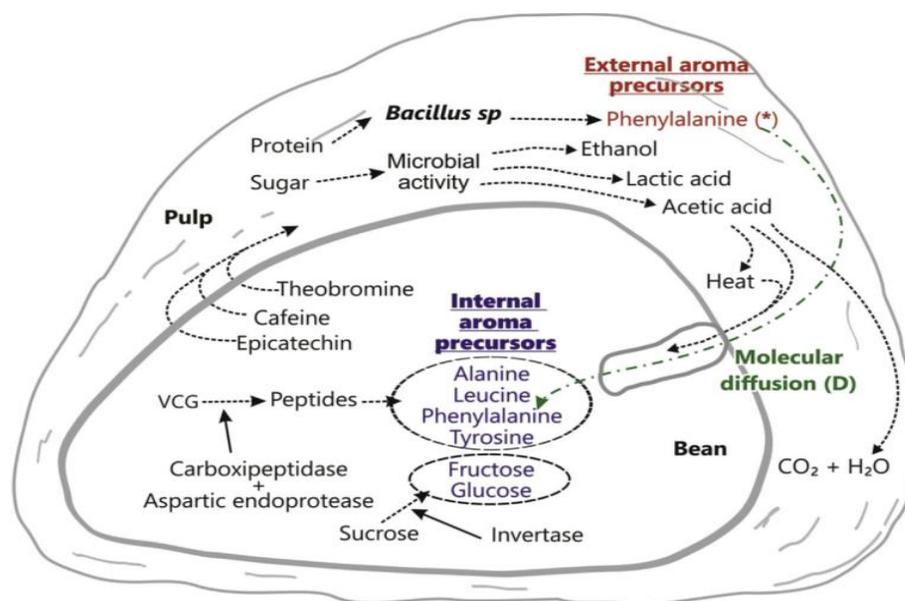
Corresponden al género *Bacillus* sp. su rol dentro de la fermentación del cacao no está bien definido, aunque se sugiere que junto a levaduras descomponen la pectina del cacao gracias a enzimas como la poligalacturonasa y liasas, además, estas bacterias metabolizan enzimas proteolíticas, amilolíticas, así como ácido acético, láctico y que afectan la calidad del cacao (Schwan et al., 2014). A pesar de que algunas de las enzimas secretadas por *Bacillus* sp. provoquen malos olores y sabores, se sabe que cuando los azúcares del medio se acaban estas bacterias son capaces de producir

compuestos pécticos poliméricos que constituyen una fuente de carbono para el resto de macroorganismos (Castro-Alayo et al., 2019).

Los *Bacillus* también son responsables de la síntesis de pirazinas entre ellas 2,3,5-trimetilpirazinas (TrMP) y 2,3,5,6-tetrametilpirazinas (TMP), que forman parte de notas básicas del sabor del cacao y junto a aldehídos contribuyen al aroma, así como de la síntesis de 2,3 butanodiol que le confiere un aroma dulce floral (Castro-Alayo et al., 2019). El nivel de TMP en granos de cacao es un indicador del grado de fermentación y para la industria manufacturera tiene gran importancia pues le confiere un sabor terroso/tostado a la almendra de cacao (Zak et al., 1972).

Figura 2

Precursores internos y externos del aroma del cacao



Nota. Tomado de Castro-Alayo et al., (2019).

Hongos filamentosos

Una mazorca sana de cacao constituye una estructura estéril, pero llegado el momento de su apertura ocurre contaminación debido a una serie de factores como: suelo, ambiente, manos de los cosechadores, machetes, cajas o sacos de fermentación, así como microorganismos en las áreas de secado y almacenamiento del grano que provocan el ingreso de hongos, ocasionando el deterioro de la calidad del cacao.

La mala aireación, temperaturas superiores a los 25°C y humedad relativa mayor al 80% permiten un rápido crecimiento de hongos filamentosos; la mejor manera de evitar la presencia de hongos, es a través de la remoción de las almendras de cacao de dos a tres veces al día (Hatmi et al., 2015).

Se ha encontrado una diversidad de hongos aislados de la fermentación del cacao entre ellos: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Mucor racemosus*, *Mucor* sp., así también especies como *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. además, se sabe que muchas de estas especies no toleran temperaturas mayores a los 45°C, pero, durante la fermentación del cacao la temperatura puede alcanzar los 50 °C y se desconoce cuál es el mecanismo que les permite a estos hongos tolerar elevadas temperaturas (Schwan & Wheals, 2004).

***Aspergillus* sp.**

Aspergillus es un hongo filamentosos que habita regiones tropicales, se caracteriza por producir diferentes micotoxinas como aflatoxinas, ocratoxina A, ácido ciclopiazónico (CPA), ácido β -nitropropiónico, citocalasina E, citrina, mismas que

afectan la salud humana, ya que muchas de estas colonizan los alveolos pulmonares y otras zonas del cuerpo, ocasionan cáncer y una baja producción de anticuerpos (Smith, 1994).

Aspergillus forma un conidióforo, métulas, fialideas y conidios; la métula constituye una estructura adyacente a la fialidea; el conidio es un propágulo asexual inmóvil que se separa fácilmente y puede presentarse a manera de cadenas de diferente ramificación (Samson & Pitt, 1986). Cuando las métulas y las fialideas inmaduras se desarrollan al mismo tiempo se consideran *Aspergillus* (Pitt & Hocking, 2009).

Los hongos del género *Aspergillus* que se han reportado en la fermentación del cacao corresponden a: *A. niger* y *A. carbonarius*, responsables de producir aflatoxinas (AFs) y ocratoxina (OTA) micotoxinas de carácter carcinogénico, neurotóxico y teratogénico para la salud humana, además, se han encontrado otras especies representativas de *Aspergillus* entre ellas: *A. fumigatus*, *A. sydowii*, *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. versicolor* (Copetti et al., 2011).

***Penicillium* sp.**

Penicillium posee una estructura asexual similar a un cepillo que corresponde al cuerpo fructífero, el conidióforo se encuentra formado por fialideas, métula y conidios (Samson & Pitt, 1990). Las fialideas sostienen al penicillus que pueden tener o no una ramificación simétrica. Existen diferentes formas de fialideas: las lageniforme en forma de botella cuyo cuello puede ser muy largo y delgado, las acerosa en forma de aguja, estas diferentes formas se deben a la composición de la pared celular (Samson & Pitt, 1986). Los conidios son células unicelulares capaces de generar cadenas con

diferentes longitudes, mismas que pueden estar enredadas, así también, poseen pared celular pesada (Samson & Pitt, 1986); la forma varía desde esférica a elipsoidales en conidios maduros y la colonia presenta colores que van desde el azul, a verde o gris, inclusive blanco (Pitt & Hocking, 2009).

P. citrinum constituye la principal especie aislada de la fermentación del cacao y se encuentra presente en suelos tropicales, así como en cereales. Es responsable de producir micotoxinas nefrotóxicas como la citrina (Houbraken et al., 2010). Entre otras especies aisladas encontramos: *P. paneum*, *P. purpurogenum* y *P. ochrochloron* (Ardhana & Fleet, 2003).

Bacillus subtilis

Características

B. subtilis es una bacteria Gram positiva formadora de endosporas (Stein, 2005). El mecanismo de antagonismo de esta bacteria consiste en adherirse al medio, seguido de la producción de antibióticos extracelulares, así como de enzimas líticas, luego provoca la inanición del hongo y finalmente se da la respuesta del hospedante proceso conocido como resistencia sistémica (Ruiz et al., 2016).

Lipopéptidos

Los lipopéptidos están compuestos por un ácido graso lipofílico y un anillo peptídico hidrofílico, estos compuestos bioactivos y de biocontrol tienen un bajo peso molecular y toxicidad, así también, son altamente biodegradables (Chen et al., 2008). Dentro de la familia de los lipopéptidos se encuentran las iturritinas, surfactinas y

fengicinas, mismas que se diferencian de acuerdo a su secuencia de aminoácidos y la ramificación de los ácidos grasos (Romero et al., 2007).

Dentro de las iturrinas se encuentran la iturrina A, micosubtilina y baciliomicina que son heptapéptidos con un β -amino graso (Romero et al., 2007). La iturrina A y baciliomicina D tienen una gran actividad antifúngica ya que inhibe la germinación de la espora creando canales a través de la membrana liberando iones como el K provocando la muerte de la célula (Ramarathnam, 2007; Sánchez, 2016). En el caso de levaduras, la iturrina A provoca la liberación de electrolitos y moléculas de elevado peso molecular a nivel de la membrana citoplasmática desencadenando un desequilibrio osmótico, afectando también a la membrana de otros organelos incluyendo la membrana nuclear (Thimon et al., 1995).

Las fengicinas son decapeptidos con un β -hidroxiácido graso y poseen una elevada actividad antifúngica contra hongos filamentosos, pero no controlan levaduras y bacterias (Romero et al., 2007; Ramarathnam et al., 2007). El mecanismo de antagonismo de las fengicinas consiste en elaborar sustancias como ácido oleico, fosfolípidos y otros ácidos grasos insaturados, mismos que actúan a nivel de la membrana celular inhibiendo una adecuada transferencia de energía y moléculas hacia el interior de la célula debido a la formación del complejo fengicina-ergosterol (Vanittanakom et al., 1986).

Las surfactinas tienen características biosurfactantes, antivirales, antitumorales, hemolíticas y antimicoplásticas (Ramarathnam et al., 2007; Romero et al., 2007). Estas lipoproteínas tienen un gran interés en la industria de la biotecnología en la elaboración de biosurfactantes ya que desintegran membranas gracias a mecanismos

fisicoquímicos (Tsuge et al., 2001). La surfactina se podría usar en el tratamiento de trombosis pues inhibe la formación de coágulos de fibrina (Hayes et al., 2009).

Biología molecular

Identificación molecular de hongos

Permite identificar diferencias entre género, especie, subespecie, cepas y clones dentro de una especie en estudio (Glass & Donaldson, 1995). Los métodos moleculares se apoyan en el uso de ADN ribosomal del núcleo (ADNr) que contiene repeticiones en tándem para tres genes de ARNr (28S, 18S y 5.8S) (Glass & Donaldson, 1995).

Espaciador transcrito interno-ITS

Estos primers universales amplifican zonas que no son codificantes entre las regiones 18S, 5,8S y 28S de ARNr (White et al., 1990). Los ITS tienen un tamaño de amplicón entre 600 y 800 pb. ITS1 codifica la región 18S y 5,8S, ITS2 la región 5.8S y 23S, ITS5 la región 18S, mientras que ITS4 la región 28S (Soumya & Bindu, 2017; White et al., 1990). Los ITS son los cebadores más utilizados para estudios filogenéticos.

β -tubulina (β enA)

Las α y β -tubulinas son polipéptidos ubicados en subunidades de los microtúbulos y se ensamblan a partir de protómeros, actúan a nivel del núcleo y otros procesos celulares (Li & Yang, 2007; Liaud & Brinkmann, 1992). β -tubulina es un cebador secundario de apoyo en la identificación molecular de hongos, es así que pueden existir variaciones intraespecies en géneros como *Penicillium* y *Aspergillus*, asimismo se conoce que el número de intrones es variable y a veces amplifica para

genes parálogos, lo cual podría incurrir en errores como mencionar a una cepa como una nueva especie (Samson, y otros, 2014; Visagie, y otros, 2014).

Capítulo III

Materiales y Métodos

Ubicación y características del área de estudio

Fase de campo

Ubicación política. La muestra se tomó en la empresa “República del cacao” finca COFINA dedicada a la producción de cacao fino de aroma, ubicada en la parroquia Antonio Sotomayor perteneciente al cantón Vinces, provincia de Los Ríos, Ecuador.

Ubicación geográfica. De coordenadas longitud: 79 ° 45' 6.9"; latitud: 1° 33'22" y altitud: 17 msnm.

Ubicación ecológica. El cantón Vinces se encuentra en la zona climática tropical megatérmico húmedo, con una temperatura media entre 24 °C a 30 °C, precipitación anual de 1000 a 2000 mm. Tiene cuatro tipos de ecosistemas: bosque semideciduo de tierras bajas del Jama-Zapotillo, bosque siempreverde estacional inundable de llanura aluvial, herbazal inundable ripario de tierras bajas del Chocó Ecuatorial y el Herbazal inundable ripario de tierras bajas del Jama-Zapotillo (Dutan et al., 2019).

Fase de laboratorio

El aislamiento e identificación morfológica de hongos y pruebas de antagonismo se realizó en el laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Carrera de Agropecuaria IASA I, de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ubicada en la provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, parroquia Sangolquí en la hacienda “El Prado”.

La fase de identificación molecular de hongos se llevó a cabo en los laboratorios de la Dirección General de Investigación y Vinculación de la Universidad de las Américas UDLA, ubicada en la provincia de Pichincha, cantón Quito.

Ubicación geográfica. La Hacienda el “El Prado” está ubicada en las coordenadas UTM de latitud: 0° 23´ 20”, longitud 78° 24´44” a una altitud de 2748 msnm.

La Dirección General de Investigación y Vinculación de la Universidad de las Américas UDLA, se encuentra ubicada en las coordenadas UTM a una latitud de 0° 10´ 12,35” S, longitud 78° 28´ 16” O y una altitud de 2833.

Aislamiento de hongos filamentosos de la fermentación del cacao

Se tomaron muestras de la fermentación de cacao CCN-51 correspondientes a los días 2, 3 y 4, de los cuales tres almendras de cacao fueron colocadas en cajas Petri con agua destilada estéril, se dejó incubar por 24 horas a 25°C, de esto se tomó una alícuota de 100 µl y se sembró en medio de cultivo rosa de bengala con cloranfenicol (DRBC), las muestras fueron incubadas a 25°C durante 7 días.

Cultivos puros

Las colonias de hongos obtenidas, se sembraron en medio PDA hasta alcanzar cultivos puros, siguiendo el protocolo descrito por Cañedo & Ames, (2004).

Identificación de hongos filamentosos

Identificación macroscópica

Los cultivos puros fueron sembrados en medios de cultivos específicos. Se preparó una suspensión de esporas (0,2 % agar y 0.05 % Tween80) C; de esta se tomó 1 μ L y se sembró en 3 puntos de cada caja Petri, por duplicado. Los medios de cultivo utilizados para *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. fueron: agar extracto de levaduras Czapek (CYA), agar sacarosa extracto de levaduras (YES) y agar extracto de malta (MEA); mientras que, para otras especies se utilizó PDA (agar papa dextrosa) y MEA (agar extracto de malta). Las muestras se incubaron a 25°C en oscuridad durante 7 días (Visagie et al., 2014).

El diámetro de la colonia (mm) se midió con la ayuda de un calibrador digital, se determinó el color de la colonia tanto en el verso como el anverso de la caja Petri.

Identificación microscópica

En un portaobjetos se colocó 10 μ L de medio PDA y se sembró 1 μ L de una suspensión de esporas de cada uno de los hongos. Luego, con la ayuda de un cubre objetos se selló la muestra y se incubó durante 5 días a 25°C (Falconí, 1998). Se utilizó un microscopio marca Bill, aumento a 100X con aceite inmersión.

Identificación molecular

Los diferentes hongos aislados de la fermentación del cacao fueron sembrados en PDA por 7 días a 25°C. El ADN se obtuvo siguiendo las recomendaciones del kit FastDNA™ Spin for Soil (Qbiogene, Inc., CA). La concentración de ADN se midió en el equipo Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 Spectrophotometers. El ADN obtenido se

almacenó a -20°C hasta su análisis. Los primers usados para la amplificación fueron ITS (Falconí et al., 2013), y β -tubulina (*βenA*) citados en la Tabla 1.

Tabla 1

Información de primers para identificación molecular de hongos

Locus	Nombre del primer	Dirección	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón
Espaciador transcrito interno	ITS1	Forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	290
	ITS5	Forward	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	315
	ITS4	Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC	330
β -tubulina	β t2a	Forward	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	495
	β t2b	Reverse	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	287

Amplificación por PCR

La amplificación por PCR para cada muestra contenía un volumen final de 15,17 μ L: 0,8 μ L de primer forward y 0,8 μ L de primer reverse, 11,57 μ L del Master Mix (Tabla 2) y 2 μ L de muestra de ADN. El protocolo PCR fue incubación a 94°C por 2 minutos, la desnaturalización a 94°C por 30 segundos, el alineamiento a 57°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto por 40 ciclos, en un termociclador MultiGene™ (Labnet international, Inc). El producto PCR fue revelado en un gel de agarosa al 2% más SYBR Safe (1 μ L por cada 20 mL de T.B.E) a 100 voltios por 40 min. La visualización de las bandas de ADN se efectuó en un fotodocumentador Biorad.

Tabla 2*Master mix para amplificación por PCR*

Reactivo	Volumen 1X	Unidades
10X PCR Buffer	1,5	μL
DNTPs (10mM)	0,45	μL
<i>MgCl₂</i> (50mM),	0,4	μL
Taq platinum	0,1	μL
<i>H₂O</i> miliQ	9,12	μL
Volumen final	11,57	μL

Secuenciación

El producto PCR fue enviado a secuenciación, a los laboratorios de la Dirección General de Investigación y Vinculación de la Universidad de las Américas UDLA. El método de análisis fue Secuenciación Sanger (BigDye_3.1) en electroforesis capilar. Para la purificación se usó un protocolo basado en resina de filtración en gel, el equipo empleado fue un secuenciador Applied Biosystems modelo 3500. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software Geneious Prime® 2021.2.2.

Producción de biomasa y extracción de lipopéptidos de *Bacillus subtilis****Cultivo de Bacillus subtilis***

La cepa CtpxS2-1 de *Bacillus subtilis* fue utilizada para inhibir el crecimiento de hongos filamentosos de la fermentación del cacao. La cepa pertenece a la colección de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE del Laboratorio de Fitopatología y Control

Biológico, almacenadas en criobolas a -80°C . Las bacterias, una vez refrescadas se sembraron en cajas Petri con agar NYDA a 30°C durante 24 horas (Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2018; Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2021).

Obtención de biomasa y extracción de lipopéptidos

Bacillus subtilis CtpxS2-1 se sembró en medio MOLP a 30°C , la concentración de bacterias se ajustó a 10^8 UFC/mL y se centrifugó a 150 rpm durante 72 horas. Los compuestos libres de células se obtuvieron por centrifugación 4000 rpm a 4°C durante 20 minutos, este proceso se repitió dos veces, estos compuestos se filtraron usando filtros de nitrato celulosa de $0,2\ \mu\text{m}$ (Yáñez-Mendizábal et al., 2012; Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2018).

La extracción de lipopéptidos se realizó con n-butanol en relación 1:1 a 200 rpm por 3 horas, luego de separarse el n-butanol y las lipoproteínas, se colocó un volumen conocido de sobrenadante en cajas Petri y se lo dejó evaporar durante 24 horas. Entonces se añadió metanol en proporción 1:10 sobrenadante-metanol, el extracto concentrado de lipopéptidos se almacenó en tubos Falcon a 4°C (Samaniego, 2016).

Pruebas de antagonismo

La actividad antifúngica de biomasa (células) de *Bacillus* y de sus lipopéptidos se evaluó a través de cultivo dual en platos de Petri en medio PDA durante seis días. De los hongos filamentosos se sembró $2\ \mu\text{L}$ de una suspensión de esporas en la parte central y se dejó crecer por 48 horas, mientras que de los antagonistas se tomó una alícuota de $100\ \mu\text{L}$.

Conjuntamente, se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento, con el empleo de la siguiente ecuación:

$$PI = \frac{DCP - DCA}{DCP} * 100$$

Dónde:

PI= Porcentaje de inhibición

DCP= Diámetro (mm) de crecimiento del patógeno (control)

DCA= Diámetro (mm) de crecimiento del patógeno (prueba de antagonismo)

Diseño experimental

Las pruebas de antagonismo se realizaron en cultivo dual bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA) en arreglo bifactorial (2*4) con 4 repeticiones, donde cada caja Petri representa una unidad experimental. Los factores de estudio corresponden a *Bacillus subtilis* (bacteria) y hongos filamentosos de la fermentación del cacao. Los datos de porcentaje inhibición (PI) de biomasa y lipopéptidos de *B. subtilis* se analizaron a través de estadística descriptiva (promedio y desviación estándar), además de un análisis de varianza con una prueba de rangos múltiples de Duncan (P <0,05).

Modelo matemático

$$Y_{ij} = \mu + B_i + H_j + BH_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} = porcentaje de inhibición

μ =media general

B_i = efecto de i-ésima bacteria

H_j = efecto de la j-ésimo hongo

BH_{ij} = efecto de la interacción bacteria*hongo

ϵ_{ij} = error experimental

Capítulo IV

Resultados y Discusión

Resultados

Se aislaron 10 hongos de la fermentación del cacao, de los cuales 3 pertenecen al género *Aspergillus*, 2 al género *Penicillium*, 2 a *Cladosporium*, así también se encontró *Humicola fuscoatra*, *Gliomastix murorum* y *Neosartorya hiratsukae* la cual es una especie teleomórfica del género *Aspergillus*. *P. crustosum* se encontró presente durante todo el proceso de la fermentación, mientras que, el resto de hongos se encontraron en los días finales del proceso fermentativo.

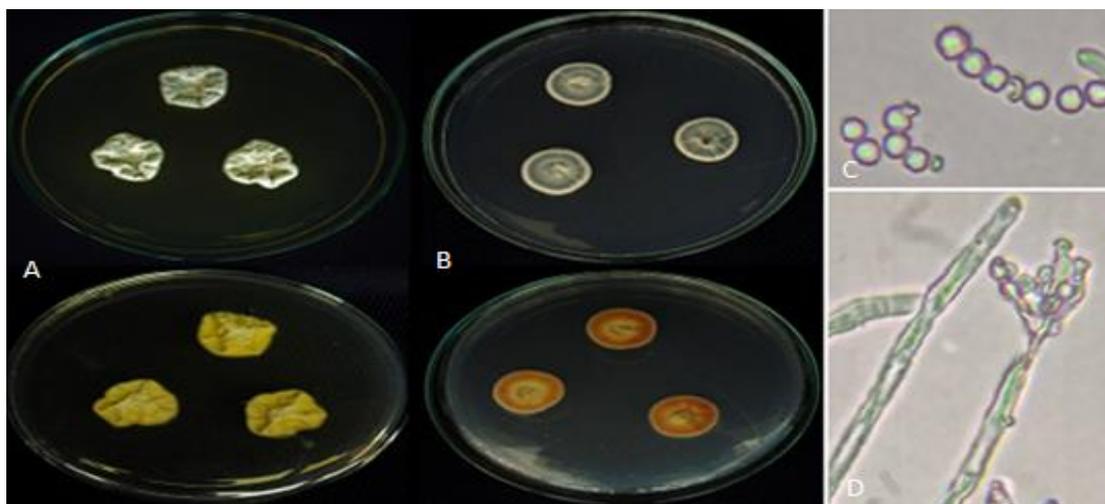
Características macroscópicas y microscópicas de hongos aislados de la fermentación del cacao CCN-51

Penicillium angulare

Esta especie ha sido reportada en coníferas muertas, suelo, cortezas de corchos y madera en descomposición (Visagie et al., 2013). *P. angulare* presenta micelio blanco y azul en medios como CYA y MEA, no posee esclerocio, su conidia es de forma subesférica, mientras que el conidióforo presenta una sola ramificación, su diámetro de crecimiento va de los 17 a 22 mm (Tabla 3).

Figura 3

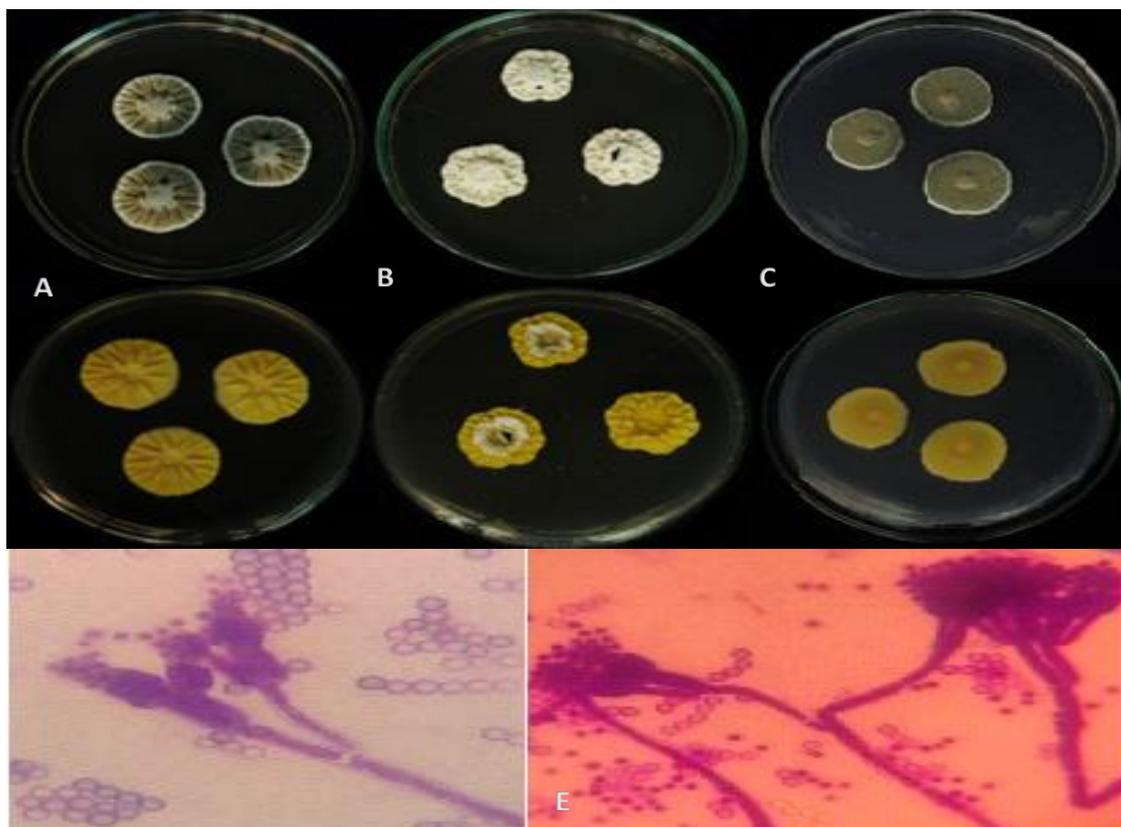
Penicillium angulare



Nota. A-B (haz y envés) colonias de 7 días de incubación a 25°C. En medios de cultivo: A. CYA, B. MEA, C. conidias, D. conidióforos (400x).

Penicillium crustosum

Penicillium crustosum pertenece al género *Penicillium*, sección *Viridicata*; este hongo ha sido reportado en diversos países encontrándose en diferentes alimentos como: nueces, manzanas, queso azul, salami, granos de café, maíz, piensos, así también en ambientes cerrados (Frisvad & Samson, 2004). *P. crustosum* posee micelio de color verde grisáceo, radialmente presenta ligeros surcos, con borde blanco y de textura granular en medio CYA, en medio YES su micelio es blanco y en MEA su color va de verde grisáceo a marrón con borde blanco, mientras que, en el envés, presenta un color amarillo intenso en los tres medios (Figura 4), microscópicamente no presenta esclerocio, es triverticiliado y las conidias tienen una forma completamente esférica (Tabla 3).

Figura 4*Penicillium crustosum*

Nota. A-C (haz y envés) colonias de 7 días a 25°C. En medios de cultivo: A. CYA, B. YES, C. MEA, D y E. conidióforos (400x).

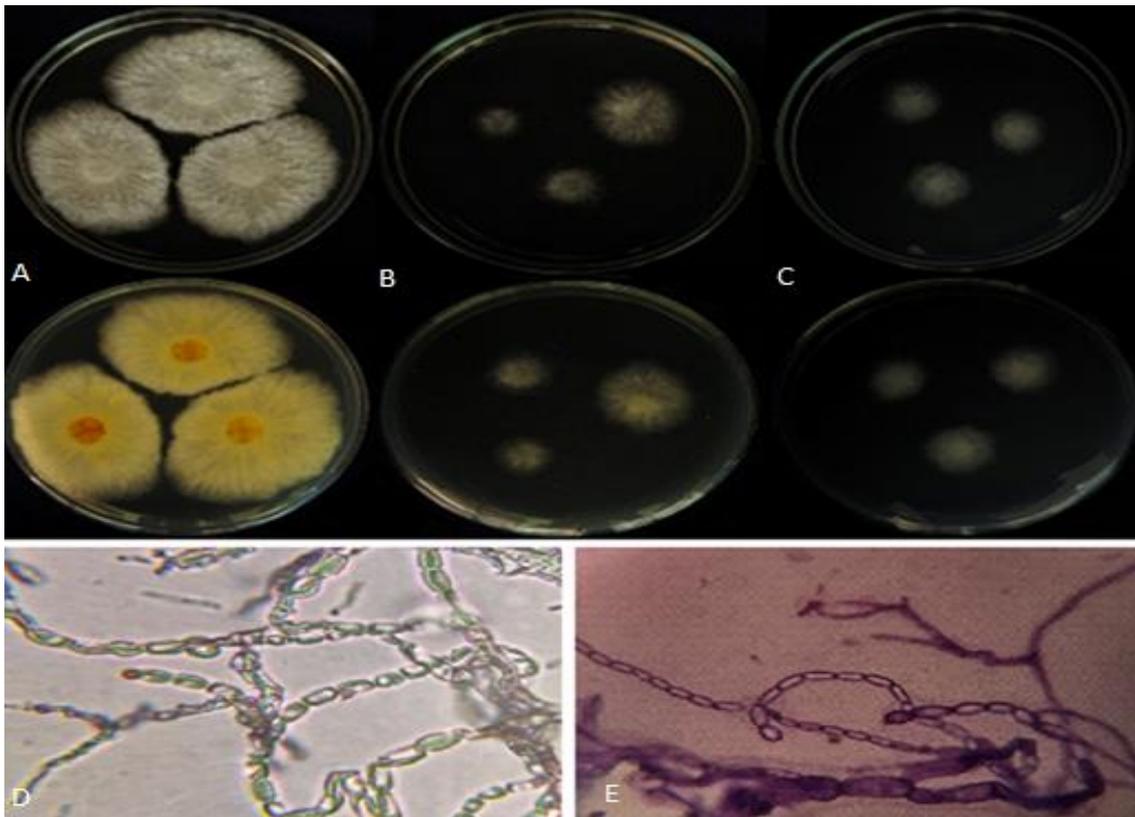
Aspergillus sp.

Este hongo presenta micelio de color blanco, mientras que en el envés en medio CYA su color es amarillo, en YES y MEA blanco (Figura 5). Microscópicamente presenta conidias que se agrupan en forma de cadenas. En CYA su diámetro de crecimiento va de 37 a 44 mm, en YES DE 13 a 24 mm mientras que en MEA de 8 a 18

mm, esta especie crece lento y se observa esporulación después de 10 días de incubación, así como de exudados.

Figura 5

Aspergillus sp.



Nota. A-C (haz y envés) colonias de 7 días a 25°C de incubación. En medios de cultivo: A. CYA, B. YES, C. MEA, D-E. conidias (400x).

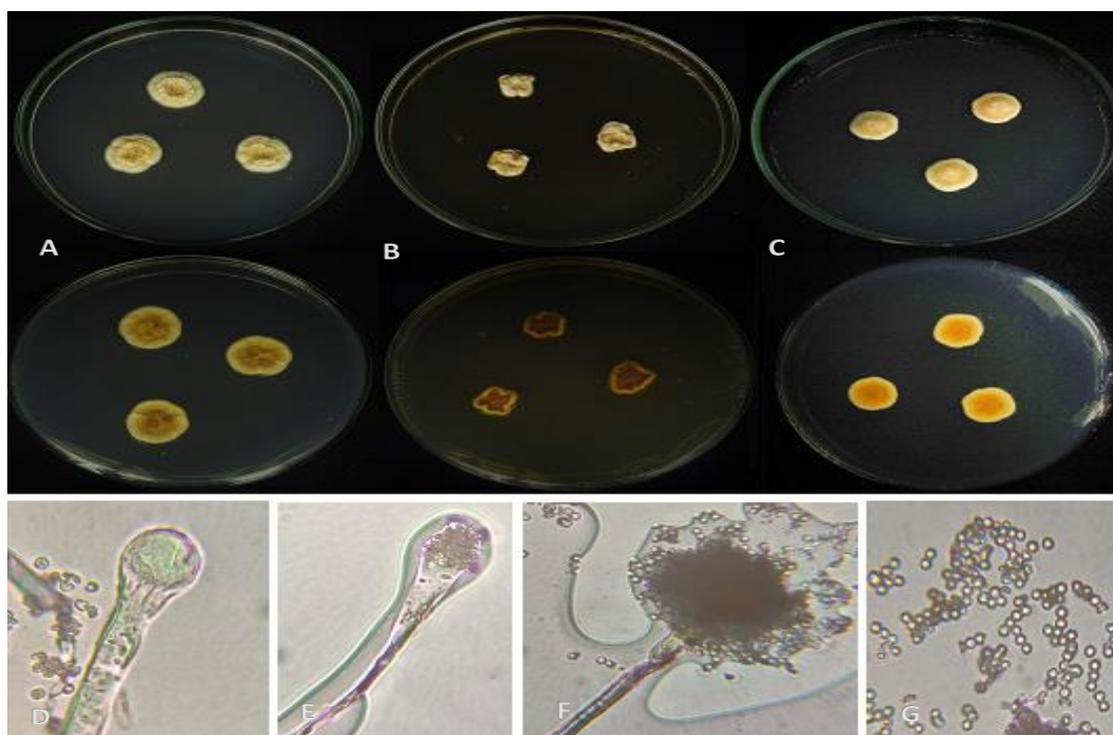
Aspergillus protuberus

Aspergillus protuberus, es un hongo presente en una diversidad de ambientes, así como agente causal de enfermedades micóticas en humanos, esta especie, pertenece al subgénero *Nidulantes*, sección *Versicolores*; presenta un micelio naranja

con tonalidades rosadas y blancas en medio CYA, mientras que en medio YES su color va de amarillo ligeramente rosado y en medio MEA el color de la colonia es de color rosado a anaranjado con borde blanco, en CYA y YES en el envés la colonia es de color marrón y en MEA de un amarillo intenso con borde blanco (Figura 6). Al ser una especie que crece lento, el diámetro de crecimiento alcanzado en CYA fue de 11 a 18 mm, en YES de 12 a 24 mm y en MEA de 9 a 14 mm (Tabla 3), microscópicamente la textura del estípite se observa finamente rugosa, la conidia es globosa y rugosa.

Figura 6

Aspergillus protuberus



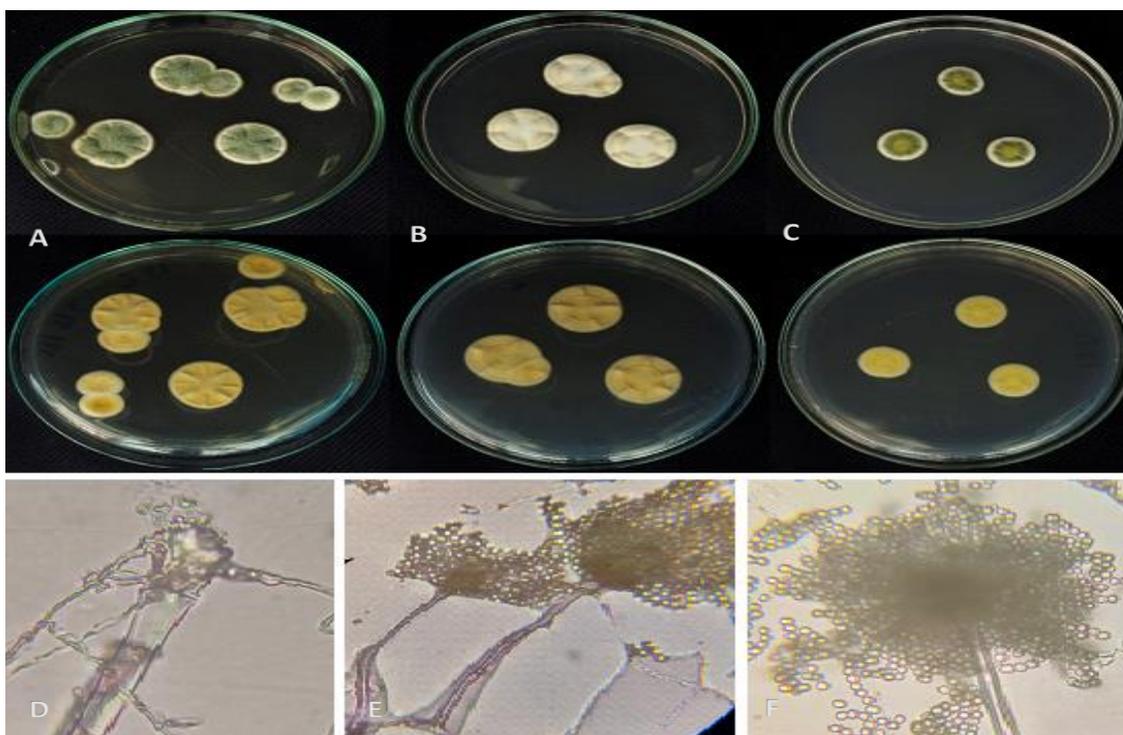
Nota. A-C (haz y envés) colonias de 7 días de incubación a 25°C. En medios de cultivo: A. YES, B. CYA, C. MEA, D-F. conidióforos, G. conidias (400x).

Aspergillus versicolor

Esta especie creció lento, pertenece al subgénero *Nidulantes*, sección *Versicolores* (Pitt & Hocking, 2009).; en medio CYA presenta una coloración verde con blanco, en medio YES el color del micelio es blanco y ligeramente surcado y en MEA presenta color amarillo, verde con borde blanco, mientras tanto en el envés, se presenta un color amarillo cremoso para todos los medios (Figura 7). El diámetro de crecimiento alcanzado por esta especie va desde los 8 a 25 mm (Tabla 3).

Figura 7

Aspergillus versicolor

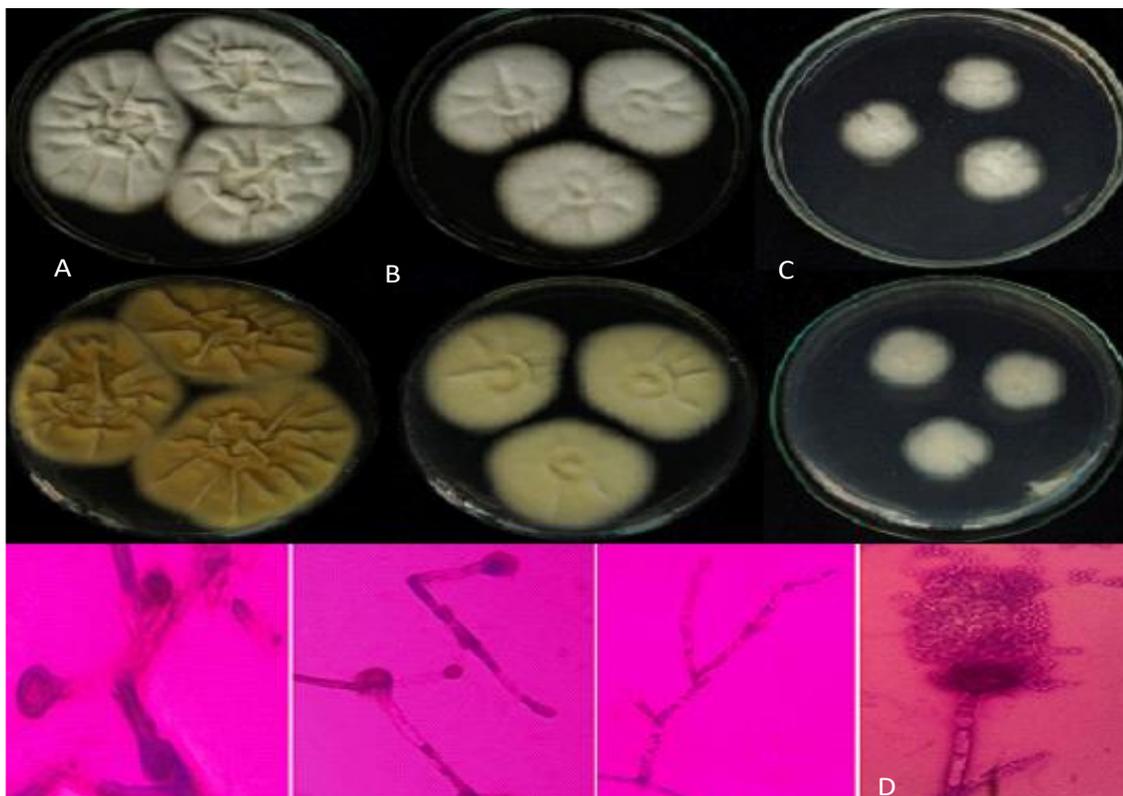


Nota. A-C (haz y envés) colonias de 7 días de incubación a 25°C. En medios de cultivo: A. CYA, B. YES, C. MEA, D-F. conidióforos (400x).

Neosartorya hiratsukae

Este hongo posee micelio color blanco en medio CYA, YES y MEA, mientras que, en el envés presenta tonalidades que van desde amarillo a crema y blanco, así también, se observan ligeros surcos, su textura es aterciopelada; la conidia es globosa y se dispone de forma columnar, el aspergilli es uniseriado (Figura 8). En CYA alcanza un crecimiento entre los 38 a 53 mm, YES 37 a 55 mm y en medio MEA de 23 a 31 mm (Tabla 3).

Neosartorya hiratsukae constituye una especie teleomórfica perteneciente al género *Aspergillus* sección *Fumigati*; esta especie se encuentra como contaminante en procesos que requieren elevadas temperaturas, así como en ciertos productos alimenticios, suelo, pulpas de frutas, ambientes cerrados, además de afectar la salud humana, donde causa enfermedades como: aspergilosis, osteomielitis, endocarditis y queratitis micótica (Samson et al., 2007; Smith, 1994).

Figura 8*Neosartorya hiratsukae*

Nota. A-C (haz y envés) colonias de 7 días de incubación a 25°C. En medios de cultivo:

A. CYA, B. YES, C. MEA, D. conidióforo (400x).

Tabla 3

Características macroscópicas y microscópicas de especies de Aspergillus y Penicillium aislados de la fermentación del

cacao

Nombre del organismo	Diámetro de la colonia (mm)			CYA		YES		MEA		Conidióforos		
	CYA	YES	MEA	Color de la colonia	Anverso	Color de la colonia	Anverso	Color de la colonia	Anverso	Esclerocio	Ramificaciones	Forma de la conidia
<i>Penicillium angulare</i>	17-22	17-21	15-18	blanco y azul	amarillo	blanco y azul opaco	amarillo	blanco, azul grisáceo	amarillo y blanco	ausente	monoverticiliado	subesférica
<i>Penicillium crustosum</i>	22-24	24-28	21-25	verde, azul, blanco	amarillo	blanco	amarillo, blanco	blanco verde opaco, amarillo, marrón	amarillo	ausente	triverticiliado	esférica
<i>Aspergillus protuberus</i>	11-18	12-24	9-14	naranja pálido, grisáceo ligeramente rosado	marrón, borde amarillo	amarillo, ligeramente naranja	marrón opaco, borde blanco	rosado anaranjado, borde blanco	amarillo intenso, borde blanco	ausente		globosa
<i>Aspergillus versicolor</i>	15-25	16-21	8-15	verde, borde blanco	amarillo crema	blanco, ligeramente anaranjado	amarillo crema	verde, amarillo, borde blanco	amarillo crema	ausente		esférica
<i>Aspergillus</i> sp.	37-44	13-24	8-18	blanco	amarillo	blanco	blanco, crema	blanco	blanco	ausente		
<i>Neosartorya hiratsukae</i>	38-53	37-55	23-31	blanco	blanco, crema	blanco	blanco	blanco	blanco	ausente	no se observa	globosa

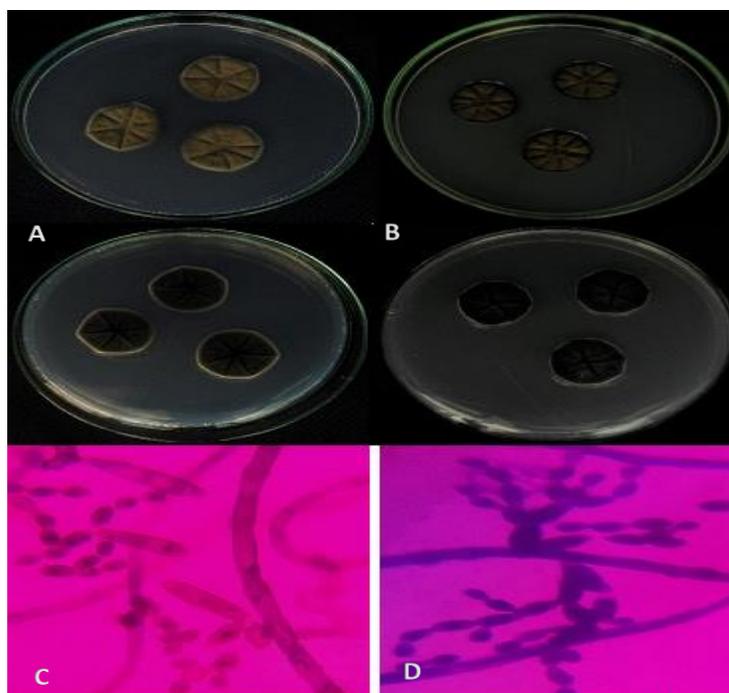
Nota. Colonias de 7 días de incubación a 25°C.

Cladosporium cladosporioides

En PDA y MEA el micelio es escaso, de color verde opaco o gris oliváceo, radialmente surcado, en el envés se presenta un color negro con borde blanco (Figura 9). De igual manera el diámetro de su colonia va de los 17 a 21 mm después de 7 días a 25°C para ambos medios (Tabla 4). Visto al microscopio se observan pocas ramificaciones de la hifa misma que es septada y hialina, de conidióforos solitarios, los conidios de forma ovoide a subcilíndrica y se agrupan en cadenas.

Figura 9

Cladosporium cladosporioides



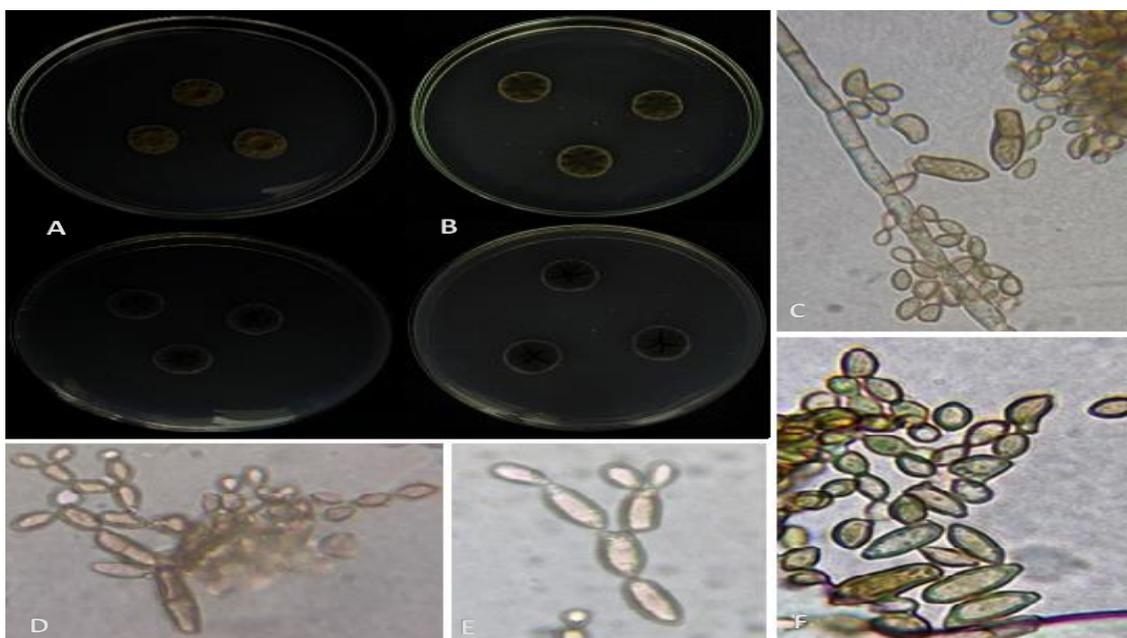
Nota: A-B (haz y envés) colonias de 7 días de incubación a 25°C. En medios de cultivo: A. MEA, B. PDA, C y D. micronematosas, ramas de conidios y cadenas conidiales (400x).

Cladosporium ramotenellum

Microscópicamente se observaron hifas rectas y septadas, las células conidiógenas al igual que los conidios se disponen de manera intercalada, los ramoconidios van de forma elipsoide a ovoide. En PDA la colonia tiene un diámetro de crecimiento que va de 14 a 16 mm después de 7 días de incubación a 25°C, además, la colonia se presenta surcada radialmente, de textura aterciopelada de color verde grisáceo con bordes regulares ligeramente blancos, en el envés se aprecia un color negro, con grietas y borde blanco. En medio MEA su crecimiento es convexo y se observan arrugas y escaso micelio (Figura 10).

Figura 10

Cladosporium ramotenellum



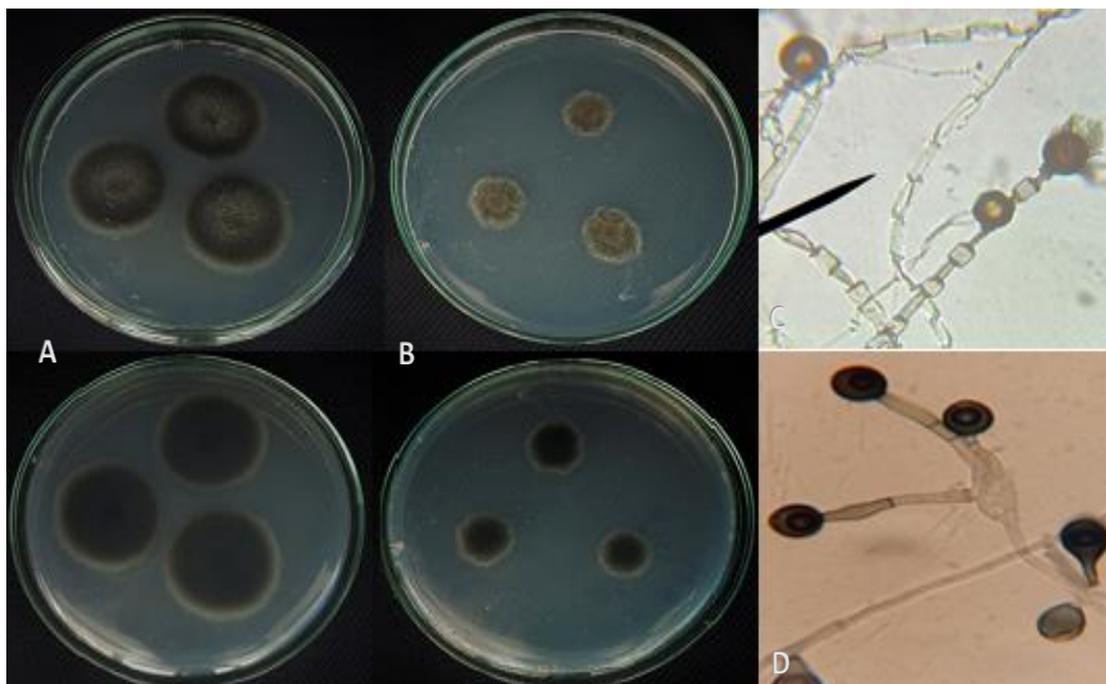
Nota. A-B (haz y envés) colonias de 7 días de incubación a 25°C. En medios de cultivo: A. MEA, B. PDA, C. Conidióforo macronematoso, D-F. ramoconidios y conidios (400x).

Humicola fuscoatra

Su conidia es globosa y pigmentada, se presenta solitaria y crece lateralmente sobre la hifa que es hialina. En MEA su diámetro de crecimiento va de 14 a 16 mm después de 7 días de incubación a 25°C, la colonia tiene bordes irregulares de color blanquecino y su micelio es de color marrón a gris, en el anverso es de color negro a marrón grisáceo (Figura 11). En PDA la colonia es de color negro con borde marrón, su crecimiento es de 15 a 27 mm (Tabla 4). En ambos medios se observa una fina capa de hifas.

Figura 11

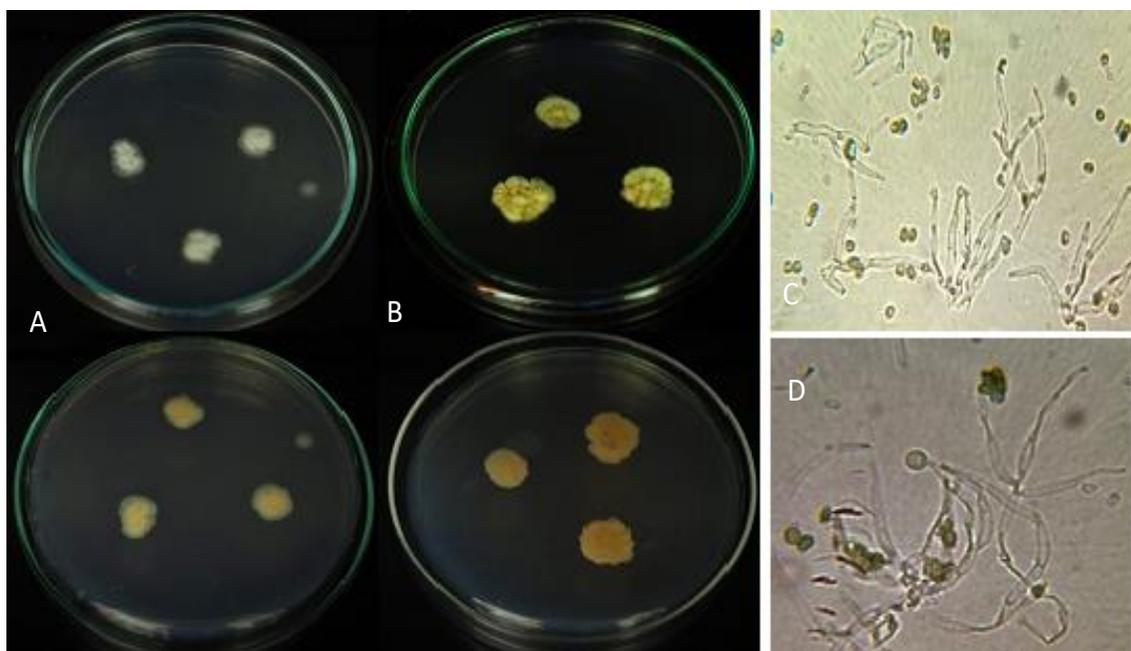
Humicola fuscoatra



Nota. A-B (haz y envés) colonias de 7 días de incubación a 25°C. En medios de cultivo: A. PDA, B. MEA, C-D. conidias (400x).

Gliomastix murorum

En MEA la colonia es de color blanco, mientras que en el envés se observa un color rosado tenue, sin embargo, en medio PDA su color va de blanco a ligeramente rosado y en el anverso de rosado pálido a amarillo; el diámetro de crecimiento es de 11 a 22 mm en MEA y en PDA de 13 a 18 mm (Tabla 4). El micelio es flocoso, la hifa es tabicada y hialina, las fialideas son sinuosas y hialinas, además las fialideas pueden agregarse a manera de cadena o en una célula terminal (Figura 12).

Figura 12***Gliomastix murorum***

Nota. A-B (haz y envés) colonias de 7 días de incubación a 25°C. En medios de cultivo: A. MEA, B. PDA, C-D. fialideas y conidias (400x).

Tabla 4

Características macroscópicas y microscópicas de diferentes especies aisladas de la fermentación del cacao

Nombre del Organismo	Diámetro de la Colonia (mm)		MEA		PDA		Conidióforos	
	MEA	PDA	Color del Micelio	Anverso	Color del Micelio	Anverso	Esclerocio	Forma del Conidio
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	17-21	17-20	verde grisáceo o verde oliváceo	negro con borde blanco	verde grisáceo o verde oliváceo	negro con borde blanco	ausente	subesférica
<i>Cladosporium ramotenellum</i>	12-16	14-16	verde opaco o verde grisáceo	negro con borde blanco	verde grisáceo, borde blanco	negro con borde blanco	ausente	esférica
<i>Humicola fuscoatra</i>	14-16	15-27	gris, negro, borde blanquecino	negro, borde blanco	marrón grisáceo, borde blanco	negro, borde marrón	ausente	globosa a subglobosa
<i>Gliomastix murorum</i>	11-22	13-18	blanco crema	rosado pálido	blanco, ligeramente rosado	amarillo, rosa pálido	ausente	elipsoidal a subglobosa

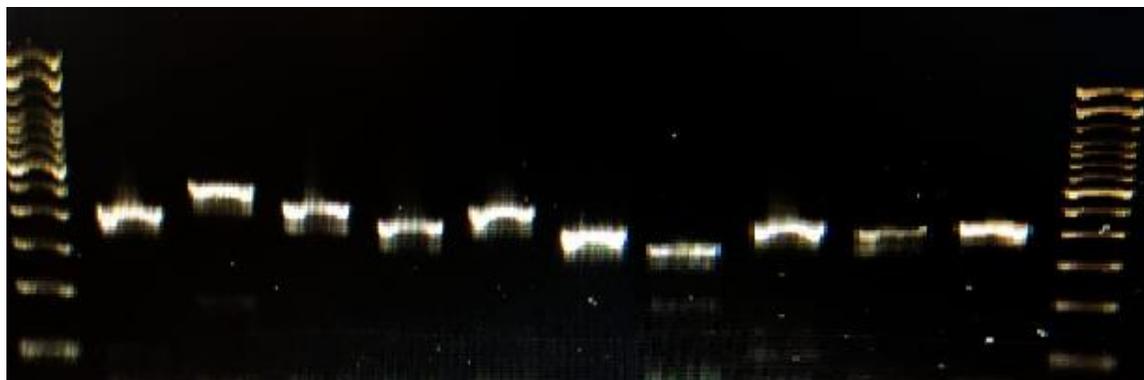
Nota. colonias de 7 días de incubación a 25°C.

Identificación molecular

El ADN de los hongos se amplificó por PCR usando primers Betatubulina ($\beta t2a$ y $\beta t2b$) (Figura 13) e ITS (ITS1, ITS5 e ITS4), el producto PCR amplificó entre 400 a 550 pares de bases. *P. angulare*, *C. cladosporioides*, *H. fuscoatra*, *A. protuberus*, *G. murorum* y *C. ramotenellum* amplificaron para ITS1 e ITS4, mientras que, *N. hiratsuake*, *P. crustosum* y *A. versicolor* amplificaron para ITS5 e ITS4. Sin embargo, el aislamiento *Aspergillus* sp. no amplificó para ITS.

Figura 13

Amplificación de ADN usando primers de betatubulina (βenA)



Nota. Gel de agarosa al 2%; de izquierda a derecha: marcador molecular, *N. hiratsuake*, *P. angulare*, *C. cladosporioides*, *P. crustosum*, *H. fuscoatra*, *Aspergillus* sp., *A. protuberus*, *G. murorum*, *C. ramotenellum* y *A. versicolor*, marcador molecular.

Los resultados de secuenciación se compararon con secuencias de bases de nucleótidos para la región ITS publicadas en el GenBank a través de la herramienta BLAST con el apoyo del Software Geneious Prime® 2021.2.2, se consideraron aquellas que tenían un porcentaje de similitud sobre el 90% (Tabla 5). La amplificación con primers Betatubulina (βenA) permitió confirmar los resultados obtenidos con ITS.

Tabla 5

Resultados BLAST en base al % de similitud para secuencias de bases nitrogenadas de la región ITS

Especie	Porcentaje de Similitud	Cepa	Muestra	País	Accesión GenBank
<i>Penicillium crustosum</i>	99,47%	<i>Penicillium crustosum</i> strain M7		Italia	MN007130
	99,50%	<i>Penicillium crustosum</i> isolate MGK19	Especie marina <i>Botryllus maeandrius</i>	Sudáfrica	MT738586
	99,50%	<i>Penicillium crustosum</i> strain DTO_244H8	Polvo al interior de la casa	Nueva Zelanda	KJ775628
	99,50%	<i>Penicillium crustosum</i> isolate 130		USA	KU847869
	99,50%	<i>Penicillium crustosum</i> strain CBS 115503		Reino Unido	MH862985
<i>Penicillium angulare</i>	100%	<i>Penicillium angulare</i> strain GLMC 1646	<i>Prunus domestica</i>	Alemania	MT156114
	99,60%	<i>Penicillium angulare</i> strain CBS 130293		Holanda	KC773828
	99,60%	<i>Penicillium angulare</i> isolate NRRL 35630	Corteza de corcho	USA	EF200087
	99,60%	<i>Penicillium angulare</i> strain ND99		Zimbabue	MG659693
	99,60%	<i>Penicillium angulare</i> strain DUCC5723	Ambientes interiores	Sur Corea	MT582763
<i>Aspergillus protuberus</i>	100%	<i>Aspergillus protuberus</i> isolate MNM005	Fluido del rumen	Bangladesh	MW578518
	100%	<i>Aspergillus protuberus</i> strain ATHUM9532	Ambientes interiores	Grecia	MT990724

Especie	Porcentaje de Similitud	Cepa	Muestra	País	Accesión GenBank
<i>Aspergillus versicolor</i>	100%	<i>Aspergillus protuberus</i> strain KAS 5660	Polvo de casa	Canadá	KX894650
	100%	<i>Aspergillus protuberus</i> UTHSC 12-256		España	LN898712
	100%	<i>Aspergillus versicolor</i> strain C-27		Polonia	MN782425
	100%	<i>Aspergillus versicolor</i> strain J39	Tallo de la planta	China	KF572438
	100%	<i>Aspergillus versicolor</i> strain NHRC-FE078	Turba	USA	AJ937755
<i>Gliomastix murorum</i>	100%	<i>Aspergillus versicolor</i> strain CBS 117.34		Japón	MH855466
	100%	<i>Gliomastix murorum</i> strain CBS 194.70		Alemania	MH859553
	100%	<i>Gliomastix murorum</i> strain: T6713-14-2		Japón	AB540540
	100%	<i>Gliomastix murorum</i> strain KAUh6	Agua	Arabia Saudita	LN813028
<i>Humicola fuscoatra</i>	100%	<i>Gliomastix murorum</i> isolate S2-7	Sedimentos de cueva de murciélagos	Bulgaria	LT623993
	100%	<i>Humicola fuscoatra</i> strain 0080	Madera de la vid		KU721883
	99,8%	<i>Humicola fuscoatra</i> strain 37215aDRJ	Ave: pico dorsiblanco (<i>Dendrocopos leucotos</i>)	Polonia	MF782777
	99,8%	<i>Humicola fuscoatra</i> isolate 323J14	Raíz de árbol de abeto	Polonia	KU516488
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	93,2%	<i>Humicola fuscoatra</i> isolate 6396		India	MG551568
	100%	<i>Cladosporium cladosporioides</i> voucher BRIP 70540	Árbol de macadamia	Australia	MZ303796

Especie	Porcentaje de Similitud	Cepa	Muestra	País	Accesión GenBank
	100%	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain CBS 101367	Suelo	Brasil	HM148002
	100%	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain Cc-3	Hojas de alcachofa	Turquía	MW278872
	100%	<i>Cladosporium cladosporioides</i> isolate Clad3	Pared de una casa	Italia	HG992995
<i>Cladosporium ramotenellum</i>	99,6%	<i>Cladosporium ramotenellum</i> isolate E22285	Yogurt	USA	MK267741
	99,6%	<i>Cladosporium ramotenellum</i> culture CBS:121628	Agua hipersalina	Eslovenia	EF679384
<i>Neosartorya hiratsukae</i>	100%	<i>Aspergillus hiratsukae</i> strain CBS 294.93	Jugo de sábila pasteurizado	Japón	MH862403
	100%	<i>Neosartorya hiratsukae</i> strain MCCL-840003	Humanos	India	EU593904
	99,4%	<i>Neosartorya hiratsukae</i> strain SGLAf37	Ramas de tejo mexicano (<i>Taxus globosa</i>)	México	EU715611
	99,3%	<i>Neosartorya hiratsukae</i> strain UOA/HCPF 10765	Piel humana	Grecia	GQ461906

Pruebas de antagonismo

Una vez identificados los selectos aislamientos del proceso fermentativo del cacao, se realizaron las pruebas de antagonismo con aquellas especies que representan un riesgo para la salud humana, así como perjudiciales para calidad del cacao, los hongos seleccionados fueron: *Neosartorya hiratsukae*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium crustosum* y *Aspergillus versicolor*. La actividad antifúngica de *B. subtilis* Ctpx S2-1 se evaluó a los 6 días.

Se encontró un efecto significativo de la interacción de *B. subtilis* Ctpx S2-1 y hongos de la fermentación ($F_{3,24}=160,13$; $P=0,001$). La biomasa de *B. subtilis* Ctpx S2-1 tuvo un mayor efecto de inhibición en el crecimiento de *Neosartorya hirasukae* en un 39,35% y de *Penicillium crustosum* del 38,13%, sin embargo, con el uso de lipopéptidos, el mayor porcentaje de inhibición se encontró para *Penicillium crustosum* en un 32,18% (Tabla 6).

Tabla 6

Porcentaje de inhibición ± desviación estándar de B. subtilis contra hongos de la fermentación del cacao

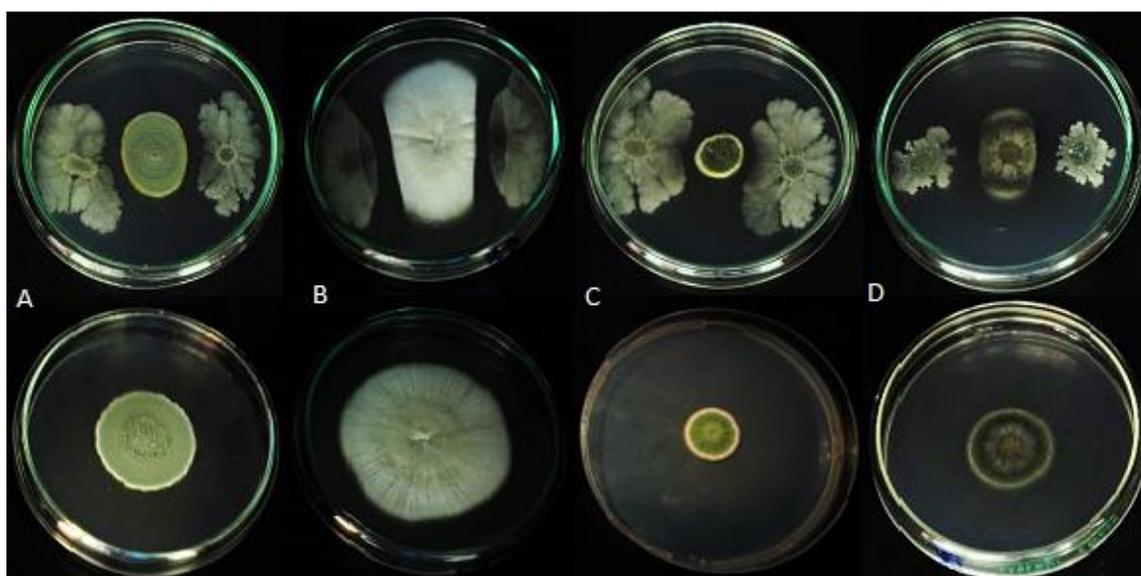
Hongos	% de inhibición de <i>B. subtilis</i> Ctpx S2-1	
	Biomasa	Lipopéptidos
<i>Neosartorya hiratsukae</i>	39,35 ± 1,63 a	11,10 ± 0,99 c
<i>Penicillium crustosum</i>	38,13 ± 0,86 a	32,18 ± 1,82 a
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	28,17 ± 2,09 b	18,81 ± 0,83 b
<i>Aspergillus versicolor</i>	15,6 ± 1,91 c	19,38 ± 1,25 b

Nota. Medias ± Desviación estándar (n=4) con la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan, $p<0,05$).

N. hiratsukae y *P. crustosum* fueron las especies de hongos filamentosos que presentaron una mayor inhibición por acción de la biomasa de *B. subtilis* en relación a su control (Figura 14).

Figura 14

Actividad antifúngica de biomasa de *B. subtilis* frente a hongos filamentosos presentes en la fermentación de almendra de cacao luego de 6 días de incubación a 25°C.



Nota. Parte superior prueba dual, parte inferior control. A. *Penicillium crustosum*, B. *Neosartorya hiratsukae*, C. *Aspergillus versicolor*, D. *Cladosporium cladosporioides*.

Discusión

Aislamiento e identificación de hongos

En este estudio el diámetro de crecimiento es una de las variables que más discrepancias ha presentado para géneros como *Aspergillus* y *Penicillium*, ya que, de acuerdo a Samson & Pitt, (1986) puede diferir, debido a que la presencia de diversos puntos de crecimiento del inóculo puede interferir en el crecimiento, esporulación y textura de la colonia, así como el completo desarrollo de estructuras.

P. angulare presenta un diámetro de crecimiento de 13-18 mm en medio CYA y de 9 a 15 mm en MEA, Visagie et al. (2013), reportó que, este organismo monoverticiliado crece de 13 a 25 mm en medio CYA, de 16-28 mm en YES y en MEA de 10 a 20 mm; asimismo *P. crustosum* presentó una elevada esporulación después de 7 días de crecimiento donde se observan estructuras bien desarrolladas, en medio YES además de un color amarillo intenso en el anverso de la colonia (Frisvad & Samson, 2004). El género *Penicillium* se distribuye a nivel mundial, de tal forma que, *P. crustosum* se ha encontrado en frutas como las pomáceas, así también en carne seca, cartón, cuero y textiles; tanto *P. angulare* y *P. crustosum* se ha informado su presencia en madera (Frisvad & Samson, 2004; Visagie et al., 2013); y si consideramos que una plantación de cacao se encuentra rodeada de otros árboles no es tan alejado de la realidad que estas especies hayan sido aisladas de la fermentación del cacao, como lo reportó Mounjouenpou et al., (2008) al aislar *P. crustosum* de mazorcas que fueron abiertas después de 10 días de cosechadas, fermentadas de forma apilada y secadas al sol, pero, debemos preguntarnos ¿cómo estas especies logran tolerar temperaturas tan altas de hasta 50°C ?, cuando se ha demostrado su máximo crecimiento de hasta los

30°C (Pitt & Hocking, 2009). En cuanto a sus micotoxinas *P. crustosum* produce penitrem A una neurotoxina capaz de generar temblores en humanos y esta especie tiende a proliferar más cuando la humedad del ambiente es muy alta (Pitt & Hocking, 2009); además se ha encontrado que *P. crustosum* es capaz de producir alrededor 48,01 ng/g de ocratoxina A en almendras de cacao (Mounjouenpou et al., 2008), por ello la importancia de remover las almendras de dos a tres veces durante el día, además de mantener un ambiente inocuo para evitar la proliferación de esporas de hongos.

El género *Aspergillus* representan los hongos más contaminantes de alimentos, piensos y ambientes cerrados y en la fermentación del cacao no es la excepción, ya que de acuerdo a Sánchez-Hervás et al., (2008) de un total de 420 cepas aisladas el 83,8% pertenecen al género *Aspergillus*, de ello el 51% a la sección *Flavi* y el 32,8% a la sección *Nigri*, asimismo, encontró *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus terreus*; así también Copetti et al., (2011), aísla *A. versicolor* de los últimos días de la fermentación del cacao, salas de almacenamiento y en productos terminados. Por otra parte, Mounjouenpou et al., (2008) encuentra *A.versicolor* tanto en cacao que es inmediatamente abierto después de la cosecha, así como en el que se abre después de 10 días ya sea de la fermentación en cajas o en pilas. Sin embargo, *A. protuberus* no ha sido reportado como tal en la poscosecha del cacao, pero, otra de las formas para denominar a este hongo es *Aspergillus versicolor* var. *protuberus*, por lo tanto, pertenece a la sección *Versicolores* (Jurjevic et al., 2012; Samson et al., 2014).

Las aflatoxinas y la ocratoxina A constituyen las micotoxinas más perjudiciales a la salud del consumidor. Especies como *Aspergillus versicolor* producen micotoxinas como la esterigmatocistinas y versicolorinas, que a pesar de no haberse encontrado en alimentos, se ha reportado casos clínicos de necrosis hepática debido a las esterigmatocistinas; así mismo, *Aspergillus fumigatus* y su micotoxina gliotoxina que tiene propiedades inmunosupresoras y ocasionan enfermedades como la aspergiliosis (Smith, 1994).

El género *Cladosporium* corresponde a hongos saprófitos, fitopatógenos, de amplia distribución geográfica, encontrándose en la albura de la madera e incluso en ambientes interiores, en el caso de plantas se ha reportado que la familia myrtaceae constituye el gran hospedante de este hongo (Bensh et al., 2010); de tal manera, Sánchez-Hervás et al., (2008) aísla *Cladosporium oxisporum* de la fermentación y granos secos de cacao, las muestras procedían de Sierra Leona y Ecuador; así mismo Copetti et al. (2011) en Bahía-Brasil encuentran *Cladosporium* sp. en muestras de cacao almacenadas, por ello debe evitarse almacenar el cacao por un período mayor a tres meses, y el contenido de humedad en el grano debe ser del 7%.

Al igual que *Penicillium* y *Aspergillus*, el género *Gliomastix* posee una amplia distribución a nivel mundial encontrándose en gran parte en el continente europeo así como en Canadá y Nueva Zelanda, hallándose en madera, suelo, yute, avena y algunas solanáceas (Dickinson, 1968); en tanto que, *Humicola fuscoatra* ha sido aislada en muestras de suelo tanto en China y Noruega (Wang et al., 2019) y también es capaz de producir micotoxinas como la esterigmatocistina (Hocking et al., 2006). Es importante mencionar que estas especies no se han reportado en la poscosecha del cacao, pero si

se han encontrado levaduras como *Candida humicola* y *Candida pelliculosa*, especies que representan menos 5% de la microbiota de levaduras de la fermentación (Ardhana & Fleet, 2003).

Los marcadores moleculares constituyen una herramienta de apoyo indispensable a la hora de identificar especies, pero, cuando estas especies están relacionadas muy estrechamente entre ellas, se debe recurrir también al uso de marcadores secundarios, como es el caso de primers de betatubulina (*βenA*); para especies como *Penicillium* el uso de betatubulina no siempre permite corroborar resultados obtenidos con ITS ya que ciertas regiones se alinean ambiguamente, así también, para *Aspergillus* y *Talaromyces betatubulina* puede amplificar para genes parálogos (Visagie et al., 2014).

Actividad antifúngica

El porcentaje de inhibición obtenido en esta investigación tanto para biomasa como para lipopéptidos es bajo en relación a otros estudios publicados respecto a la actividad antifúngica de *B. subtilis* frente a hongos, es así que los lipopéptidos *B. subtilis* CPA-8 inhibieron el crecimiento de *Monilinia laxa* en un 93,4% y *Monilinia frutícola* en un 88,8% (Yáñez-Mendizábal et al., 2012), asimismo la biomasa de *B. subtilis* cepa Ctpx S2-1 inhibió el crecimiento de *Colletotrichum acutatum* en un 100% (Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2018), de la misma manera McKeen et al., (1986) evaluó el potencial antifúngico de un extracto de antibiótico de *B. subtilis* frente a una amplia gama de patógenos alcanzando un halo de inhibición máximo del 37 mm para *Endothia parasitica*, 23 mm para *Penicillium expansum* y 12 mm para *Phytophthora cactorum*. De acuerdo con Bajaj et al., (2014) *B. subtilis* es una especie que compete por glucosa,

este nutriente limita el crecimiento y en pruebas en co-cultivo con *Penicillium chrysogenum* el hongo no responde bien ante el déficit de este nutriente en el medio por lo cual se ve inhabilitado de producir metabolitos secundarios antimicrobianos, y la interacción de ambos individuos produce mutanasas (α -1,3-glucanasas) que son enzimas fúngicas secretadas en la pared celular de hongos. Además, las fengicinas extraídas de *B. subtilis* cepa F-29-3 a una dosis de 1000 $\mu\text{g/mL}$ frente a *Aspergillus fumigatus* no presentó zona de inhibición, esto puede deberse al contenido de esteroides en la membrana celular de los hongos (Vanittanak et al., 1986).

Se debe garantizar la inocuidad de los procesos poscosecha en la cadena de comercialización del cacao, ya que la presencia de hongos contaminantes constituye un riesgo para la salud del consumidor, así como la pérdida de valor del cacao por efecto de hongos que deterioran la calidad en aroma y sabor, para ello es importante trabajar en estrategias que permitan controlar el ataque de patógenos en cada una de las etapas de la poscosecha, generando así un bienestar económico para quienes lo producen, así como para quienes lo consumen.

Capítulo V

Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

Se aislaron 10 hongos del proceso de fermentación del cacao CCN-51, correspondientes al día final del proceso fermentativo. De los cuales 3 corresponden al género *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Cladosporium* sp. con dos representantes cada uno, así también se encontró *Gliomastix murorum*, *Humicola fuscoatra*, *Neosartorya hiratsukae*, la mayoría de estos hongos han sido aislados de muestras de suelo, productos alimenticios y piensos, así como de ambientes interiores y de los cuales solo *P. crustosum*, *Aspergillus* sp. y *Aspergillus versicolor* han sido reportados en la poscosecha del cacao al igual que el género *Cladosporium*.

La caracterización macro y microscópica constituye una herramienta indispensable a la hora de identificar microorganismos, y por ello es importante considerar el medio ideal de crecimiento del hongo ya que de ello dependerá el correcto desarrollo de estructuras anatómicas de cada especie, así como condiciones de incubación y métodos de siembra.

La identificación molecular de hongos filamentosos con ITS debe apoyarse en el uso de primers secundarios como Betatubulina (*βenA*) que permitan confirmar resultados, ya que géneros como *Aspergillus* y *Penicillium* están estrechamente relacionados y se puede incurrir en errores al definir especies.

Se encontró un efecto significativo de la interacción bacteria y hongos de la fermentación del cacao, la biomasa de *B. subtilis* presentó un mayor porcentaje de

inhibición para *Neosartorya hiratsukae* y *Penicillium crustosum*, mientras que los lipopéptidos inhiben el crecimiento de *P. crustosum*.

Recomendaciones

Llevar a cabo un estudio más exhaustivo sobre cuáles son los principales factores que ocasionan el ingreso de patógenos en la cadena de poscosecha del cacao, desde la fermentación, secado, almacenamiento y comercialización de la almendra. Además de determinar si el genotipo de cacao es un factor de riesgo frente al ataque de patógenos ya que la pulpa de la almendra constituye el sustrato de crecimiento de un complejo conglomerado de microorganismos y esta varía de acuerdo a cada genotipo.

Se deben realizar estudios moleculares de expresión génica con la finalidad de determinar y cuantificar qué genes de patogenicidad se activan por parte de *B. subtilis* frente a hongos filamentosos y conocer desde qué día se gatillan sus componentes antifúngicos.

Bibliografía

- Akinfala, T. O., Houbraken, J., Sulyok, M., Adedeji, A. R., Odebode, A. C., Krska, R., & Ezekiel, C. N. (2020). Moulds and their secondary metabolites associated with the fermentation and storage of two cocoa bean hybrids in Nigeria. *International Journal of Food Microbiology*, 316. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108490
- Anecacao. (2019). *Sector exportador de cacao*. Asociación Nacional de Exportadores de Cacao e Industrializados del Ecuador.
- Ardhana, M., & Fleet, G. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 87-99. doi:10.1016/S0168-1605(03)00081-3
- Bajaj, I., Veiga, T., Van Dissel, D., Pronk, J., & Daran, J. (2014). Functional characterization of a *Penicillium chrysogenum* mutanase gene induced upon co-cultivation with *Bacillus subtilis*. *BMC Microbiology*, 14(114).
- Bensh, K., Groenewald, J., Dijksterhuis, J., Starink-Willense, M., Andersen, B., Summerell, B. A., Crous, P. (2010). Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Mycology*, 67, 1-94. doi:doi:10.3114/sim.2010.67.01
- CAF. (2018). *Observatorio del cacao fino y de aroma para América Latina*.
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos.
- Carrión, J. (2012). *Estudio de factibilidad para la producción y comercialización de cacao (Theobroa cacao L.) variedad CCN-51, Jama-Manabí*. Universidad San Francisco de Quito.

- Castro-Alayo, E. M., Idrogo-Vásquez, G., Sichie, R., & Cárdenas-Toro, F. P. (2019). Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. *Heliyon*. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01157
- Cedeño, S. (2011). *La revolución del cacao CCN-51 en el Ecuador "Un ejemplo de prosperidad sostenible"*. Nassau, Bahamas. Obtenido de <http://apccacao.org/descargas/seminario2011/Revoluci%F3n%20del%20Cacao%20CCN-51%20en%20Ecuador%202011%20%20Marzo.pdf>
- Chen, H., Wang, L., Su, C. X., Gong, G. H., Wang, P., & Yu, Z. L. (2008). Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*, 47(3), 180-186. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02412.x
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Frisvad, J. C., Pereira, J. L., & Taniwaki, M. H. (2011). Mycobiota of cocoa: from farm to chocolate. *Food Microbiology*, 28(8), 1499-1504. doi:10.1016/j.fm.2011.08.005
- Dickinson, C. (1968). *Gliomastix guéguen* (Vol. 15). Dublin, Irlanda.
- Dutan, S., Amaya, J., Nugra, F., & Palacios, B. (2019). Plan de desarrollo y ordenamiento territorial del cantón Vinces.
- Erazo, C. (2019). *Diseño de un fermentador y secador solar piloto, para dos variedades de cacao (Theobroma cacao L), en el cantón El Empalme, provincia del Guayas*. Universidad Internacional SEK.
- Falconí, C. E. (1998). *Fitopatología práctica* (1 ed.).
- Falconí, C. E., Visser, R. G., & Van Heusd, A. (2013). Phenotypic, Molecular, and Pathological Characterization of *Colletotrichum acutatum* Associated with Andean Lupine and Tamarillo in the Ecuadorian Andes. *Plant Disease*, 97(6), 819-827. doi:10.1094/PDIS-02-12-0175-RE

- Frisvad, J., & Samson, R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. 174.
- Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primers sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1323-1330. doi:10.1128/AEM.61.4.1323-1330.1995
- Hatmi, R. U., Kobarsih, M., & Cahyaninfrum, N. (2015). Fungi level analysis of cocoa beans based on fermentation box type and duration. *Procedia Food Science*, 3, 371-382. doi:10.1016/j.profoo.2015.01.041
- Hayes, D., Kitamoto, D., Solaiman, D., & Ashby, R. (2009). Biobased surfactants and detergets synthesus, properties and applications.
- Ho, V. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2015). The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 54-67. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.031
- Hocking, A. D., Pitt, J. I., Samson, R. A., & Thrane, U. (2006). *Advances in food mycology* (Vol. 571). Advances in Experimental Medicine and Biology.
- Houbraken, J. A., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2010). Taxonomy of *Pencillium citrinum* and related species. *Fungal Diversity*, 44(1), 117-133. doi:10.1007/s13225-010-0047-z
- Illegghems, K., De Vuyst, L., Papalexandratou, Z., & Weckx, S. (2012). Phylogenetic analysis of a spontaneous cocoa bean fermentation metagenome reveals new insights into its bacterial and fungal community diversity. *PLoS ONE*, 7(5), e38040. doi:10.1371/journal.pone.0038040

- Jurjevic, Z., Peterson, S., & Horn, B. (2012). *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *IMA Fungus*, 3(1), 27. doi:10.5598/imafungus.2012.03.01.07
- Kongor, J. E., Hinneh, M., De Walle, D. V., Afoakwa, E. O., Boeckx, P., & Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile. *Food Research International*, 82, 44-52. doi:10.1016/j.foodres.2016.01.012
- Lagunes Gálvez, S., Loiseau, G., Paredes, J. L., Barel, M., & Guiraud, J. P. (2007). Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 124-130. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.041
- Li, M., & Yang, Q. (2007). Isolation and characterization of a B-tubulin gene from *Tricoferma harzianum*. *Biochemical Genetics*, 45(7-8), 529-534. doi:10.1007/s10528-007-9094-x
- Liaud, M., & Brinkmann, H. (1992). The B-tubulin gene family of pea: primary structures, genomic organization and intron-dependent evolution of genes. 18, 639-651.
- McKeen, C. D., Reilly, C., & Pusey, P. (1986). Production and Partial Characterization of Antifungal Substances Antagonistic to *Monilinia fruticola* from *Bacillus subtilis*. *Ecology and Epidemiology*, 76, 136-139.
- Mouliya, M. N., Setyabudi, S., Salleh, B., & Rahayu, E. S. (2014). *Penicillium* species isolated from cocoa, coffee beans, and dried cassava in Yogyakarta Indonesia and their ochratoxin production. *Indonesian Food and Nutrition Progress*, 13(1).
- Mounjouenpou, P., Gueule, D., Fontana-Tachon, A., Guyot, B., Tondje, P. R., & Guiraud, J. P. (2008). Filamentous fungi producing ochratoxin a during cocoa processing in

- Cameroon. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 234-241. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.017
- Petyaev, I. M., & Bashmakov, Y. K. (2016). Cocobiota: Implications for Human Health. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 1-3. doi:10.1155/2016/7906927
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage*. Springer US. doi:10.1007/978-0-387-92207-2
- Ramarathnam, R. (2007). *Mechanisms of phyllosphere biological control of leptosphaeria maculons, the blaclileg pathogen of canola, using antagonistic bacteria*. University of Manitoba.
- Ramarathnam, R., Bo, S., Chen, Y., Dilantha, F., Xuenwen, G., & Kievit, T. (2007). Molecular and biochemical detection of fengycin and bacillomycin D producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. 53.
- Romero, D., De Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J. W., Arrebola, E., . . . Pérez-García, A. (2007). The itrurin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podospaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), 430-440. doi:10.1094/MPMI-20-4-0430
- Ruiz, E., Mejía, M., Serrato, A., Reyes, A., Estrada, Y., & Valencia, A. (2016). Antifungal activity and molecular identification of native strains of *Bacillus subtilis*. *Agrociencia*, 50(2), 16.
- Sajitha, K. L., & Dev, S. A. (2016). Quantification of antifungal lipopeptide gene expression levels in *Bacillus subtilis* B1 durin antagonism against sapstain fungus on rubberwood. *Biological control*, 96, 78-85. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.02.007

- Samaniego, G. (2016). *Optimización del proceso de producción de Bacillus subtilis CTPX S2-1 y sus metabolitos, para el control de antracnosis en Lupinus mutabilis SWEET*. Universidad de las Américas, Quito.
- Samson , R. A., Hong, S., Peterson, S. W., Frisvad, J. C., & Varga , J. (2007). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in Mycology*, 59, 147-203. doi:10.3114/sim.2007.59.14
- Samson, R. A., & Pitt, J. I. (1986). *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Springer US. doi:10.1007/978-1-4757-1856-0
- Samson, R. A., & Pitt, J. I. (1990). *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*. Springer US. doi:10.1007/978-1-4899-3579-3
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen , C. H., . . . Frisvad, J. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. 78, 141-173.
- Sánchez , F. (2016). Importance of *Bacillus subtilis* lipopeptides in the biological control of diseases in crops of high economic value. *Bionatura*, 1(3), 4. doi:10.21931/RB/2016.01.03.7
- Sánchez-Hervás, M., Gil, J. V., Bisbal, F., Ramón, D., & Martínez, P. V. (2008). Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 125(3), 336-340. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.021
- Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 205-221. doi:10.1080/10408690490464104
- Schwan, R. F., De Melo Pereira, G., & Fleet, G. (2014). Microbial activities during cocoa fermentation.

- Smith, J. E. (1994). *Aspergillus*. Springer US. doi:10.1007/978-1-4615-2411-3
- Soumya, S., & Bindu, R. (2017). Internal Transcribed Spacer (ITS) sequence analysis of nuclear ribosomal DNA (nrDNA) in *Averrhoa* L. *9*(1), 45353-45359.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, *56*(4), 845-857. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x
- Thimon, L., Peypoux, F., Wallach, J., & Michel, G. (1995). Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. *FEMS Microbiology Letters*, *128*, 101-106.
- Tsuge, K., Ohata, Y., & Shoda, M. (2001). Gene *yerP*, involved in surfactin self-resistance in *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(12), 3566-3573.
- Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U., & Gunther, J. (1986). Fengycin A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *The Journal Antibiotics*, *39*(7), 888-901.
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H., Perrone, G., . . . Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, *78*, 343-371. doi:10.1016/j.simyco.2014.09.001
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Rodríguez, C., Pereira, C., Dijksterhuis, J., Seifert, K. A., . . . Samson, R. A. (2013). Five new *Penicillium* species in section *Sclerotiora*: a tribute to the Dutch Royal Family. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, *31*(1), 42-62. doi:10.3767/003158513X667410
- Wang, X. W., Yang, F. Y., Meijer, M., Kraak, B., Sun, B., Jiang, Y. L., . . . Houbraken, J. (2019). Redefining *Humicola* sensu stricto and related genera in the Chaetomiaceae. *Studies in Mycology*, *93*, 65-153. doi:10.1016/j.simyco.2018.07.001

- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1
- Yáñez-Mendizábal, V., & Falconí, C. E. (2018). Efficacy of *Bacillus* spp. to biocontrol of anthracnose and enhance plant growth on Andean lupin seeds by lipopeptide production. *Biological control*, 122, 67-75. doi:10.1016/j.biocontrol.2018.04.004
- Yáñez-Mendizábal, V., & Falconí, C. E. (2021). *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 induces systemic resistance against anthracnose in Andean lupin by lipopeptide production. *Biotechnology Letters*, 43(3), 719-728. doi:10.1007/s10529-020-03066-x
- Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Cañamás, T., & Teixidó, N. (2012). Endospore production allows using spray-drying as a possible formulation system of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8. *Biotechnology Letters*, 34(4), 729-735. doi:10.1007/s10529-011-0834-y
- Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., Abadías, M., & Teixidó, N. (2012). Formulation development of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* strain CPA-8 by spray-drying: *Bacillus subtilis* CPA-8 Spray-drying formulation. *Journal of Applied Microbiology*, 112(5), 954-965. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05258.x
- Yáñez-Mendizábal, V., Zerriouh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., De Vicente, A., . . . Teixidó, N. (2012). Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology*, 132(4), 609-619. doi:10.1007/s10658-011-9905-0

Zak, O. L., Ostovar, K., & Keeney, P. G. (1972). Implication *Bacillus subtilis* in the synthesis of tetramethylpyrazine during fermentation of cocoa beans. *Journal of Food Science*, 37(6), 967-968. doi:10.1111/j.1365-2621.1972.tb03717.x