



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**Caracterización de comunidades microbianas  
asociadas a cerezas frescas y secas de café de la  
región de Tabasco mediante métodos dependientes e  
independientes del cultivo**

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:  
ELISA KAREN GUTIERREZ RODRIGUEZ

DIRECTORA: DRA. GABRIELA RODRÍGUEZ SERRANO

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con la referencia 001465.

La presente investigación fue realizada gracias a la beca CONACYT recibida, la beca de Movilidad Internacional de la UAM para alumnos de maestría y el financiamiento del Fondo de Cooperación Internacional en Ciencia y Tecnología (FONCICYT 273656).

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Agradezco también a todas las personas que con su apoyo hicieron posible realizar este trabajo.

En primer lugar, a la doctora Gabriela Rodríguez por darme la oportunidad de incorporarme a un proyecto tan interesante e innovador y otorgarme la confianza para desarrollar propuestas del tema de tesis que con su apoyo técnico y consejos pudieron llevarse a término.

Agradezco a mis asesores, el doctor Adelfo Escalante Lozada y el doctor Francisco J. Fernández, que además de sus sugerencias a lo largo del desarrollo del trabajo, como mis profesores de licenciatura y maestría me proporcionaron parte del conocimiento previo necesario para realizar este trabajo.

Agradezco también a la doctora Isabelle Perraud-Gaime, el doctor Noël Durand y el doctor Florentin Constancias que, con su apoyo durante mi estancia en el CIRAD, Montpellier, me permitieron realizar una parte fundamental del proyecto.

Agradezco a mis compañeros de la UAM: Gerardo, Alejandra, Carlos, Ulises, Carmen, Hypatia, Eduardo y Víctor que en el algún momento de la realización de la parte experimental de esta tesis me brindaron su ayuda.

Les agradezco a mis padres por estar a mi lado en cada una de las etapas de mi formación con todo su respaldo y cariño y a Fernando por su ayuda en todo momento.

## Índice

1. Resumen.....	5
2. Abstract.....	7
3. Introducción .....	9
4. Antecedentes .....	12
4.1. El café y su producción .....	12
4.2. Procesamiento del café en México.....	12
4.3. Diversidad microbiana en el café .....	14
4.4. Contaminación del café con micotoxinas.....	17
4.4.1. Ocratoxina A (OTA).....	18
4.5. Caracterización de comunidades microbianas. Métodos dependientes e independientes del cultivo. ....	20
4.5.1. Métodos dependientes del cultivo .....	21
4.5.2. Métodos independientes del cultivo.....	22
4.5.2.1. PCR-DGGE.....	23
4.5.2.2. Secuenciación de alto rendimiento o de próxima generación (NGS) ..	24
5. Justificación .....	28
6. Hipótesis .....	28
7. Objetivos.....	29
8. Metodología .....	30
8.1. Recolección de muestras de café .....	30
8.2 Aislamiento de bacterias y hongos filamentosos (endófitos y epífitos) .....	30
8.3. Purificación y caracterización de los aislados.....	31
8.4. Identificación molecular de bacterias por análisis de secuencias de ADNr 16S .....	32
8.5. Identificación de hongos.....	33
8.5.1. Identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF .....	33
8.5.2. Identificación molecular por análisis de secuencias de la región ITS.....	34
8.6. Evaluación de la producción de ocratoxina A .....	36
8.7 Análisis de las comunidades microbianas por <i>metabarcoding</i> .....	36
9. Resultados y discusión.....	38
9.1. Cuantificación de grupos microbianos.....	38
9.2. Aislamiento y caracterización de bacterias.....	39
9.3. Identificación molecular de bacterias por análisis de secuencias de ADNr 16S .....	40

9.4. Aislamiento y caracterización de hongos filamentosos.....	43
9.5. Identificación de las cepas de hongos filamentosos .....	45
9.5.1. Identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF .....	45
9.5.2 Identificación molecular por análisis de secuencias de la región ITS.....	46
9.6. Evaluación de la producción de ocratoxina A .....	52
9.7. Análisis de las comunidades microbianas por <i>metabarcoding</i> .....	53
9.7.1. Extracción de ADN .....	53
9.7.2. Análisis general de secuencias .....	54
9.7.3.1. Análisis taxonómico.....	55
9.7.3. Análisis de las comunidades bacterianas .....	58
9.7.3.2. Análisis de diversidad alfa ( $\alpha$ ) en cerezas frescas y secas .....	58
9.7.3.2 Análisis de diversidad beta ( $\beta$ ) .....	60
9.7.4. Análisis de las comunidades fúngicas .....	61
9.7.4.1. Análisis taxonómico.....	61
9.7.4.2. Análisis de diversidad alfa ( $\alpha$ ) en cerezas frescas y secas .....	65
9.7.4.3 Análisis de diversidad beta ( $\beta$ ) .....	66
10. Conclusiones .....	68
11. Perspectivas .....	69
12. Referencias .....	70
13. Anexos .....	81

## 1. Resumen

En el procesamiento del café se encuentran presentes un gran número de microorganismos que pueden tener un efecto en la calidad del producto. Los estudios enfocados a identificar las comunidades microbianas, sin embargo, son escasos, y de estos, pocos usan métodos independientes del cultivo. En este trabajo se llevó a cabo, a partir de cerezas frescas y secas de café de Tabasco (municipio Tacotalpa), el aislamiento de bacterias (en condiciones de anaerobiosis) y hongos filamentosos, seguido de su identificación molecular por análisis de secuencias de ADNr 16S y de la región ITS. Entre el grupo de hongos filamentosos se evaluó además la incidencia de los posibles productores de ocratoxina A (OTA) y se determinó la producción de la misma por HPLC. Complementario a ello se empleó la técnica de *metabarcoding* (secuenciación de la región V3-V4 del ADNr 16S y de la región ITS2 en la plataforma Miseq™ de Illumina), como método independiente del cultivo, para realizar un análisis de las comunidades bacterianas y fúngicas presentes. Con el aislamiento de bacterias se observó la abundancia de bacterias Gram-negativas, entre las que se identificó al género *Klebsiella* y la especie *Pantoea agglomerans*. Entre los hongos aislados, por otro lado, se determinó la presencia de diferentes géneros y especies que en algunos casos no fueron detectados por *metabarcoding* y en particular se observó, únicamente en cerezas secas, la contaminación con *Aspergillus niger*, para el que se demostró la producción de OTA (105.03±16.36 µg/kg de medio) por HPLC. Por su parte, con *metabarcoding* se observaron algunas coincidencias como la presencia de *Klebsiella* y *P. agglomerans* entre las bacterias representadas con mayor abundancia, y la contaminación con *A. niger* en cerezas secas. Esta técnica, sin embargo, permitió realizar un análisis más profundo de la diversidad microbiana presente y evidenciar la diferencia en las poblaciones de cerezas frescas y secas. Entre las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) bacterianas, los phyla Proteobacteria y Firmicutes fueron en general los dominantes, con la diferencia de que en cerezas secas los Firmicutes se observaron en una proporción más alta que en frescas por la presencia del género *Weissella*. Entre las OTUs fúngicas, los phyla Ascomycota y Basidiomycota fueron los dominantes, con mayor proporción de Basidiomycota en cerezas frescas que en secas, en las que se observó además una proporción

más alta del género *Aspergillus*. Adicionalmente, en los dos puntos del procesamiento se determinó la abundancia de levaduras y se detectaron también, por otro lado, muchos géneros y especies de bacterias y hongos filamentosos que no se hallaron por aislamiento, con lo que se demostró una vez más la importancia del uso de métodos dependientes e independientes del cultivo en conjunto para realizar una mejor caracterización de las comunidades microbianas en cerezas de café y su procesamiento.

## 2. Abstract

In coffee processing, a large number of microorganisms that can have an effect on the quality of the product are naturally present. Studies focused on shaping microbial communities, however, are scarce, and only a few use culture-independent methods. In this study, the isolation and molecular identification (16S rRNA and ITS region sequence analysis) of bacteria and filamentous fungi, from fresh and dried coffee cherries from Tabasco (Tlacotalpa), was carried out; potential ochratoxin A (OTA) producers' occurrence was evaluated, and the toxin production was determined by HPLC. Complementary to this, the metabarcoding technique (16S rDNA V3–V4 region and ITS2 region sequencing on an Illumina MiSeq™ platform) was employed as a culture-independent method to analyze the cherries bacterial and fungal communities. With the bacteria isolation, the abundance of Gram-negative bacteria was observed, among which, the genus *Klebsiella* and the species *Pantoea agglomerans* were identified. Among the isolated fungi, the presence of different genera and species, that in some cases were not detected by metabarcoding, was determined and in particular, it was observed, only in dried cherries, the contamination with *Aspergillus niger*, for which the OTA production ( $105.03 \pm 16.36 \mu\text{g} / \text{kg}$  of medium) was demonstrated by HPLC. On the other hand, with metabarcoding, some coincidences were observed such as the presence of *Klebsiella* and *P. agglomerans*, among the bacteria represented with greater abundance, and the contamination with *A. niger* in dried cherries. This technique, however, allowed a deeper analysis of the microbial diversity and to evidence the difference in fresh and dried cherries populations. Among the bacterial operational taxonomic units (OTUs), Proteobacteria and Firmicutes were the dominant phyla, with the Firmicutes in a higher proportion in dried cherries than in fresh ones due to the presence of the genus *Weissella*. Among the fungal OTUs, Ascomycota and Basidiomycota were the dominant phyla, with a higher proportion of Basidiomycota in fresh cherries than in dried cherries, in which a higher proportion of the genus *Aspergillus* was also observed. Additionally, yeasts abundance was determined at the two processing points, and many genera and species of bacteria and filamentous fungi that were not found by isolation were detected, demonstrating once again the importance of using culture-dependent and culture-independent methods in

conjunction to perform a better characterization of the microbial communities present in coffee cherries and their processing.

### 3. Introducción

El café es uno de los productos agroindustriales más importantes del comercio internacional y su producción primaria juega un papel fundamental en la economía de muchos países que son dependientes, en gran medida, de la exportación de este producto para su desarrollo económico y social (FAO, 2006).

Los principales productores de café en el mundo son Brasil, Vietnam, Colombia, Indonesia, Honduras, Etiopía, India, Uganda, Perú y Guatemala. México se ubica actualmente en el undécimo lugar y en nuestro país el café es considerado un cultivo estratégico, cuya producción emplea a más de 500,000 personas y participa con 0.7 % del PIB agrícola y 1.3 % de la producción de bienes agroindustriales (FIRA, 2017).

El cultivo de café en México se divide entre las especies *Coffea arabica*, en un 94.5%, y *Coffea canephora* o *Coffea robusta*, en un 5.5% (FIRA, 2017). El procesamiento, por otra parte, se realiza por dos diferentes métodos; el más empleado es el denominado método húmedo que consta del despulpado de las cerezas de café, una etapa de fermentación (en tanques con grandes volúmenes de agua), lavado y secado. El método seco, en cambio, representa la forma tradicional del procesamiento y consiste en secar directamente al sol las cerezas maduras obteniendo con ello el llamado café bola o capulín, el cual es posteriormente descascarado a través de un proceso que recibe el nombre de *morteado* (CEFP, 2001).

En las cerezas de café y a lo largo de su procesamiento, un gran número de microorganismos están naturalmente presentes y es posible que éstos jueguen un papel relevante en la fermentación, en las características sensoriales y/o en la calidad del producto final (Vilela *et al.*, 2010; Evangelista *et al.*, 2015). Los microorganismos presentes, como es el caso de los hongos productores de micotoxinas, además pueden representar un riesgo para la salud del consumidor (García-Moraleja *et al.*, 2015). Se ha visto que los principales géneros toxigénicos (*Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*) pueden encontrarse en toda la cadena de producción (Batista *et al.*, 2003) y las especies que causan mayor preocupación son las productoras de ocratoxina A (OTA), es decir: *Aspergillus*

*ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. westerdijkiae*, *A. niger*, *Penicillium verrucosum* y *P. nordicum* (Paterson *et al.*, 2014).

La OTA es una micotoxina neurotóxica, inmunosupresora, genotóxica, carcinógena y teratogénica (Ravelo *et al.*, 2011), que no puede ser eliminada en su totalidad mediante el tostado del café (Nguyen *et al.*, 2017). Su acumulación en la matriz es influenciada por las actividades de las comunidades microbianas presentes (FAO, 2006) y ciertos microorganismos tienen al parecer la capacidad de inhibir a los hongos que la producen (Masoud *et al.*, 2005; Massawe y Lifa, 2010; Djossou *et al.*, 2011). Lo anterior provee una oportunidad para el biocontrol de la producción de OTA a través de limitar el desarrollo fúngico, lo que involucra conocer la diversidad microbiana del café de acuerdo con la variedad, el método de procesamiento y factores ambientales de la región de cultivo, tales como la humedad y la temperatura (Durand *et al.*, 2013).

Hasta el momento, los estudios orientados a conocer la diversidad microbiana del café son limitados y pocos han hecho uso de métodos moleculares independientes del cultivo (Huch y Franz, 2015; Pereira *et al.*, 2016); la mayor parte de los que se han realizado además, se han centrado en el café de Brasil: Silva *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2008a; Vilela *et al.*, 2010; Evangelista *et al.*, 2015. Debido a ello, existe todavía una gran necesidad de realizar estudios de ecología microbiana que apliquen tales métodos y se enfoquen en café de distintos países productores que llevan a cabo el procesamiento por métodos diferentes, México entre ellos. Lo anterior permitiría, además de ampliar el conocimiento de las comunidades microbianas que se encuentran presentes, contribuir al entendimiento de su interacción y dinámica en el procesamiento por distintos métodos, ayudar a evaluar el riesgo de contaminación con microorganismos que representen una amenaza para la salud del consumidor (tales como los hongos ocratoxigénicos) y, desde un enfoque biotecnológico, proporcionar la información para el desarrollo de cultivos iniciadores de la fermentación o productos de biocontrol que atiendan a diversas necesidades.

En el presente trabajo, por tanto, se pretende caracterizar a las comunidades microbianas asociadas a cerezas frescas y secas (café bola/método seco) de café de Tabasco (municipio Tacotalpa), México, mediante el uso de métodos

dependientes e independientes del cultivo y, como parte de tal caracterización, evaluar la presencia de hongos ocratoxigénicos.

## 4. Antecedentes

### 4.1. El café y su producción

El café es una matriz alimentaria compleja de la cual se obtiene una bebida ampliamente aceptada (Benites *et al.*, 2017) cuyo consumo a nivel mundial se mantiene en constante incremento. Entre los ciclos cafetaleros 2006/07 y 2016/17 el consumo creció a una tasa promedio anual de 2.4 % y en este último ciclo (2016/2017) la Unión Europea ocupó la primera posición entre los principales consumidores, seguida de Estados Unidos y Brasil; mientras que entre los mayores productores, Brasil cubrió un 34.9% del total de producción en millones de sacos de 60 kg (equivalente en café verde), Vietnam 16.6%, Colombia 9.1, Indonesia 6.6%, Honduras 4.6%, Etiopía 4.1%, India 3.2%, Uganda 2.6%, Perú 2.6% y Guatemala 2.2%.

México es actualmente el undécimo productor a nivel mundial, con una participación de 2.1 % del total de producción. En 2016/17 el 90 % de la superficie cosechada en este país se concentró en cinco entidades: Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Puebla y Guerrero (FIRA, 2017). La cantidad de café cereza generada en 2017 por distintos estados cafetaleros se muestra en la Tabla 1.

*Tabla 1. Volumen de producción de café cereza por entidad.*

Estado	Volumen (toneladas café cereza)
Chiapas	339,361.41
Veracruz	194,432.57
Puebla	128,995.35
Oaxaca	66,088.70
Guerrero	41,581.72
Hidalgo	33,890.82
Nayarit	14,053.74
San Luis Potosí	8,694.46
Jalisco	4,505.86
Colima	2,929.47
Tabasco	414.46
México	321.59
Querétaro	67.5
Morelos	42.72

Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), 2017.

### 4.2. Procesamiento del café en México

En México, un ciclo cafetalero comprende el periodo de tiempo de octubre de un año a septiembre del año siguiente y la cosecha de café se realiza principalmente

de noviembre a marzo. La recolección de cerezas de café (fruto del cafeto) es de manera manual y, una vez cortadas, son sometidas a un proceso de transformación primaria o beneficio por el método húmedo o seco. El método húmedo incluye la obtención de *café pergamino*, a partir del cual se genera el *café lavado* o *suave*, y el método seco (o método natural) la obtención del *café bola* o *capulín*, que da lugar al *café natural* (Figueroa-Hernández *et al.*, 2015). A continuación, se describirá cada método de manera detallada.

#### a) Método seco o método natural

El método seco consiste en secar la cereza entera. Primero las cerezas recolectadas se clasifican y limpian; en esta etapa se separan las cerezas que no están maduras o que están demasiado maduras o dañadas y se quita la suciedad, la tierra, las ramas y las hojas. Las cerezas de café después se extienden al sol en patios grandes de cemento o ladrillo o bien en esteras alzadas hasta la altura de la cintura sobre caballetes. El proceso de secado de las cerezas puede tardar hasta cuatro semanas, hasta alcanzar un contenido máximo de humedad del 12,5%, dependiendo de las condiciones atmosféricas. En los cafetales más grandes, se hace a veces a máquina para acelerar el proceso después de que se haya secado al sol durante unos cuantos días.

Las cerezas secas, denominadas también como *café bola* o *capulín*, se almacenan a granel en silos especiales hasta que se envían al molino, donde se eliminan las capas exteriores de la cereza, y los granos se criban, separan, clasifican y se meten en sacos. Posteriormente, mediante el “morteado” o descascarado, se eliminan todas las capas exteriores del grano y se obtiene el denominado *café natural*.

#### b) Método húmedo

El método húmedo, al igual que el método seco, involucra una separación y limpieza preliminar de las cerezas; tras la cual, se elimina la pulpa de la cereza. Esa operación es la principal diferencia entre los dos métodos, dado que en el método por vía húmeda la pulpa del fruto se separa del grano antes de ponerlo a fermentar y secar. El despulpe lo hace una máquina que aprieta las cerezas entre planchas fijas y móviles y los granos despulpados pasan a cribas vibradoras que los separan de las cerezas que hayan quedado sin despulpar o

que lo hayan sido de forma imperfecta, así como de los pedazos grandes de pulpa que puedan haber pasado con ellas. Después de la criba, los granos separados se pasan por canales en los que se lavan con agua y posteriormente se colocan en grandes tanques de fermentación en los que las sustancias mucilaginosas se descomponen bajo la influencia de enzimas naturales. Para la mayor parte de los cafés, la eliminación de las sustancias mucilaginosas lleva entre 24 y 36 horas, dependiendo de la temperatura, el grosor de la capa mucilaginosa y la concentración de las enzimas. Cuando termina la fermentación, se lava el café a fondo con agua limpia en tanques o en lavadoras especiales. El café lavado tiene en esta etapa un 57 % de humedad aproximadamente y para hacer que la humedad disminuya hasta el nivel máximo del 12,5 % se seca al sol o en una secadora mecánica o bien, combinando los dos métodos.

Después del secado, el café beneficiado por método húmedo, o *café pergamino* como se le llama habitualmente, se almacena y se conserva. En las etapas finales de la preparación, el café se descascara para quitarle el pergamino y después se pasa por varias operaciones de limpieza, cribado, separación y clasificación para la obtención del *café lavado* o *suave* (ICO-International Coffee Organization, s.f.).

En México, aunque el método seco representa la forma tradicional de procesamiento de café cereza y es el más antiguo y simple, cerca del 90% de la producción se beneficia a través del método húmedo (Figuroa-Hernández *et al.*, 2015).

#### **4.3. Diversidad microbiana en el café**

En el café existe una comunidad microbiana compleja y diversa conformada por los microorganismos naturalmente presentes en las cerezas y a lo largo del procesamiento, que se desarrollan aprovechando los nutrientes de la pulpa y el mucilago (Evangelista *et al.*, 2015). La diversidad microbiana va a depender de la variedad del café, el método de procesamiento y factores ambientales de la región de cultivo tales como la humedad, la temperatura y las poblaciones del suelo (Batista *et al.*, 2009).

Con la finalidad de conocer los microorganismos presentes en cerezas frescas de café y a lo largo de su procesamiento, se han realizado estudios de ecología microbiana en cafés de distintos tipos y orígenes, enfocados al estudio de los grupos microbianos en diferentes etapas y tipos de procesamiento. En la Tabla 2 se sintetizan algunos de los más recientes.

Tabla 2. Estudios de ecología microbiana del café.

Referencia	Grupos microbianos	Método	Tipo de procesamiento/ etapas	Tipo de café.	Región de origen
<b>Silva et al. (2000)</b>	Bacterias, hongos filamentosos y levaduras	Aislamiento e identificación mediante pruebas bioquímicas y características morfológicas	Método seco/ Cerezas frescas y a mitad del secado	<i>Coffea arabica</i>	Brasil
<b>Avallone et al. (2001)</b>	Bacterias y levaduras	Aislamiento e identificación bioquímica con sistemas API® (BioMérieux)	Método húmedo/ Cerezas frescas y granos despulpados en diferentes etapas de fermentación	<i>Coffea arabica</i>	México
<b>Masoud et al. (2004)</b>	Levaduras	Aislamiento e identificación molecular mediante el análisis de secuencias de la región ITS y del dominio D1/D2 del gen ADNr 26S. PCR-DGGE (amplificación del dominio D1/D2 del gen ADNr 26S)	Método húmedo/ Cerezas frescas, pulpa, granos despulpados en diferentes etapas de fermentación y secado	<i>Coffea arabica</i>	Tanzania
<b>Silva et al. (2008a)</b>	Bacterias, hongos filamentosos y levaduras	Aislamiento e identificación mediante pruebas bioquímicas y características morfológicas	Método seco/ Cerezas frescas y en diferentes puntos del secado y almacenamiento	<i>Coffea arabica</i>	Brasil
<b>Vilela et al. (2010)</b>	Bacterias, hongos filamentosos y levaduras	Aislamiento e identificación fenotípica y molecular mediante el análisis de secuencias: regiones ITS y 16-23S del ADNr. PCR-DGGE (amplificación del ADNr 16S y 18S)	Método semi-seco/ Cerezas frescas, pulpa, piel y granos despulpados en diferentes etapas de la fermentación	<i>Coffea arabica</i>	Brasil
<b>Evangelista et al. (2015)</b>	Bacterias y levaduras	Aislamiento e identificación molecular mediante el análisis de secuencias del ADNr 16S y la región ITS. PCR-DGGE (amplificación del ADNr 16S y un fragmento de la región D1 del ADNr 26S)	Método húmedo/ Cerezas frescas y granos a diferentes tiempos durante el secado y la fermentación	<i>Coffea arabica</i>	Brasil
<b>Nasanit y Satyawut (2015)</b>	Bacterias, hongos filamentosos y levaduras	Aislamiento e identificación mediante pruebas bioquímicas y características morfológicas	Método húmedo/ Cerezas frescas y granos despulpados en diferentes etapas de fermentación	<i>Coffea arabica</i>	Tailandia
<b>De Bruyn et al. (2017)</b>	Bacterias y levaduras	Secuenciación de Segunda Generación (NGS)	Método húmedo y seco/ Cerezas frescas y a lo largo del procesamiento	<i>Coffea arabica</i>	Ecuador

Gracias a estos estudios se tiene actualmente una idea más clara de los microorganismos naturalmente presentes en el café y, a pesar de existir diferencias generadas por factores tales como la región del cultivo y las condiciones del procesamiento, existen especies comúnmente encontradas entre las comunidades bacterianas y fúngicas (Tabla 3).

Tabla 3. Especies microbianas comúnmente encontradas en café.

Bacterias	Levaduras	Hongos filamentosos
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Arxula adenivorans</i>	<i>Aspergillus foetidus</i>
<i>B. megaterium</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>A. niger</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>C. membranifaciens</i>	<i>A. ochraceus</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>C. quercitrusa</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>cladosporioides</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Fusarium lateritium</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>F. solani</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Pichia anomala</i>	<i>P. citrinum</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>P. burtonii</i>	<i>P. crustosum</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>P. caribbica</i>	<i>P. implicatum</i>
<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>P. fermentans</i>	<i>P. roqueforti</i>
<i>L. mesenteroides</i>	<i>P. guilliermondii</i>	
<i>L. pseudomesenteroides</i>	<i>P. kluyveri</i>	
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>P. sydowiorium</i>	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	
<i>S. plymuthica</i>		
<i>Tatumella ptyseos</i>		
<i>Weissella confusa</i>		

Fuente: Compilado de Silva *et al.* (2000), Avallone *et al.* (2001), Masoud *et al.* (2004), Silva *et al.* (2008a), Vilela *et al.* (2010), Leong *et al.* (2014), Pereira *et al.* (2014), Evangelista *et al.* (2015), Nasanit y Satayawut (2015), De Bruyn *et al.* (2017).

En los estudios realizados hasta el momento se han identificado ciertos microorganismos como dominantes en el procesamiento. Entre ellos, se ha determinado la abundancia de bacterias de la familia Enterobacteriaceae, incluyendo los géneros *Enterobacter* (Evangelista *et al.*, 2015; Nasanit y Satayawut, 2015) y *Erwinia* (Avallone *et al.*, 2001; Evangelista *et al.*, 2015) y las especies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pantoea agglomerans* (Vilela *et al.*, 2010; Nasanit y Satayawut, 2015); entre las bacterias Gram-positivas al género *Bacillus* (Silva *et al.*, 2008a; Vilela *et al.*, 2010) y a *Leuconostoc mesenteroides* (Avallone *et al.*, 2001; Evangelista *et al.*, 2015; Nasanit y Satayawut, 2015). Las levaduras que se presentan en abundancia incluyen a *Hanseniaspora uvarum* (Masoud *et al.*, 2004; Evangelista *et al.*, 2015) y los

géneros *Debaryomyces*, *Candida* (Silva *et al.*, 2008a; Nasanit y Satayawut, 2015), *Saccharomyces* (Pereira *et al.*, 2014; Evangelista *et al.*, 2015) y *Pichia* con las especies *P. anomala* (Masoud *et al.*, 2004; Vilela *et al.*, 2010), *P. caribbica* (Pereira *et al.*, 2014; Evangelista *et al.*, 2015) y *P. kluyveri* (Masoud *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2014). Los hongos filamentosos pertenecen a los géneros *Aspergillus* (Silva *et al.*, 2008a; Vilela *et al.*, 2010) y *Penicillium* (Silva *et al.*, 2008a; Nasanit y Satayawut, 2015).

#### **4.4. Contaminación del café con micotoxinas**

La contaminación con hongos es uno de los mayores problemas en el procesamiento del café, cuya importancia es en parte debida al riesgo que representa para la salud del consumidor la producción de micotoxinas por algunos géneros y las pérdidas económicas que esto ocasiona (Paterson *et al.*, 2014; Geremew *et al.*, 2016).

Las micotoxinas son compuestos que pueden causar afectaciones, enfermedad o muerte en humanos y/o animales cuando son ingeridas, inhaladas o absorbidas (Paterson *et al.*, 2014). En el café las de mayor incidencia son las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, la OTA, la patulina y la esterigmatocistina, pero se pueden encontrar también los tricotecenos nivalenol, deoxinivalenol, toxinas T-2 y HT-2 y diacetoxyscirpenol, además de las fumonisinas B1 y B2 y las toxinas emergentes eniانتinas y beauvericina (García-Moraleja *et al.*, 2015; Geremew *et al.*, 2016).

Las aflatoxinas, producidas mayoritariamente por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* (Geremew *et al.*, 2016) son hepatotóxicas, inmunosupresoras, mutagénicas, teratogénicas y carcinogénicas (Coppock y Christian, 2007); siendo la B1, dentro de las principales (B1, B2, G1 y G2), la más tóxica (Geremew *et al.*, 2016). La patulina es una micotoxina genotóxica (De Ruyck *et al.*, 2015) que es producida por especies de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Byssochlamys*, con *Penicillium expansum* como su mayor productora. La esterigmatocistina es un potente carcinógeno hepático y es producida principalmente por *Aspergillus nidulans* y *A. versicolor* (Brera *et al.*, 2008). Los tricotecenos son moléculas que causan la inhibición de la síntesis proteica (García-Moraleja *et al.*, 2015) y son producidos por especies de los géneros

*Fusarium* (en particular *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae* y *Fusarium sporotrichioides*), *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Trichothecium* y *Verticimonosporium* (Brera *et al.*, 2008). Las fumonisinas B1 y B2 son hepatotóxicas e inmunotóxicas (García-Moraleja *et al.*, 2015) y las producen, principalmente, *Fusarium verticillioides* y *F. proliferatum* (Brera *et al.*, 2008). Por último, para las eniانتinas y beauvericina se ha observado efecto tóxico sobre líneas celulares (García-Moraleja *et al.*, 2015) y su producción se lleva a cabo por una gran variedad de especies de los hongos *Fusarium*, incluyendo a *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. sambucinum* y *F. tricinctum* (Fraeyman *et al.*, 2018).

#### **4.4.1. Ocratoxina A (OTA)**

La OTA es una micotoxina nefrotóxica, hepatotóxica, genotóxica, inmunosupresora y carcinogénica. Es la principal micotoxina del café (Geremew *et al.*, 2016) y su producción en éste, como metabolito secundario, es llevada a cabo por los hongos *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. westerdijkiae*, *A. niger* y en menor medida, *Penicillium verrucosum* y *P. nordicum* (Paterson *et al.*, 2014).

Esta micotoxina, que anteriormente se consideraba degradable durante el proceso de tostado del café, puede encontrarse como contaminante en el producto de consumo, pues si bien su disminución durante la etapa mencionada es posible, no así su completa eliminación (Nguyen *et al.*, 2017). En 2006, la legislación de la Unión Europea estableció una concentración máxima permisible de 5 µg/kg para café tostado, molido o en grano, y de 10 µg/kg para café soluble (Paterson *et al.*, 2014). Actualmente, debido al nivel global de consumo, el café aporta aproximadamente el 12 % de la ingesta total de OTA, por lo que se considera la tercera fuente de exposición a ésta (Benites *et al.*, 2017).

En cuanto a la contaminación, se ha reportado que puede ocurrir en diferentes etapas de la cadena de producción (Paterson *et al.*, 2014; Benites *et al.*, 2017) y en los dos tipos de procesamiento, es decir, por método húmedo o seco (Paterson *et al.*, 2014). Se ha observado, sin embargo, que la etapa de secado, especialmente en un ambiente húmedo, y el procesamiento por método seco representan un riesgo de contaminación mayor (Huch y Franz, 2015).

Los hongos productores de OTA requieren de condiciones favorables para su desarrollo y producción de la toxina; para ello el nivel de agua disponible y la temperatura adecuada son los factores más relevantes. Se ha determinado que la actividad de agua (*aw*) óptima para la producción de OTA por diferentes hongos se encuentra en un rango de 0.95-0.99 (Amézqueta *et al.*, 2012). Con una *aw* de 0.8 pueden estar presentes, pero no producir la toxina y por debajo de 0.78-0.76 no pueden desarrollarse. Con respecto a la temperatura, *A. ochraceus* crece de forma óptima a 30 °C y produce la micotoxina en un rango de 25-30 °C, *A. carbonarius* crece de 25-30 °C y produce una cantidad mayor de la micotoxina a 30 °C y *P. verrucosum*, en cambio, crece de forma óptima a 26 °C y produce la toxina a 25 °C.

El control de las condiciones de temperatura y actividad acuosa ofrece entonces una alternativa para evitar la producción de la micotoxina; hasta ahora se ha establecido que un 12.5% de humedad es considerado el nivel máximo de agua para lograrlo. Además de esta alternativa, otras acciones para evitar la contaminación del producto final incluyen el uso de materia prima de buena calidad y aplicar buenas prácticas de manufactura para llevar a cabo de manera adecuada determinados pasos del procesamiento como el tostado del grano y el descascarado en método seco, que es fundamental debido a que la toxina se localiza predominantemente en las capas que recubren al grano (Paterson *et al.*, 2014). Por otro lado, se sabe que para la producción de la toxina se necesita la presencia de la biomasa fúngica en cantidades significativas y es por ello que, como otra opción de control, se ha propuesto inhibir el desarrollo de estos microorganismos, lo cual es al parecer más fácil y económico que la degradación de la OTA una vez presente en el producto (Djossou *et al.*, 2011). Una opción para ello es el biocontrol, el cual constituye una alternativa más amigable que los métodos que involucran el uso de químicos, que pueden ser dañinos para el ser humano, los animales y el ambiente, y que llegan a emplearse para la prevención y control del desarrollo de hongos micotoxigénicos en diversos granos (Nguyen *et al.*, 2017).

Algunos de los estudios que se han realizado con motivos de biocontrol de los hongos productores de OTA en el café se describen en los párrafos siguientes.

Masoud *et al.* (2005) estudiaron el efecto de los compuestos volátiles producidos por *Pichia anomala*, *P. kluyveri* y *Hanseniaspora uvarum* sobre el crecimiento y producción de OTA por *A. ochraceus*. Sus resultados demostraron que los compuestos generados por las tres cepas, en mayor medida los del género *Pichia*, lograron inhibir el crecimiento del hongo y la producción de la micotoxina como consecuencia probable de su efecto sobre el desarrollo del hongo.

Massawe y Lifa (2010) usaron una combinación de seis cepas de levaduras, tres de la especie *Pichia anomala* y tres de *P. kluyveri*, en combinación con seis bacterias ácido lácticas (BAL) de los géneros *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus* y *Enterococcus*, para inhibir el desarrollo de dos cepas de *A. ochraceus* productoras de OTA en el proceso de fermentación del café. Sus resultados mostraron que, al evitar el crecimiento de los hongos después de los periodos de fermentación y secado, esa combinación de microorganismos podría ser usada como agente de biocontrol.

Por último, Djossou *et al.* (2011) aislaron cepas de BAL a partir del ensilado de cerezas frescas de café que fueron utilizadas para llevar a cabo ensayos de actividad antifúngica contra dos cepas de *A. carbonarius* productoras de OTA. De estos ensayos encontraron diez aislados, identificados como *Lactobacillus plantarum*, con efecto antifúngico.

#### **4.5. Caracterización de comunidades microbianas. Métodos dependientes e independientes del cultivo.**

Las comunidades microbianas de un ambiente pueden caracterizarse por dos diferentes acercamientos: mediante métodos dependientes o independientes del cultivo. Los métodos dependientes del cultivo son aquellos que como indica el nombre, se basan en el cultivo de microorganismos en medios microbiológicos específicos; los independientes del cultivo en cambio se basan en la extracción directa de ácidos nucleicos, ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) total, a partir de una matriz y su posterior análisis sin que se involucre cultivo alguno (Dolci *et al.*, 2015; Ghosh y Bhadury, 2019).

En los estudios que se han realizado para identificar las comunidades microbianas asociadas a cerezas de café y su procesamiento, se han aplicado mayoritariamente métodos dependientes del cultivo, son pocos los trabajos que

han utilizado métodos independientes del cultivo (Hamdouche *et al.*, 2016; De Bruyn *et al.*, 2017; Neto *et al.*, 2018) o una mezcla de ambos (Masoud *et al.*, 2004; Vilela *et al.*, 2010; Evangelista *et al.*, 2015), a pesar de que se ha observado en múltiples ocasiones y para distintas matrices que el uso de estos métodos en conjunto permite realizar un mejor análisis de la diversidad microbiana (Evangelista *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2018; Kraková *et al.*, 2018).

#### **4.5.1. Métodos dependientes del cultivo**

En matrices alimentarias, el empleo de métodos dependientes del cultivo para la evaluación de la diversidad microbiana presenta ciertas desventajas. Por un lado, existen microorganismos que son difíciles de cultivar con los medios conocidos o que podrían no ser cultivables *in vitro*. Algunas especies, además, podrían ser enmascaradas por microorganismos presentes en mayor abundancia. Por otro lado, las condiciones adversas en el ecosistema alimentario, como el agotamiento de nutrientes y los cambios de pH, podrían inducir a las células microbianas a un estado de estrés que pudiese impedir la producción de colonias en el medio de cultivo, incluso cuando aún tuvieran actividad metabólica; tal estado es conocido como viable pero no cultivable e imposibilita la detección de los microorganismos por este método.

A pesar de tales desventajas, los métodos dependientes de cultivo en la actualidad siguen siendo de gran importancia, sobre todo para la industria. La búsqueda y selección de cepas con determinadas características deseables como la capacidad de competencia contra otros microorganismos o ciertas propiedades metabólicas se inicia con la caracterización e identificación de aislados. Para esto último, se han desarrollado diversos métodos basados en biología molecular y una poderosa herramienta con alto poder discriminatorio consiste en la secuenciación de determinados fragmentos de ADN, seguida de su comparación, utilizando bases de datos en línea, con secuencias de ADN de microorganismos conocidos (Dolci *et al.*, 2015). Estos fragmentos se denominan marcadores genéticos y deben tener ciertas características: su presencia debe ser ubicua dentro de un grupo, con regiones altamente conservadas que faciliten el diseño de oligonucleótidos o *primers* (secuencias cortas de ácidos nucleicos que proporcionan un punto de inicio para la síntesis de ADN) para su

amplificación, pero también con suficiente variabilidad o polimorfismo para permitir la diferenciación entre individuos (Bohle y Gabaldón, 2012; Liu *et al.*, 2012). Para la identificación bacteriana, el ADNr 16S es el gen más utilizado; su secuencia comprende alrededor de 1.5 kb y está compuesta de regiones conservadas y variables (Liu *et al.*, 2012), su organización se presenta en la Figura 1.

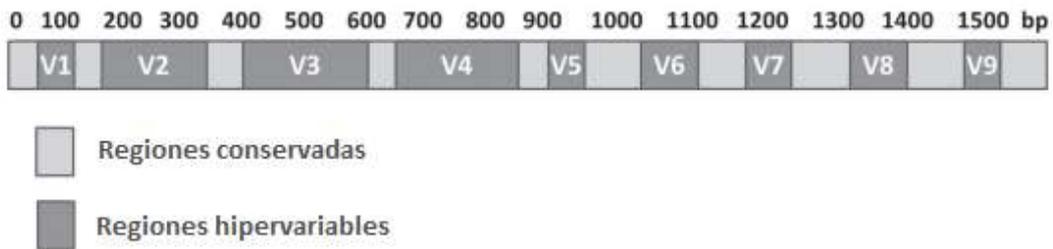


Figura 1. Regiones hipervariables y conservadas del ADNr 16S.

Modificada de: McAllister *et al.*, 2018.

En eucariontes, los genes ARNr se encuentran organizados de tal forma que el ARNr 18S o SSU (subunidad pequeña) y el ARNr 26S/28S o LSU (subunidad larga) están separados por una región conocida como ITS (espaciador interno transcrito) que comprende dos secciones, la ITS1 e ITS2, que flanquean a la región conservada 5.8S (Figura 2). Con motivos de identificación, se ha usado el 18S, el 26S y la región ITS (McAllister *et al.*, 2018); sin embargo, esta última es considerada actualmente el marcador oficial para la identificación de hongos (Porrás-Alfaro *et al.*, 2014).

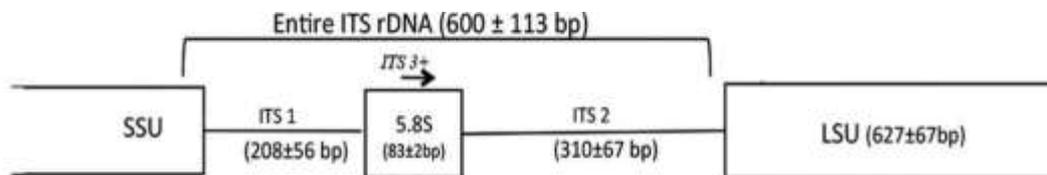


Figura 2. Organización de genes ADNr en eucariontes.

Modificada de: Porrás-Alfaro *et al.*, 2014.

#### 4.5.2. Métodos independientes del cultivo

El desarrollo de métodos independientes del cultivo para estudios microbiológicos ha revolucionado la ecología microbiana. El análisis directo de ADN permite, al ser una molécula estable, investigar la presencia de los microorganismos sin distinción entre viables y células muertas, de esta forma es

posible conocer la “historia” de la muestra con todas las especies que estuvieron presentes o hacer una descripción de la dinámica de poblaciones en un proceso de producción de un alimento. En estos métodos, sin embargo, existen también ciertas desventajas, como que el ADN pudiera no ser recuperado para todos los genotipos al no ser detectado debido a la baja abundancia de algunas especies, una insuficiente homogenización de la matriz o una lisis inadecuada de las células que evitara la liberación de los ácidos nucleicos. Por esta razón, es importante la adaptación de los protocolos de extracción de ácidos nucleicos para los tipos de microorganismos y matrices en estudio.

En la actualidad, diferentes técnicas para el estudio de poblaciones microbianas en matrices alimentarias han sido adaptadas y optimizadas; éstas se dividen principalmente entre los métodos basados en el estudio del ADN microbiano, previamente amplificado por PCR (reacción en cadena de la polimerasa), y los métodos basados en la detección del ADN microbiano directamente de las muestras, lo que permite conocer la localización y distribución de las poblaciones en la matriz (Dolci *et al.*, 2015).

#### **4.5.2.1. PCR-DGGE**

La técnica conocida como PCR-DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturizante) es quizá, dentro de los métodos independientes del cultivo, la más usada para perfilar comunidades microbianas (Ercolini, 2004) y en la mayoría de los estudios realizados hasta el momento para conocer la diversidad de microorganismos asociados al café y su procesamiento se ha usado esta técnica (Masoud *et al.*, 2004; Vilela *et al.*, 2010; Evangelista *et al.*, 2015; Hamdouche *et al.*, 2016).

Se basa en la separación de amplicones del mismo tamaño y diferente secuencia. Los amplicones son producidos por PCR y para su separación se usa un gradiente lineal creciente de agentes químicos desnaturizantes (urea y formamida) que se incorpora a lo largo de un gel de poliacrilamida. Durante la electroforesis se mantiene una temperatura constante de 50-65 °C y los fragmentos de ADN son separados debido a sus diferentes perfiles de desnaturización (fusión). Los fragmentos de doble cadena migran por el gel hasta encontrar una determinada concentración de agentes desnaturizantes a

la cual las cadenas se separan parcialmente en ciertas regiones o dominios. Los fragmentos con diferente secuencia tienen dominios con valores de temperaturas de fusión ( $T_m$ ) distintos, por lo que su desplazamiento por el gel hasta una concentración de agentes a la que se alcance la  $T_m$  de algún dominio será diferente. Una vez alcanzada, la desnaturalización parcial reduce la movilidad y los fragmentos quedan finalmente detenidos en distintas posiciones (Ercolini, 2004).

La técnica permite obtener una visión amplia de las comunidades presentes en una muestra y puede representar claramente la dinámica y evolución de poblaciones microbianas; sin embargo, su uso posee también ciertas desventajas (Dolci *et al.*, 2015). Entre ellas, que no siempre es posible separar los amplicones, es decir, puede haber co-migración de bandas cuando la diferencia entre los fragmentos es pequeña o cuando, a pesar de ser diferentes, tienen un comportamiento de fusión idéntico; esto complica la obtención de secuencias limpias a partir de bandas individuales. Otro de los problemas que pudiera presentarse consiste en la existencia de copias múltiples de los genes analizados, con microheterogeneidad en la secuencia: en tal caso una especie única pudiera presentar un perfil con múltiples bandas en DGGE y conducir a la sobrestimación de la diversidad de una comunidad (Ercolini, 2004). Adicionalmente, con este método no es posible determinar la abundancia relativa de especies dominantes y su aplicación requiere de mucho tiempo, por lo que es inadecuado cuando es necesario realizar un análisis a gran escala (Dolci *et al.*, 2015).

#### **4.5.2.2. Secuenciación de alto rendimiento o de próxima generación (NGS)**

Recientemente, la secuenciación de alto rendimiento o de próxima generación (NGS) se ha convertido en el acercamiento más prometedor para estudiar la diversidad microbiana (Liu *et al.*, 2017).

El primer sistema de NGS, pirosecuenciación, surgió a finales del siglo pasado y fue desarrollado a inicios del siglo XXI con la tecnología de secuenciación 454 por la compañía 454 Life Sciences, perteneciente actualmente a Roche (Cardinali *et al.*, 2017). Desde entonces, muchas otras tecnologías de NGS han

surgido, incluyendo la secuenciación por síntesis (SBS) usada por Solexa/illumina (Vincent *et al.*, 2017).

La secuenciación de próxima generación (NGS) está basada en el concepto de secuenciación masiva de forma paralela y produce un gran número de lecturas relativamente pequeñas; cada lectura reporta la composición nucleotídica original de fragmentos individuales de ADN elucidada mediante el uso de detectores de alta resolución.

Los métodos de NGS se pueden usar normalmente para secuenciar genomas completos o grandes cantidades de amplicones generados por PCR. En microbiología de alimentos, que tiene interés en definir la biodiversidad asociada a diferentes tipos de alimentos y bebidas, se tiende a emplear el acercamiento basado en amplicones. Éste es enfocado a marcadores genéticos, generalmente el ADNr 16S (bacterias) y la región ITS (hongos) para su uso como códigos de barras (Cardinali *et al.*, 2017), es decir, secuencias cortas de ADN para realizar una rápida identificación de especies (Kress y Erickson, 2008). Cuando se usa el acercamiento anterior el proceso se conoce con el nombre de *metabarcoding* (Ghosh y Bhadury, 2019).

Con el surgimiento de tecnologías emergentes de NGS y mejoras de las plataformas existentes (Vincent *et al.*, 2017), además de la disminución en el costo, se ha promovido el uso de este método para estudiar la diversidad de comunidades microbianas en diferentes ambientes. Actualmente la tecnología más usada con tal propósito es la secuenciación de Illumina en las plataformas HiSeq™ o MiSeq™, que tiene la ventaja sobre pirosecuenciación de poder generar una lectura *forward* R1 y una lectura *reverse* R2 (secuenciación *paired-end* o de lecturas pareadas) que pueden ser unidas para formar una secuencia más larga, lo que esencialmente otorga mejor resolución en la identificación de comunidades (Ghosh y Bhadury, 2019).

A continuación, se describen a grandes rasgos los pasos que incluye el proceso de NGS con la tecnología de Illumina, enfocado a la secuenciación de amplicones (Figura 3):

- 1) Preparación de la librería: La preparación de la librería para secuenciación de amplicones de ADNr 16S u otras regiones de estudio involucra una PCR

que se lleva a cabo en dos etapas. En la primera reacción, la región de ADN es amplificada usando oligonucleótidos (*primers*) específicos flanqueados de fragmentos sobresalientes que permitirán en la segunda etapa de PCR, con un número limitado de ciclos, agregar índices para el *multiplex* (secuenciación simultánea de varias librerías en una sola corrida) y adaptadores para la secuenciación en la plataforma de Illumina (Illumina, 2013; Cruaud *et al.*, 2017).

- 2) Generación de clústeres: Las librerías son cargadas en “celdas de flujo” donde los fragmentos, previamente desnaturalizados, son capturados en una superficie con oligonucleótidos forward y reverse unidos, complementarios a las secuencias adaptadoras introducidas en la preparación de la librería. Cada fragmento es amplificado en un clúster distinto para lo cual, como primer paso, se generan con una polimerasa copias de los fragmentos unidos a la celda; posteriormente, los moldes originales se eliminan y las copias son usadas para llevar a cabo la amplificación mediante el método conocido como amplificación en puente o PCR de puente. En este proceso se da la hibridación de los extremos 3' a los oligos complementarios en la celda, formando una estructura de puente, la polimerasa sintetiza la hebra complementaria y se genera entonces un puente de doble hebra que es posteriormente desnaturalizado, con lo que se obtienen dos copias de hebra sencilla unidas a la celda; el proceso se repite una y otra vez y ocurre simultáneamente para muchos clústeres, lo que resulta en una amplificación clonal de los fragmentos. Después de la amplificación, se eliminan las hebras *reverse* y las hebras *forward*, con los extremos 3' bloqueados, son las que se usan inicialmente para la secuenciación.
- 3) Secuenciación. Se realiza mediante la tecnología SBS, que utiliza un método basado en terminadores reversibles para detectar bases únicas conforme se incorporan a la cadena molde de ADN. En cada ciclo de secuenciación se agregan cuatro terminadores reversibles marcados cada uno con un colorante fluorescente diferente y por competencia natural solo uno es incorporado; su identidad se determina por excitación con una fuente de luz que ocasiona la emisión de fluorescencia característica, ésta se registra y posteriormente los terminadores son eliminados para permitir la

incorporación de la siguiente base. El proceso anterior resulta en una secuenciación base por base (Illumina, 2015; Illumina 2016).

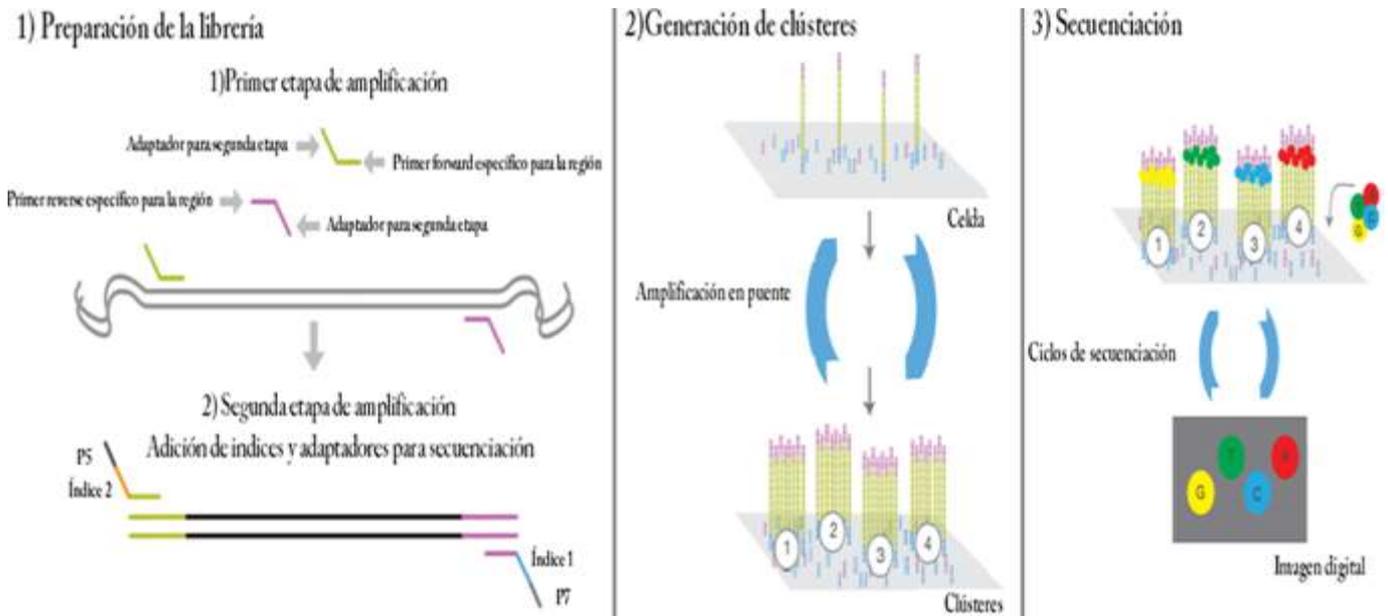


Figura 3. Pasos del proceso de NGS enfocado a la secuenciación de amplicones con la tecnología de Illumina. Modificada de: Illumina (2013), Illumina (2015).

## **5. Justificación**

La caracterización de comunidades microbianas en cerezas de café contribuye a incrementar el conocimiento de las poblaciones que se encuentran naturalmente presentes, lo cual es importante dada la poca información existente en este aspecto y el papel fundamental que posiblemente juegan en el procesamiento y calidad del producto final. Esta investigación, además, atiende a la necesidad de indagar en la existencia, en café mexicano, de microorganismos que pudieran representar un riesgo para la salud de los consumidores, haciendo énfasis en los hongos productores de OTA (dado el problema observado a nivel mundial por la presencia de esta micotoxina neurotóxica, inmunosupresora, genotóxica, carcinógena y teratogénica).

Por otra parte, el estudio de las poblaciones microbianas proporciona la información base sobre los microorganismos que pudieran ser usados en respuesta a diversas necesidades, tales como la selección de cultivos iniciadores para su uso en la fermentación del café o encontrar competidores para el biocontrol de hongos ocratoxigénicos

## **6. Hipótesis**

Considerando que el uso de métodos dependientes e independientes del cultivo en conjunto permite realizar una mejor caracterización de la diversidad microbiana en una matriz, será posible en este trabajo obtener una visión global de los microorganismos presentes en las cerezas frescas y secas de café y determinar si existe contaminación con hongos productores de toxinas o microorganismos competidores de estos.

## **7. Objetivos**

### **Objetivo general**

Caracterizar las comunidades microbianas asociadas a cerezas de café (*Coffea arabica*) frescas y secas, procedentes del procesamiento por método seco, del municipio de Tacotalpa en Tabasco, México.

### **Objetivos particulares**

Realizar el aislamiento de bacterias y hongos filamentosos a partir de muestras de cerezas frescas y secas recolectadas en una finca cafetalera del municipio de Tacotalpa, Tabasco.

Identificar los aislados y determinar el potencial de producción de ocratoxina A de los hongos filamentosos.

Aplicar la técnica de *metabarcoding*, como método independiente del cultivo, para identificar y comparar las poblaciones microbianas presentes en las cerezas frescas y secas.

## **8. Metodología**

### **8.1. Recolección de muestras de café**

La recolección de muestras de café de la variedad *C. arabica* fue llevada a cabo en la localidad de Buenavista, Tacotalpa, en Tabasco. Se recolectaron, en una finca cafetalera perteneciente a un mismo productor, muestras de cerezas frescas (óptimo estado de maduración) a partir de cafetales y muestras de cerezas secas que habían sido sometidas a un proceso de secado al sol como parte del procesamiento por método natural. Éstas fueron transportadas al laboratorio en bolsas estériles dentro de cajas térmicas para su análisis inmediato.

### **8.2 Aislamiento de bacterias y hongos filamentosos (endófitos y epífitos)**

El aislamiento de bacterias y hongos filamentosos se llevó a cabo de forma inmediata a la llegada de las muestras al laboratorio, con la finalidad de evitar cambios en las poblaciones de estos microorganismos con el transcurso del tiempo.

Como primera etapa, para el aislamiento de bacterias, se pesaron en condiciones estériles 10 g de las cerezas en un matraz con 90 mL de agua peptonada estéril. La muestra fue homogeneizada y de esta primera dilución (1:10), se procedió a continuar con diluciones decimales seriadas hasta  $10^{-6}$ , por duplicado, para la cuantificación de microorganismos. De cada una de las diluciones anteriores se inoculó por extensión superficial, con perlas estériles, 0.1 mL en placa de agar MRS (AMRS) con  $\text{CaCO}_3$  al 1 %. Las placas así inoculadas fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis (jarras anaeróbicas) a 30 °C durante 72 horas. Este mismo procedimiento se realizó tanto para las cerezas frescas como para las cerezas secas, y se llevó a cabo también para el aislamiento de hongos filamentosos, aunque en ese caso el medio utilizado fue Agar Papa Dextrosa (PDA) con estreptomycinina (para la inhibición de la carga bacteriana) en una concentración de 500 ppm. En este caso, las placas fueron incubadas a 30 °C durante 8 días, en condiciones aerobias.

Para el aislamiento de bacterias endófitas a partir de cerezas frescas, se llevó a cabo un lavado previo de éstas con la finalidad de eliminar la carga microbiana superficial. Para ello, se hizo un primer enjuague con etanol al 70%, seguido de tres enjuagues más con agua destilada estéril, un lavado con hipoclorito de sodio al 15 % y por último tres enjuagues más con agua destilada estéril; en cada paso, las cerezas fueron decantadas tras los enjuagues. Una vez lavadas, se machacaron en condiciones estériles y nuevamente se procedió, con 10 g de la muestra, a realizar diluciones decimales ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) para la cuantificación. Como se describió para el aislamiento de bacterias epífitas, las diluciones seriadas se inocularon por extensión superficial en placas de AMRS con 1 % de  $\text{CaCO}_3$  y se incubaron a 30 °C durante 72 h en anaerobiosis.

Para el aislamiento de hongos endófitos, se procedió a lavar las cerezas frescas en las mismas condiciones descritas en el párrafo anterior, pero en este caso se realizó (en condiciones estériles) un corte sobre las cerezas desinfectadas y se colocaron posteriormente sobre placas de PDA con estreptomycin (500 ppm). Por cada placa se depositaron tres cerezas en puntos equidistantes; lo anterior se realizó por triplicado para cada muestra. Las condiciones de incubación fueron 30 °C durante 8 días.

### **8.3. Purificación y caracterización de los aislados**

A partir de las placas de AMRS con 1 % de  $\text{CaCO}_3$ , se hizo una resiembra de colonias con distinta morfología y, tras su purificación por estriado, se procedió a realizar una caracterización por tinción de Gram y descripción de las características coloniales.

Por otro lado, los hongos filamentosos aislados en las placas de PDA fueron sembrados para realizar su caracterización macroscópica y microscópica y verificar su pureza. En la caracterización macroscópica se evaluaron aspectos de la colonia tales como forma, color y textura y para la microscópica la forma de esporulación, la presencia de hifas septadas o aseptadas y el color de las mismas.

#### 8.4. Identificación molecular de bacterias por análisis de secuencias de ADNr 16S

Para la identificación genotípica de bacterias se realizó como primer paso la extracción de ADN. Para ello se hizo uso del DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen), con seguimiento del protocolo descrito por el proveedor (Anexo 1), y la extracción fue corroborada por electroforesis en gel de agarosa al 1%, a 85 V, en solución buffer Tris-Ácido Acético-EDTA (TAE). Se cargaron 5 µL de la muestra con 2 µL del buffer de carga con azul de bromofenol y se utilizó el marcador de peso molecular 1kb DNA ladder (Promega). El gel fue visualizado bajo luz ultravioleta en el equipo ENDURO™ GDS (Labnet International Inc.), utilizando como revelador de bandas el agente intercalante bromuro de etidio (0.5 µg/mL).

Posteriormente, se procedió a realizar la amplificación por PCR del gen ADNr 16S con los oligonucleótidos 8f (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Se utilizó la enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase de Promega y la mezcla de reacción utilizada se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación por PCR del ADNr 16S.

Reactivo	Volumen final (reacción:50 µL)	Concentración final
5X Green Gotaq® Flexi Buffer	10 µL	1 X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.4 µL	1.2 mM
dNTPs (10 mM)	0.5 µL	0.1 mM
Primer 8f (10 µM)	1 µL	0.2 µM
Primer 1492 r (10 µM)	1 µL	0.2 µM
Gotaq® Polimerasa (5 U/µL)	0.25 µL	1.25 U
Molde	1 µL	-
Agua	33.85 µL	-

La reacción se realizó en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad), con las condiciones que se presentan en la Tabla 5 y la amplificación fue corroborada por electroforesis en gel de agarosa al 1% (en las mismas condiciones arriba mencionadas). Se realizó una purificación con el QIAquick

PCR Purification Kit (Qiagen), con seguimiento del protocolo del proveedor (Anexo 2), y se midió la concentración de los productos en el equipo NanoDrop™ de Thermo Scientific; tras lo cual fueron enviados a secuenciar mediante la técnica de Sanger en la compañía Macrogen, Korea.

*Tabla 5. Condiciones utilizadas para la reacción de amplificación del ADNr 16S.*

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	95	2	1
Desnaturalización	95	0.5	30
Alineamiento	55	0.5	
Extensión	72	1.5	
Extensión final	72	5	1

Las secuencias obtenidas fueron visualizadas con el programa Finch TV (Geospiza) y DNA Chromatogram Explorer Lite (Heracle BioSoft) para llevar a cabo la depuración de zonas de baja calidad y posteriormente se analizaron, para obtener la identidad, con la aplicación Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnological Information, sitio web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Con la finalidad de complementar los resultados de identidad obtenidos, se construyó un árbol filogenético con el método neighbor-joining, el modelo Jukes-Cantor y un análisis bootstrap de 1000 réplicas con el programa MEGA versión X (Kumar *et al.*, 2018). Como referencia se incluyeron diversas secuencias de ADNr 16S (alineadas con el programa ClustalW), previamente depositadas en la base de datos, con las que las secuencias de los aislados tuvieron una mayor similitud.

## **8.5. Identificación de hongos**

### **8.5.1. Identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF**

Para la identificación de los hongos filamentosos se utilizó, como primera aproximación, la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF (Sistema de desorción/ionización por láser asistida en matriz, con un analizador de tiempo de vuelo). Para ello, las cepas aisladas se desarrollaron en medio líquido caldo papa dextrosa (PD) con incubación a 30 °C y en agitación (100-150 rpm). Una vez formados, los pellets de micelio fueron cosechados antes de la esporulación del hongo y se transfirieron a tubos Eppendorf, donde se sometieron a dos lavados

con agua destilada estéril y fueron posteriormente almacenados en congelación a -20 °C. Las cepas así conservadas se enviaron al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ) donde se generó un extracto proteico a partir del pellet con el protocolo “Formic Acid Extraction Method” (Bruker Daltonics GmbH), se transfirió 1 µL de este extracto a una placa de acero inoxidable y se generaron espectros de masas en un equipo Microflex LT (Bruker Daltonics GmbH). A través del *software* MALDI BIOTYPER 3.1 se compararon los espectros obtenidos con espectros de referencia pertenecientes a la base de datos Filamentous Fungi (Bruker Daltonics GmbH) para realizar la identificación de los aislados.

### **8.5.2. Identificación molecular por análisis de secuencias de la región ITS**

De modo complementario a la identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF se realizó la identificación genotípica de las cepas. Como primer paso se llevó a cabo la extracción de ADN y para ello cada hongo filamentoso fue cultivado en caldo Czapek extracto de levadura (CYA) a 30 °C y en agitación (100-150 rpm) hasta la formación de pellets de micelio que fueron cosechados (5-10 pellets) y colocados un tubo Falcon™ con solución salina isotónica y perlas de ebullición de vidrio. En un agitador Vortex a máxima velocidad se procedió a realizar una primera disgregación del micelio, y de la suspensión resultante se transfirió 1 mL a un tubo Eppendorf de tapón de rosca que contenía 500 mg de perlas de vidrio estériles (0.5 mm), se centrifugó a 11,000 × g durante un minuto y la fase líquida fue eliminada. Posteriormente, se hizo uso del DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen) con el protocolo del proveedor (Anexo 1) modificado de la siguiente forma: al tubo Eppendorf que contenía las perlas de vidrio y el pellet de micelio se le agregaron 300 µL de la solución PowerBead y 50 µL de la solución SL. Se colocó en un homogenizador Mini-Beadbeater-16 (BioSpec Products) durante cuatro minutos y después se realizó un calentamiento a 65 °C durante 1 minuto en un ThermoMixer® (Eppendorf). A partir de este punto se continuó con las instrucciones del proveedor, paso 4 del Anexo 1.

La electroforesis en gel de agarosa para analizar el ADN extraído se llevó a cabo como se describió en la sección de identificación de bacterias (sección 8.4).

Una vez corroborada la extracción, se realizó la amplificación por PCR de la región ITS, con los oligonucleótidos ITS1 (5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´) e ITS4 (5´-TCCTCCGTCTATTGATATGC-3´). Se utilizó la GoTaq® Green Master Mix de Promega y la mezcla de reacción utilizada se muestra en la Tabla 6. En la Tabla 7 se presentan las condiciones en las cuales fue llevada a cabo, en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad).

*Tabla 6. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación por PCR de la región ITS.*

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen final (reacción:50 µL)</b>	<b>Concentración final</b>
GoTaq® Green Master Mix, 2X	25 µL	1 X
Primer ITS1 (10 µM)	1 µL	0.2 µM
Primer 1492 r (10 µM)	1 µL	0.2 µM
Molde	1-10 µL	-
Agua	Aforo a 50 µL	-

*Tabla 7. Condiciones utilizadas para la reacción de amplificación de la región ITS.*

<b>Paso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Numero de ciclos</b>
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	95	0.5	35
Alineamiento	61	1	
Extensión	72	1	
Extensión final	72	6	1

Para analizar los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel como se describe en la sección 8.4.; sin embargo, en este caso se utilizó el marcador de peso molecular 1 kb DNA ladder (SIGMA-ALDRICH®). La purificación se llevó a cabo con el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) y se midió la concentración de los productos en el equipo NanoDrop™ de Thermo Scientific; tras lo cual fueron secuenciados mediante la técnica de Sanger en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la UAM Iztapalapa. El análisis de secuencias de la región ITS y la construcción de un árbol filogenético se realizó de la misma manera que para las secuencias de ADNr 16S (sección 8.4).

## **8.6. Evaluación de la producción de ocratoxina A**

La producción de ocratoxina A se determinó mediante la adaptación de las metodologías de Bragulat *et al.* (2001) y Ruellan (2017). Como primer paso, se realizó una extracción de la OTA a partir de medio de cultivo sólido; para ello el hongo a evaluar se sembró en PDA acidificado con ácido tartárico (0.14%) y se procedió a incubar a 30 °C durante 5 días. De este cultivo se tomaron cuatro discos de 5 mm de diámetro, se pesaron, y se les adicionó 2.5 mL de una mezcla de metanol: ácido fórmico (25:1); la muestra así preparada fue sonicada durante veinte minutos y posteriormente se filtró (papel filtro Whatman™ No. 41) y se secó hasta evaporación total.

El análisis de OTA en el extracto se realizó por HPLC (Shimadzu Prominence): elución isocrática con agua/metanol/ácido acético (30/69/1) a un flujo de 1 mL/min y a una temperatura de 35 °C. La detección por fluorescencia se hizo a las longitudes de onda de excitación de 333 nm y de emisión de 460 nm y la cuantificación se realizó a partir de una curva de calibración elaborada con un estándar de OTA en las concentraciones siguientes: 10, 25, 50,75 y 100 ng/mL.

## **8.7 Análisis de las comunidades microbianas por *metabarcoding***

Para llevar a cabo la técnica de *metabarcoding* se realizó, como primer paso, la extracción de ADN directa a partir de las cerezas de café. Se procesaron dos muestras de cerezas frescas y dos de secas como se describe a continuación: se pesaron asépticamente 8 g de las cerezas y se colocaron en matraces con 10 mL de agua peptonada estéril en agitación durante dos horas en un *Shaker* a 150 rpm. Transcurrido ese tiempo, se dejaron 24 h en reposo en condiciones estáticas y se procedió a decantar el sobrenadante, el cual fue centrifugado a 11,000 × *g* durante 10 minutos, a 4 °C. A partir del pellet que se obtuvo en este paso, se llevó a cabo la extracción de ADN con el DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen), se analizó por electroforesis en gel de la misma forma que se describe en la sección 8.4 y se midió la concentración y la relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm (A260/280) en el equipo NanoDrop™ de Thermo Scientific.

El ADN obtenido fue enviado a la compañía Macrogen Korea, donde se llevó a cabo la preparación de librerías y la secuenciación. Para perfilar las

comunidades bacterianas se amplificó la región hipervariable V3-V4 del ADNr 16S con los oligonucleótidos Bakt\_341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG -3') y Bakt\_805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'); para perfilar las comunidades fúngicas, la región ITS2 con los oligonucleótidos ITS3F (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') e ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). La secuenciación de amplicones se realizó en la plataforma MiSeq™ de Illumina en una configuración *paired-end* (2x300).

Una vez obtenidas las secuencias, se procedió a realizar el análisis bioinformático en el CIRAD-Montpellier (Centro de cooperación internacional en investigación agronómica para el desarrollo) con el apoyo de los investigadores Noël Durand y Florentin Constancias. El procesamiento inicial de las secuencias se llevó a cabo con base en el procedimiento descrito por Mahé (2018). Esta etapa del análisis incluyó la fusión de lecturas pareadas, recorte de *primers*, eliminación de secuencias replicadas, cortas y con bases ambiguas ("N"), agrupación en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) con Swarm (Mahé *et al.*, 2015), detección de quimeras, asignación taxonómica con la base de datos SILVA (132) para el alineamiento de secuencias de ADNr 16S y la base de datos UNITE (2017-12-01) para el alineamiento de las secuencias de ITS, así como la construcción de la tabla de OTUs.

En el análisis posterior de los resultados, se usaron los paquetes phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013), ampvis2 (Andersen *et al.*, 2018), vegan (Oksanen *et al.*, 2018), stats (R Core Team, 2018) y ggplot2 (Wickham, 2016) en R que permitieron realizar el análisis de la distribución de lecturas, la rarefacción y filtración de OTUs con bajo número de secuencias (<2), medir la diversidad alfa (riqueza de OTUs e índices ACE y Shannon) y beta (Bray-Curtis), la creación de gráficos y el análisis estadístico. Como parte de este último, se realizó una prueba de suma de rangos de Wilcoxon (Mann-Whitney-Wilcoxon), para comparar las métricas de alpha diversidad, y para probar la diferencia en la composición de las comunidades de cerezas frescas y secas se llevó a cabo la prueba de PERMANOVA (análisis de varianza multivariado permutacional) basada en la disimilitud de Bray-Curtis. Para las dos pruebas se estableció un nivel de significancia de 0.05.

## 9. Resultados y discusión

### 9.1. Cuantificación de grupos microbianos

La cuantificación de grupos microbianos en cerezas frescas y secas fue posible por el empleo de la técnica de dilución y extensión superficial en placa para el aislamiento de bacterias y hongos filamentosos. Los resultados de la cuantificación se presentan en la Tabla 8 como el número de Unidades Formadoras de Colonias por gramo de cerezas (UFC/g).

*Tabla 8. Cuantificación de grupos microbianos en cerezas secas y frescas.*

Cuantificación en AMRS + 1% CaCO <sub>3</sub> (UFC/g)		Cuantificación en PDA + Str de hongos filamentosos (UFC/g)
<b>Cerezas secas</b>		
46 x 10 <sup>4</sup>		37x 10 <sup>4</sup>
<b>Cerezas frescas</b>		
Epífitos	Endófitos	Epífitos
71 x 10 <sup>7</sup>	11 x 10 <sup>4</sup>	9 x 10 <sup>3</sup>

Como se mencionó en la metodología, se utilizaron dos medios de cultivo distintos, AMRS con CaCO<sub>3</sub> (1%) y PDA con estreptomicina (500 ppm). Los resultados de UFC/g de cerezas corresponden, en el caso de AMRS, a poblaciones de bacterias y levaduras que lograron desarrollarse en este medio bajo condiciones de anaerobiosis y en el caso de PDA con estreptomicina a la población de hongos filamentosos.

Por otro lado, para cerezas frescas, las cuentas en AMRS se dividen entre aquellos microorganismos que se encontraban en la superficie (epífitos) y los endófitos y en el caso de PDA se reportan únicamente los hongos filamentosos epífitos ya que en el aislamiento de endófitos no se utilizó la técnica de dilución y extensión superficial, sino la siembra directa de las cerezas desinfectadas superficialmente.

En cerezas frescas se determinó, con el aislamiento en AMRS, una mayor cantidad de microorganismos epífitos que endófitos y al realizar una comparación entre los grupos microbianos desarrollados en AMRS y en PDA, se observó que los hongos filamentosos se encontraban en una cantidad menor que el grupo de bacterias (desarrolladas en anaerobiosis) y levaduras en

conjunto. En cerezas secas, en cambio, la población de hongos filamentosos se encontró en el mismo orden de magnitud (UFC/g de cerezas) que la de los microorganismos desarrollados en AMRS.

Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los de investigaciones anteriores, se observó que la cantidad de hongos filamentosos encontrada en las muestras de Tacotalpa, Tabasco, fue más alta que la reportada por autores como Silva *et al.* (2008a) y Vilela *et al.* (2010) en café de Brasil.

## 9.2. Aislamiento y caracterización de bacterias

A partir de los aislamientos originales en las placas de AMRS con CaCO<sub>3</sub> (1%), se eligieron colonias con distintas características morfológicas que fueron resembradas para su purificación y caracterización posterior. La tinción de Gram que se llevó a cabo como parte de esta caracterización, permitió observar la abundancia de bacilos Gram-negativos entre los aislados; de estos se seleccionó una colección de 14 cepas que se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Caracterización de la colección de bacterias aisladas.

Aislado	Tinción de Gram	Descripción colonial
SC2.3	Bacilos Gram-negativos	Colonias blancas, convexas, bordes enteros.
SC2.35'	Bacilos Gram-negativos	Colonias pequeñas, blancas, bordes enteros.
SC2.43'	Bacilos Gram-negativos	Colonias crema, brillantes, bordes enteros.
SC2.44'	Bacilos Gram-negativos	Colonias blancas, convexas, bordes enteros
SC2.50	Bacilos Gram-negativos	Colonias crema, convexas, bordes enteros.
SC2.50'	Bacilos Gram-negativos	Colonias blancas, convexas, bordes enteros.
SC2.53'	Bacilos Gram-negativos	Colonias color crema, brillantes, bordes enteros.
SC3.12	Bacilos Gram-negativos	Colonias blancas, brillantes, bordes enteros.
SC3.75	Bacilos Gram-negativos	Colonias crema, brillantes, bordes enteros.
SC3.77	Bacilos Gram-negativos	Colonias blancas, brillantes, bordes enteros.
SC3.78	Bacilos Gram-negativos	Colonias blancas, convexas, bordes enteros.
EnC1.26	Bacilos Gram-negativos	Colonias crema, planas, bordes enteros.
EnC1.27	Bacilos Gram-negativos	Colonias crema, convexas, bordes enteros.
EnCI.40	Bacilos Gram-negativos	Colonias crema, planas, bordes enteros.

El hallazgo de bacterias Gram-negativas en abundancia concuerda con lo reportado por diversos autores que han descrito mediante aislamiento los géneros *Enterobacter* (Evangelista *et al.*, 2015; Nasanit y Satayawut, 2015) y *Erwinia* (Avallone *et al.*, 2001; Evangelista *et al.*, 2015) y las especies *Escherichia*

*coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pantoea agglomerans* (Vilela *et al.*, 2010; Nasanit y Satayawut, 2015), como bacterias dominantes en el procesamiento del café.

### 9.3. Identificación molecular de bacterias por análisis de secuencias de ADNr 16S

Con la finalidad de realizar la identificación de los 14 aislados seleccionados se llevó a cabo la extracción de ADN con el DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen). La correcta extracción fue analizada por electroforesis en gel de agarosa y una vez confirmada se procedió a realizar la reacción de amplificación del ADNr 16S. En la Figura 4 se muestra el gel de electroforesis con los productos de PCR.

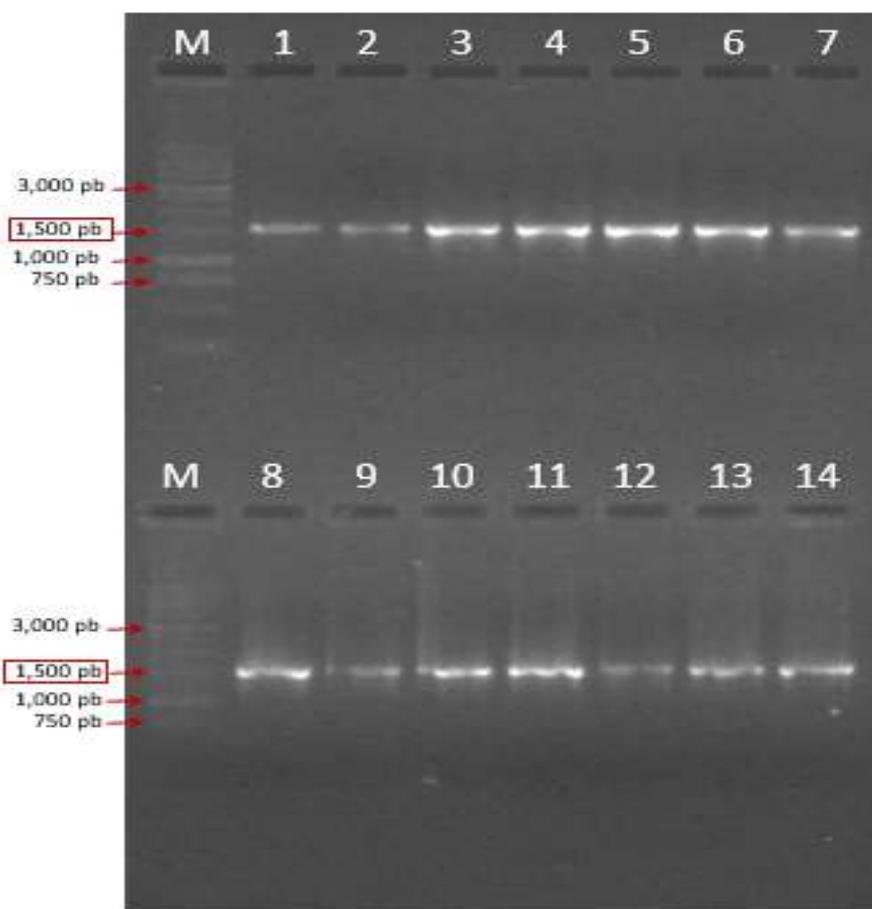


Figura 4. Amplificación del ADNr 16S. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro etidio (0.5 µg/mL). Velocidad de corrida 85 V. M: Marcador de peso molecular 1kb DNA ladder (Promega), Carril: 1. SC2.50', 2. SC2.53', 3. SC3.77, 4. SC3.75, 5. SC2.50, 6. SC2.43', 7. EnC1.26, 8. SC2.35', 9. SC2.3, 10. SC3.78, 11. SC2.44', 12. SC3.12, 13. EnC1.27, 14. EnC1.40.

Como puede observarse, la amplificación fue exitosa en todos los casos; en el gel de electroforesis (Figura 4) se obtuvo una sola banda a la altura de 1.5 kb (en referencia al marcador de peso molecular), lo que corresponde al tamaño esperado de la amplificación del ADNr 16S con los oligonucleótidos 8f y 1492 r, con los que se obtiene casi toda la longitud del gen.

Se procedió con la secuenciación y mediante el posterior análisis de las secuencias por BLAST se obtuvieron los resultados de identificación que se presentan en la Tabla 10; en ésta se muestran las secuencias de ADNr 16S previamente depositadas en la base de datos del NCBI, de cepas con las que las secuencias de los aislados tuvieron un alto grado de similitud (porcentaje de identidad  $\geq 99\%$ ). Complementario a este resultado, el árbol filogenético (Figura 5), elaborado a partir de esta información, permitió observar la agrupación de los aislados en dos diferentes géneros con una clara separación de las cepas EnC1.27 y EnC1.40 en una rama bien definida y respaldada por un alto valor de bootstrap (94 %); dado que bootstrap es una técnica estadística de remuestreo e implica crear réplicas de los dendrogramas a partir del alineamiento original, el valor de bootstrap indica el porcentaje de árboles en los que aparece cada nodo por lo que los nodos con un valor alto tienen también una alta probabilidad de ser correctos (Salinas y Lisbona, 2016).

Se determinó, de esta forma, que doce de las catorce cepas aisladas pertenecen al género *Klebsiella* y se relacionaron estrechamente con especies de *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella michiganensis* y únicamente dos de los aislados se relacionaron con *Pantoea agglomerans*.

Estas bacterias, género *Klebsiella* y *Pantoea agglomerans*, fueron también detectadas en el presente estudio con la técnica de *metabarcoding*, entre las bacterias representadas con mayor abundancia (sección 9.7.3.1).

Adicionalmente, su hallazgo está en concordancia con lo encontrado en otros estudios que se han realizado hasta el momento para caracterizar la diversidad microbiana en cerezas de café y su procesamiento. El género *Klebsiella* y la especie *Pantoea agglomerans* se han incluido entre las bacterias dominantes (Avallone *et al.*, 2001; Vilela *et al.*, 2010; Nasanit y Satyawut, 2015); la última, además, ha sido reportada también por Silva *et al.* (2008a) y Evangelista *et al.*

(2015) y *K. oxytoca*, en particular, se ha reportado por Silva *et al.* (2000) y Evangelista *et al.* (2015).

Tabla 10. Identificación de bacterias por el análisis de secuencias de ADNr 16S.

Aislado	Cepa estrechamente relacionada	QC (%)	Valor de expectancia (E- value)	Identidad (%)	No. de acceso (cepa relacionada)
SC2.50'	<i>Klebsiella oxytoca</i> M-2	99	0.0	99	EF633996.1
SC2.53'	<i>Klebsiella oxytoca</i> M-2	99	0.0	100	EF633996.1
SC3.77	<i>Klebsiella oxytoca</i> RCB563	100	0.0	99	KT260775.1
SC3.75	<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 13182	100	0.0	99	NR_118853.1
SC2.50	<i>Klebsiella oxytoca</i> M-2	99	0.0	100	EF633996.1
SC2.43'	<i>Klebsiella oxytoca</i> M-2	99	0.0	100	EF633996.1
EnC1.26	<i>Klebsiella oxytoca</i> RCB247	100	0.0	99	KT260459.1
SC2.35'	<i>Klebsiella oxytoca</i> M-2	100	0.0	99	EF633996.1
SC2.3	<i>Klebsiella oxytoca</i> RCB247	99	0.0	99	KT260459.1
SC3.78	<i>Klebsiella oxytoca</i> 127 (C4Plas(d))	100	0.0	99	KF254665.1
SC2.44'	<i>Klebsiella michiganensis</i> VITSW4	100	0.0	100	KP100328.1
SC3.12	<i>Klebsiella oxytoca</i> M-2	100	0.0	99	EF633996.1
EnC1.27	<i>Pantoea agglomerans</i> LSC1	100	0.0	99	KC210845.1
EnC1.40	<i>Pantoea agglomerans</i>	100	0.0	99	EU879089.1

Se ha postulado un papel importante de estas bacterias en la degradación del mucilago del café, lo que no ha sido comprobado debido a la baja producción de enzimas pectinolíticas demostrada por las cepas de *Klebsiella* y *Pantoea* aisladas hasta los estudios de Avallone *et al.* (2001; 2002). Sería interesante, sin embargo, evaluar la producción de tales enzimas por las cepas encontradas en las cerezas de café de Tabasco.

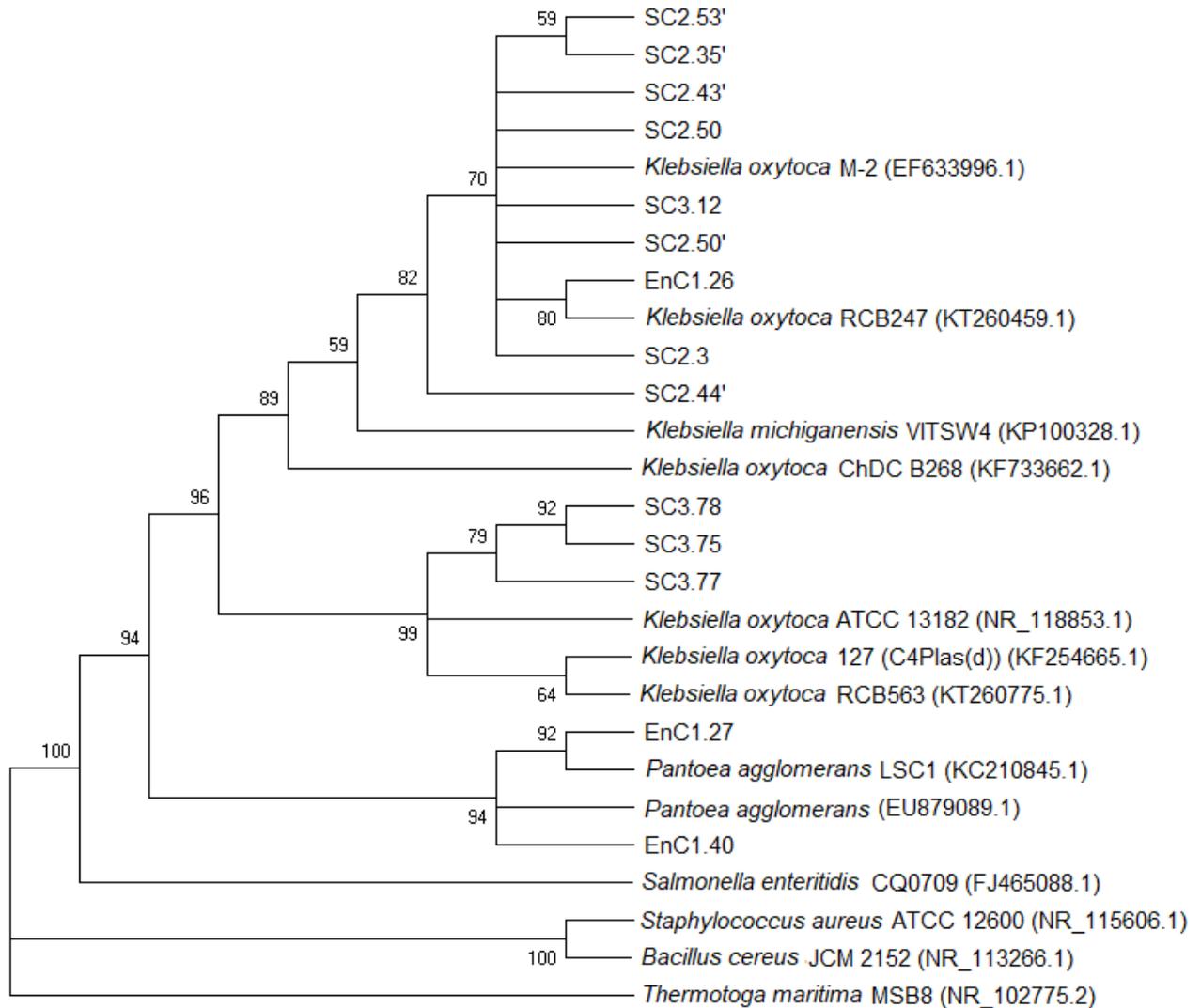


Figura 5. Árbol filogenético basado en las secuencias de ADNr 16S de los aislados y de cepas estrechamente relacionadas previamente depositadas en la base de datos del NCBI. Elaborado con el método neighbor-joining y el modelo Jukes-Cantor. Se muestran los valores de bootstrap superiores al 50%. *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Thermotoga maritima* se utilizaron como grupo externo.

#### 9.4. Aislamiento y caracterización de hongos filamentosos

El aislamiento de hongos filamentosos en placas de PDA con estreptomycin reveló, un gran número de estos microorganismos con características coloniales distintas. En la Figura 6 se muestran con fines ilustrativos algunas de las colonias observadas, tanto en placas de aislamiento de endófitos, como a partir de una de las placas sembrada con la técnica de dilución y extensión superficial utilizada para el aislamiento de hongos epífitos.



Figura 6. Placas de aislamiento en medio PDA con estreptomina. Aislamiento de endófitos: imágenes 1 y 2; aislamiento de hongos epífitos: imagen 3.

Mediante la selección de las colonias con características macroscópicas únicas, se obtuvo una colección de 27 cepas, conformada por los hongos presentes en cerezas frescas (endófitos y epífitos) y los presentes en cerezas secas. En la Tabla 11 se presenta la distribución de los aislados obtenidos de cada punto.

Tabla 11. Distribución de cepas de hongos aislados de los diferentes puntos de análisis.

Cerezas frescas		Cerezas secas
Epífitos	Endófitos	
SC1.1	Ec1.d4 g	Sec 1
SC1.2	Ec1.d4 c	Sec 1N
SC1.3	Ec1.5	Sec 2
SC1.4	Ec2.d4	Sec 3
SC1.5	Ec2.d2	Sec 4
SC2.1	Ec2.d3	Sec 5
SC2.2	Ec3.di2	
SC2.2 r	Ec3.d3	
SC2.3	Ec3. 4d a	
SC2.4	Ec3.d5	
SC3.3		

La caracterización por medio de la observación y descripción de características macro y microscópicas permitió realizar la identificación fenotípica de 17 de los aislados (Tabla 12) y entre ellos, se determinó que 15 se encontraron dentro de los principales géneros productores de micotoxinas: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Paterson *et al.*, 2014).

Estos géneros sintetizan aquellas micotoxinas de mayor relevancia desde el punto de vista de seguridad alimentaria: aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisinas y tricotecenos (Arroyo-Manzanares *et al.*, 2014) y su hallazgo como parte de la

micobiota asociada al café ha sido también reportado por otros autores (Silva *et al.*, 2008a; Vilela *et al.*, 2010; Djossou *et al.*, 2015).

Tabla 12. Identificación fenotípica de hongos filamentosos.

Cerezas frescas		Cerezas secas
Epífitos	Endófitos	-
SC1.1 ( <i>Penicillium</i> )	Ec2.d2 ( <i>Fusarium</i> )	Sec 1 ( <i>Fusarium</i> )
SC1.4 ( <i>Cladosporium</i> )	Ec2.d3 ( <i>Aspergillus</i> )	Sec 1N ( <i>Fusarium</i> )
SC1.5 ( <i>Acremonium</i> )	Ec3.di2 ( <i>Penicillium</i> )	Sec 2 ( <i>Fusarium</i> )
SC2.1 ( <i>Fusarium</i> )		Sec 3 ( <i>Penicillium</i> )
SC2.2 ( <i>Fusarium</i> )		Sec 4 ( <i>Aspergillus</i> sección Nigri)
SC2.3 ( <i>Fusarium</i> )		Sec 5 ( <i>Fusarium</i> )
SC2.4 ( <i>Fusarium</i> )		
SC3.3 ( <i>Penicillium</i> )		

La presencia de *Aspergillus* y *Penicillium*, sin embargo, se consideró de mayor relevancia en este estudio, al ser géneros que contienen especies productoras de ocratoxina A tales como *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. westerdijkiae*, *A. niger*, *P. verrucosum* y *P. nordicum* (Paterson *et al.*, 2014). La identificación más profunda de los aislados por tanto se volvió pertinente.

## 9.5. Identificación de las cepas de hongos filamentosos

### 9.5.1. Identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF

De los 27 aislados de hongos filamentosos, se seleccionaron quince para llevar a cabo la identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF. Como se mencionó en la metodología para cada aislado se generó un espectro de masas que fue comparado con espectros de referencia de la base de datos Filamentous Fungi (Bruker Daltonics GmbH). El resultado obtenido de este análisis comparativo se presenta en la Tabla 13. La similitud entre el espectro generado por la cepa y el espectro de referencia se expresa como una puntuación que va de 0 a 3. Si el valor se encuentra entre 2.300 y 3.000 se considera una identificación altamente probable a nivel de especie, entre 2.000 y 2.299 una identificación segura a nivel de género e identificación probable a nivel de especie, entre 1.700 y 1.999 como identificación probable a nivel de género y por debajo de 1.700 como identificación no confiable.

Tabla 13. Identificación de hongos por espectrometría de masas MALDI-TOF.

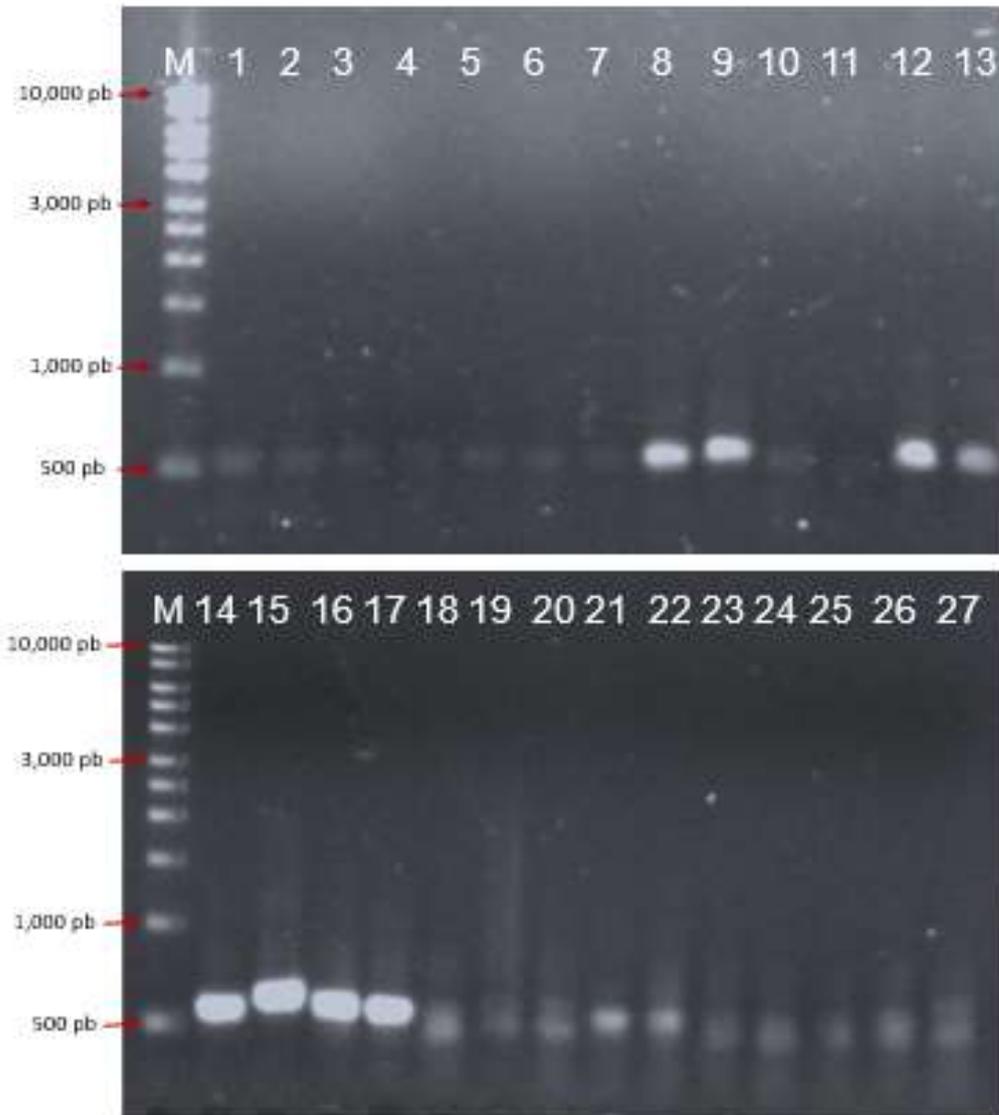
Cepa	Identificación	Puntuación
SC1.4	No identificada	0.958
Ec2.d3	No identificada	1.049
Sec 4	No identificada	1.028
Ec1.d1	No identificada	1.091
Sec3	No identificada	1.17
SC3.3	No identificada	1.255
Ec3.d5	No identificada	1.529
Ec3.d1	No identificada	1.188
SC1.1	No identificada	1.056
Ec3.di2	No identificada	1.052
Ec1.d4 g	No identificada	0.876
SC2.2	No identificada	0.927
SC1.2	No identificada	1.11
Sec 1	<i>Fusarium solani</i>	1.726
SC1.3	No identificada	1.244

Como puede observarse en la Tabla 13, la identificación se logró únicamente para la cepa Sec 1, asociada a *Fusarium solani* con una baja puntuación (1.721). Ésta, sin embargo, fue corroborada posteriormente mediante la identificación molecular (sección 9.5.2).

Es probable que el bajo nivel de identificación con esta técnica sea debido a la falta de espectros de referencia en la base de datos que coincidieran con los aislados, lo cual además se dificulta al tratarse de cepas obtenidas de muestras ambientales, en las que la diversidad puede ser enorme. La identificación de hongos por MALDI-TOF MS, por otro lado, se ha desarrollado a una velocidad menor que la identificación bacteriana, por su inherente complejidad morfológica (Singhal *et al.*, 2015).

### 9.5.2 Identificación molecular por análisis de secuencias de la región ITS

La identificación molecular de los hongos filamentosos involucró, al igual que para bacterias, la extracción de ADN que se corroboró por medio de electroforesis en gel de agarosa. Posterior a ello, se llevó a cabo la amplificación de la región ITS y en la Figura 7 se muestra el gel de electroforesis con los productos de PCR.



*Figura 7. Amplificación de la región ITS. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro etidio (0.5 µg/mL). Velocidad de corrida 85 V. M: Marcador de peso molecular 1kb DNA ladder (SIGMA-ALDRICH®), Carril: 1. SC2.2r, 2. SC2.3, 3. Sec 5, 4. Ec2.d2, 5. SC2.1, 6. SC2.2, 7. Ec1.d4 g, 8. Sec 3, 9. Ec3.di2, 10. Ec1.5, 11. Ec3.4d a, 12. Sec 4, 13. Ec2.d3, 14. Sec 1, 15. SC1.3, 16. SC1.1, 17. SC3.3, 18. Ec1.d4 c, 19. SC1.5, 20. Ec3.d5, 21. SC1.4, 22. Ec3.d3, 23. Sec 1N, 24. SC2.4, 25. Sec 2, 26. Ec2.d4, 27. SC1.2.*

La amplificación fue exitosa en todos los casos y como puede observarse en el gel de electroforesis (Figura 7), se obtuvo para todas las cepas una banda a una altura cercana a la banda de 500 pb en el marcador de peso molecular; esta corresponde al tamaño esperado de la región ITS completa, que en hongos del

phylum Ascomycota tiene una longitud promedio de 500 pb (Op De Beeck *et al.*, 2014).

Se procedió a realizar la secuenciación en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la UAM Iztapalapa y del análisis de las secuencias resultantes por BLAST se obtuvieron los resultados de identificación que se muestran en la Tabla 14. En esta tabla se presentan las secuencias de la región ITS, previamente depositadas en la base de datos del NCBI, de cepas con las que las secuencias de los aislados tuvieron un alto grado de similitud (porcentaje de identidad  $\geq 99\%$ ). De modo complementario al análisis de secuencias, la construcción de un árbol filogenético con el método de neighbor-joining (Figura 8) permitió observar un claro agrupamiento para los trece géneros encontrados (*Penicillium*, *Ochroconis*, *Hyalocladosporiella*, *Cladosporium*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Aspergillus*, *Nigrospora*, *Xylaria* y *Purpureocillium*) y las diferentes especies de *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus*.

A pesar de que cinco de estos géneros habían sido previamente identificados fenotípicamente y que mediante espectrometría de masas MALDI-TOF se había logrado la identificación de una cepa como *Fusarium solani*, los resultados más completos obtenidos en esta sección resaltan la importancia de la identificación molecular. Hasta el momento, sin embargo, entre los escasos trabajos enfocados a determinar la diversidad fúngica en cerezas de café y a lo largo de su procesamiento, no se había hecho uso de tal herramienta y la identificación de aislados había sido realizada solo fenotípicamente (Silva *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2008b; Vilela *et al.*, 2010; Nasanit y Satayawut, 2015), lo que probablemente influyó en que la identificación a nivel de especie se había limitado a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* (Silva *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2008a; Vilela *et al.*, 2010), *Cladosporium* (Silva *et al.*, 2008a; Vilela *et al.*, 2010) y *Mucor* (Vilela *et al.*, 2010). En este trabajo, el hallazgo de *Penicillium crustosum*, *P. citrinum*, *Fusarium solani*, *F. lateritium*, *Aspergillus niger*, *A. flavus* y *Cladosporium cladosporioides* coincide con esas especies previamente reportadas; mientras que, a nivel de género, se encontró también a *Acremonium* sp. (Nasanit y Satayawut, 2015).

Tabla 14. Identificación de hongos por el análisis de secuencias de la región ITS.

Aislado	Cepa estrechamente relacionada	QC (%)	E-value	Identidad (%)	No. de acceso (cepa relacionada)
SC1.1	<i>Penicillium brasilianum</i>	100	0.0	100	AB455514.2
SC1.2	<i>Ochroconis cordanae</i> CBS 174.7	100	0.0	100	KF156023.1
SC1.3	<i>Hyalocladosporiella cannae</i>	100	0.0	100	MF072396.1
SC1.4	<i>Cladosporium cladosporioides</i> HNWSW-1	100	0.0	100	MH535968.1
SC1.5	<i>Acremonium camptosporum</i> CBS 677.74	100	0.0	100	MH860886.1
SC2.1	<i>Fusarium solani</i> F04	100	0.0	100	MF625660.1
SC2.2	<i>Fusarium lateritium</i> AME- 129	100	0.0	99	MG434510.1
SC2.2 r	<i>Fusarium lateritium</i> RM1.18A.10	100	0.0	99	MH397076.1
SC2.3	<i>Gibberella fujikuroi</i> FK070205	100	0.0	100	EU979565.1
SC2.4	<i>Fusarium lateritium</i> PN- 2014-08-28-A2	100	0.0	99	KT319045.1
SC3.3	<i>Penicillium sclerotiorum</i> MPL/A/12/14	100	0.0	100	MF574738.1
Ec1.d4 g	<i>Colletotrichum siamense</i> HJH-2	100	0.0	100	MH370507.1
Ec1.d4 c	<i>Colletotrichum siamense</i>	100	0.0	100	MH085103.1
Ec1.5	<i>Fusarium lateritium</i> T-28	100	0.0	99	KC787693.1
Ec2.d4	<i>Curvularia aerea</i> CBS 533.70	100	0.0	100	MH859836.1
Ec2.d2	<i>Fusarium solani</i> F04	100	0.0	100	MF625660.1
Ec2.d3	<i>Aspergillus flavus</i> BT27	100	0.0	100	MH137934.1
Ec3.di2	<i>Penicillium crustosum</i> F33-02	100	0.0	99	KX664375.1
Ec3.d3	<i>Nigrospora sphaerica</i> 228F7C-AC	96	0.0	100	MG751230.1
Ec3. 4d a	<i>Xylaria multiplex</i> ECU37	99	0.0	100	MF435085.1
Ec3.d5	<i>Purpureocillium lilacinum</i> E279	99	0.0	100	MF681538.1
Sec 1	<i>Fusarium solani</i> F04	100	0.0	100	MF625660.1
Sec 1N	<i>Fusarium solani</i> 522F22C-AM	100	0.0	100	MG751209.1
Sec 2	<i>Fusarium solani</i> F04	100	0.0	100	MF625660.1
Sec 3	<i>Penicillium citrinum</i> AC24	100	0.0	100	MK158304.1
Sec 4	<i>Aspergillus niger</i> An/MMA 2018	100	0.0	100	MK028957.1
Sec 5	<i>Fusarium solani</i> F04	100	0.0	100	MF625660.1

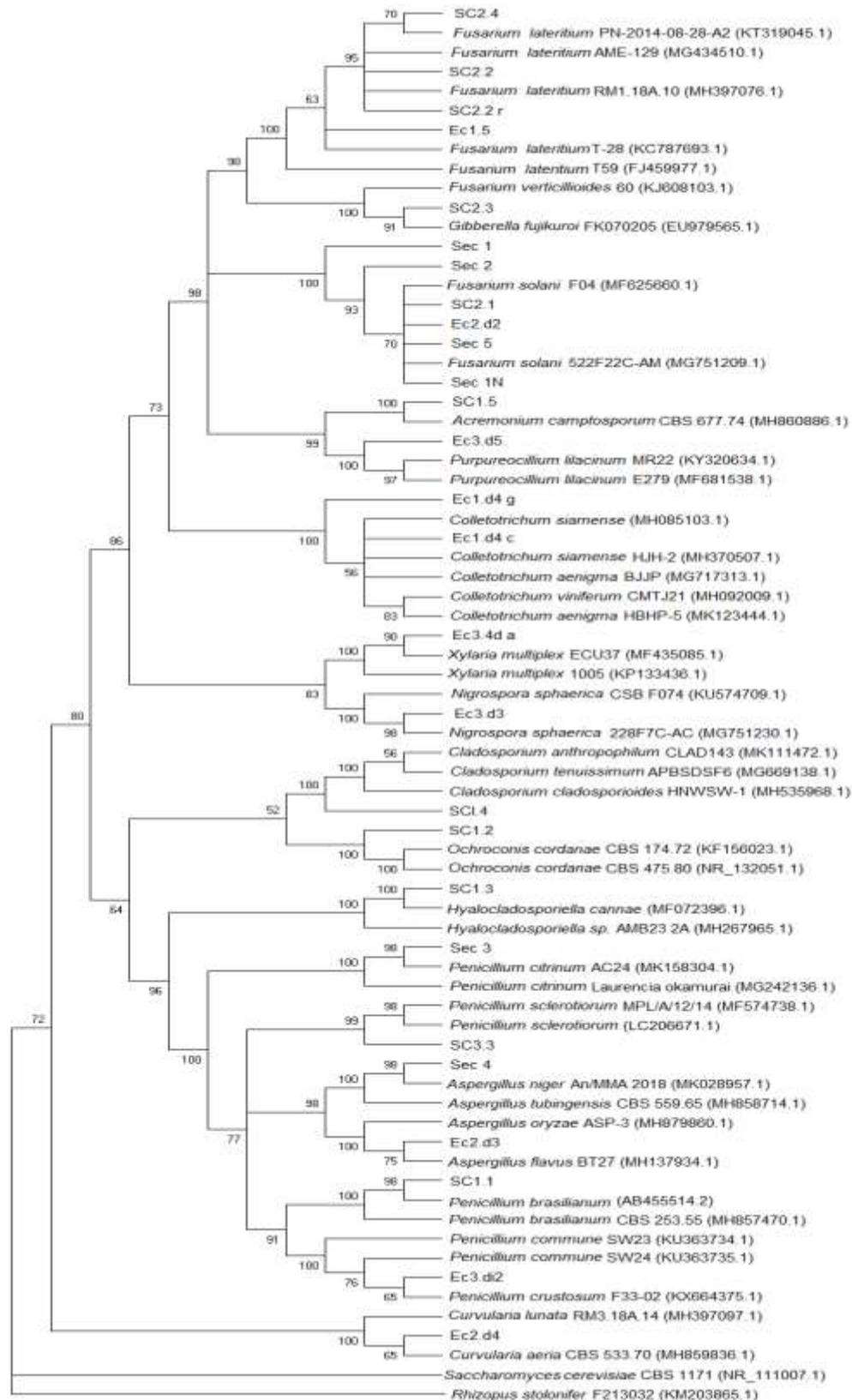


Figura 8. Árbol filogenético basado en las secuencias de la región ITS de los aislados y de cepas estrechamente relacionadas previamente depositadas en la base de datos del NCBI. Elaborado con el método neighbor-joining y el modelo Jukes-Cantor. Se muestran los valores de bootstrap superiores al 50%. *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus stolonifer* como grupo externo.

Los hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Penicillium*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Nigrospora*, *Colletotrichum* y las especies *A. niger*, *Penicillium citrinum* y *Fusarium solani*, detectados por medio del aislamiento de cepas (Tabla 14), lograron detectarse también con la técnica de *metabarcoding* usada como método independiente del cultivo en el presente estudio. Los géneros *Ochroconis*, *Hyalocladosporiella*, *Acremonium*, *Xylaria* y *Purpureocillium*, en cambio, fueron únicamente hallados del aislamiento; demostrándose la importancia, señalada también por otros autores que han hecho uso de NGS (Jia *et al.*, 2018; Kraková *et al.*, 2018), de realizar estudios polifásicos por métodos dependientes e independientes del cultivo para una mejor identificación de comunidades microbianas.

La caracterización por medio del aislamiento reveló la presencia de varios hongos que son frecuentemente aislados de plantas, por lo que su presencia en las cerezas está probablemente ligada a la microbiota del cafeto. Algunos ya han sido reportados anteriormente en plantas de café y se han asociado a determinadas enfermedades, como *Fusarium solani* a la podredumbre seca de raíz (Al-Areqi *et al.*, 2015) y *Colletotrichum* sp. a la antracnosis (James *et al.*, 2014); otros, tales como *P. citrinum*, *P. crustosum* y *P. sclerotiorum*, se han aislado como endófitos y aun no se ha identificado el papel que desempeñan en la planta (Vega *et al.*, 2005), igual que para el resto de las cepas aisladas en este trabajo. Éstas podrían estar ejerciendo un efecto perjudicial, como en el caso de los que son considerados fitopatógenos: *F. lateritium* (Vitale *et al.*, 2011) y *Curvularia* sp. (Kusai *et al.*, 2016); o un efecto benéfico, como en el caso de *Gibberella fujikuroi* que produce la hormona conocida como ácido giberélico, esencial para muchos procesos de desarrollo de las plantas (Binenbaum *et al.*, 2018); o de *Nigrospora sphaerica*, que produce un metabolito que tiene actividad contra los fitopatógenos *Phytophthora infestans* y *Phytophthora capsici* (Kim *et al.*, 2001), o de *Purpureocillium lilacinum* que ha mostrado buen potencial para el biocontrol de nematodos parásitos de plantas (Kiriga *et al.*, 2018), uno de los principales problemas causantes de la reducción en el rendimiento del cultivo del café (Mekete *et al.*, 2008).

Por otro lado, los hongos *Penicillium brasilianum* y *Penicillium citrinum* encontrados pudieran estar favoreciendo la degradación de las capas que

recubren al grano (piel, pulpa y mucilago), en el procesamiento del café, mediante la acción de enzimas microbianas que se ha propuesto desempeñan un papel en ello (Masoud y Jespersen, 2006; Silva *et al.*, 2008a). *P. citrinum* ha sido reportado como productor de celulasas (Vaishnav *et al.*, 2018) y *P. brasilianum* como productor de celulasas y pectinasas. *P. brasilianum* es además productor de diversos metabolitos secundarios con actividad antifúngica y antibacteriana, lo cual cabría considerar en el interés de desarrollar productos de biocontrol (Bazioli *et al.*, 2017).

Desde el punto de vista de seguridad alimentaria en cambio, es importante notar el aislamiento del hongo productor de aflatoxina, *Aspergillus flavus*. Si bien la contaminación con esta micotoxina es un aspecto que ha recibido menos atención que la contaminación con OTA, reportes de cepas aisladas de café para las que se ha probado la producción de aflatoxina (Batista *et al.*, 2003) y la detección directa de la misma en la matriz (Nakajima *et al.*, 1997) indican que es necesario también tenerla en consideración (Paterson *et al.*, 2014).

Con respecto a la OTA, dentro de los productores más relevantes: *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus niger* (Amézqueta *et al.*, 2012); sólo un aislado de la última especie fue encontrado (cepa Sec 4). *A. niger* tiene una distribución muy amplia en el ambiente y el porcentaje de cepas productoras de la micotoxina es usualmente bajo (Cabañes y Bragulat, 2018); no obstante, la producción ha sido demostrada para cepas aisladas de café en diversas ocasiones (Urbano *et al.*, 2001; Taniwaki *et al.*, 2003; Samson *et al.*, 2004; Suarez-Quiroz *et al.*, 2004). Debido a ello, la detección de este microorganismo es de relevancia y también lo es el hecho de haberlo encontrado únicamente en cerezas secas (Tabla 12), lo que puede implicar entonces que su aparición se debió probablemente a una contaminación post-cosecha.

## **9.6. Evaluación de la producción de ocratoxina A**

Dada la identificación y por tanto asociación de la cepa Sec 4 como probable productor de OTA se llevó a cabo, por HPLC, la evaluación de la producción de la micotoxina. Se siguió para ello el protocolo descrito en la sección 8.6.

De la inyección del estándar de OTA a cuatro diferentes concentraciones (10, 25, 50, 75 y 100 ng/mL) se obtuvieron las áreas correspondientes a los picos generados por la toxina en un tiempo de retención entre 7.298 y 7.44 min. Al graficar estos datos (área vs concentración) se generó una curva de calibración (Anexo 3) y la ecuación de la misma fue utilizada para el cálculo de la concentración de OTA en los extractos obtenidos a partir del cultivo (Tabla 15); en estos, la presencia de la toxina se observó con un pico a un tiempo de retención de 7.674 y 7.665 (primer y segunda extracción, respectivamente).

Tabla 15. OTA producida por la cepa Sec 4 en medio sólido

Extracción	Área	Concentración (µg OTA/kg de medio)
1	1,067,254	116.6
2	1,283,097	93.46

De esta forma se determinó que la cepa Sec 4 produce la toxina a una concentración de  $105.03 \pm 16.36$  µg OTA/kg de medio. El nivel de producción es, de acuerdo con este valor, superior al determinado para la mayoría de las cepas aisladas de café de México que reportó Ruellan en 2017 e inferior al determinado para cepas de Costa de Marfil analizadas también por Ruellan (2017) y Djossou *et al.* (2015).

## 9.7. Análisis de las comunidades microbianas por *metabarcoding*

### 9.7.1. Extracción de ADN

Los resultados de la extracción de ADN, que fue llevada a cabo para aplicar la técnica de *metabarcoding*, se muestran en la Tabla 16. En ésta se observa la concentración obtenida para las muestras de cerezas frescas (F1 y F2) y secas (S1 y S2) y la relación A260/280.

Tabla 16. ADN total extraído de las muestras de cerezas.

Muestra	Concentración de ADN (ng/µl)	A260/280
F1	158.8	1.88
F2	171.3	1.85
S1	59.4	1.74
S2	149.5	1.89

La proporción A260/280 permite hacer una estimación de la pureza del ADN en relación a su contaminación con proteínas y un valor de 1.8 se considera adecuado (Manchester, 1997); por tanto, la proporción obtenida para las cuatro muestras, alrededor de este número, indicó un buen estado de pureza. La concentración de ADN por otro lado, fue suficiente en todos los casos para llevar a cabo la preparación de librerías mediante la amplificación de la región V3-V4 del ADNr 16S y la región ITS2, lo que a su vez permitió proceder con la secuenciación de los amplicones en la plataforma MiSeq™ de Illumina.

### 9.7.2. Análisis general de secuencias

El número original de lecturas obtenidas de la plataforma MiSeq™ para cada muestra, por la secuenciación de la región V3-V4 del ADNr 16S y la región ITS2, se encontró en un rango de 360766 a 463740. Las secuencias de ADNr 16S tuvieron en su mayoría una longitud de 440-465 pb y las secuencias de ITS2 una longitud de 330-380 pb.

Las curvas de rarefacción (Figura 9), que se construyeron después del procesamiento inicial de secuencias (descrito en la metodología), permitieron determinar que la profundidad de la secuenciación fue adecuada para todas las muestras al observarse para éstas la aproximación a una asíntota horizontal conforme se incrementaron las lecturas.

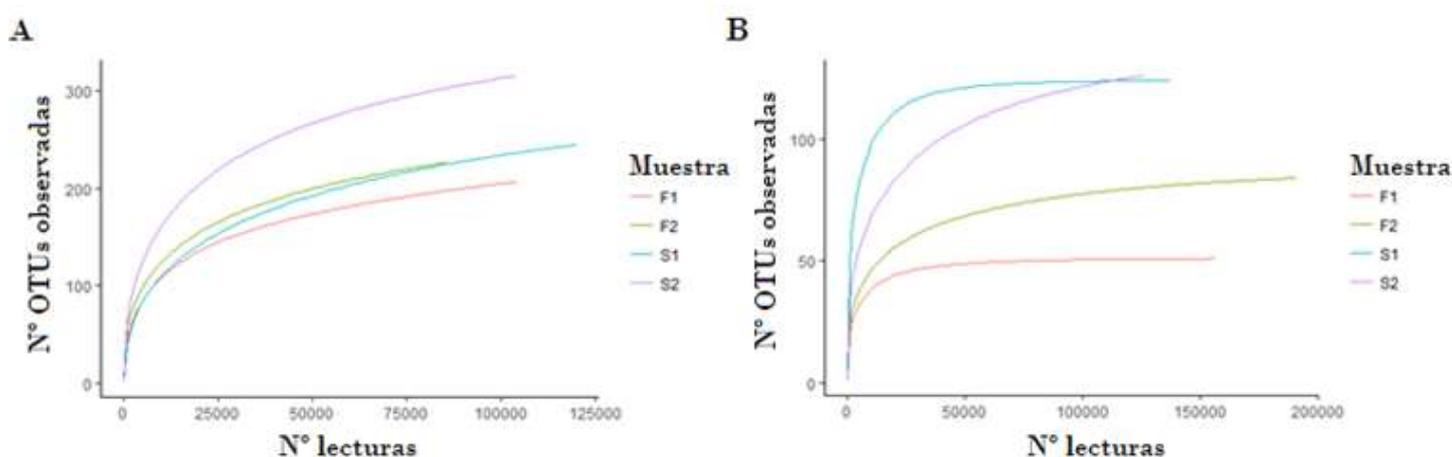


Figura 9. Curvas de rarefacción. A. Secuenciación de ADNr 16S. B. Secuenciación de ITS2.

Al final, después de la rarefacción y eliminación de OTUs con menos de dos secuencias, se conservaron 85696 secuencias de ADNr 16S y 125966 de ITS2

por cada muestra; distribuidas en total entre 481 y 191 OTUs, respectivamente (Figura 10).

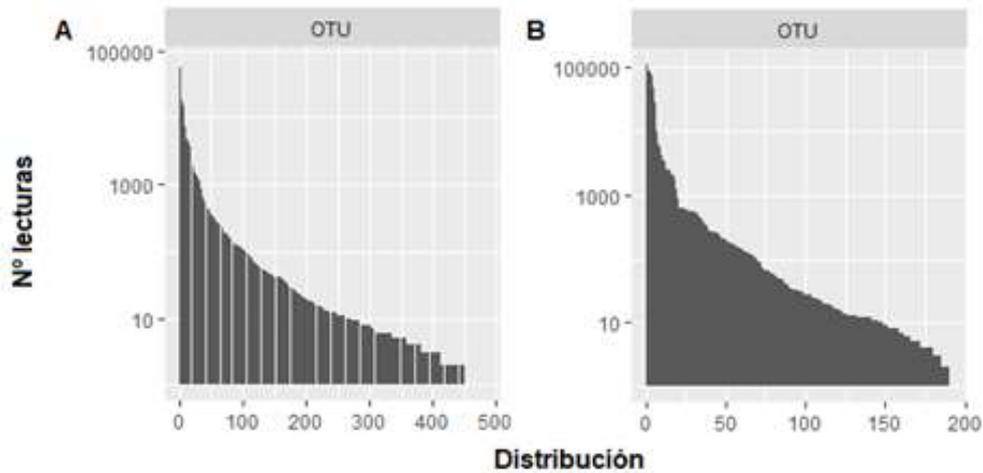


Figura 10. Distribución de lecturas entre OTUs. A. Lecturas de ADNr 16S. B. Lecturas de ITS2.

### 9.7.3.1. Análisis taxonómico

Las secuencias de ADNr 16S representativas de las OTUs fueron utilizadas para la asignación taxonómica de amplicones, mediante el uso de la base de datos SILVA. Lo anterior permitió realizar un análisis de la distribución de las comunidades bacterianas en distintos niveles taxonómicos.

A nivel de phylum (Figura 11), se observó una distribución entre Firmicutes y Proteobacteria. En cerezas frescas, la proporción de Proteobacteria (96%) fue mucho mayor que la de Firmicutes (4%), mientras que para cerezas secas la

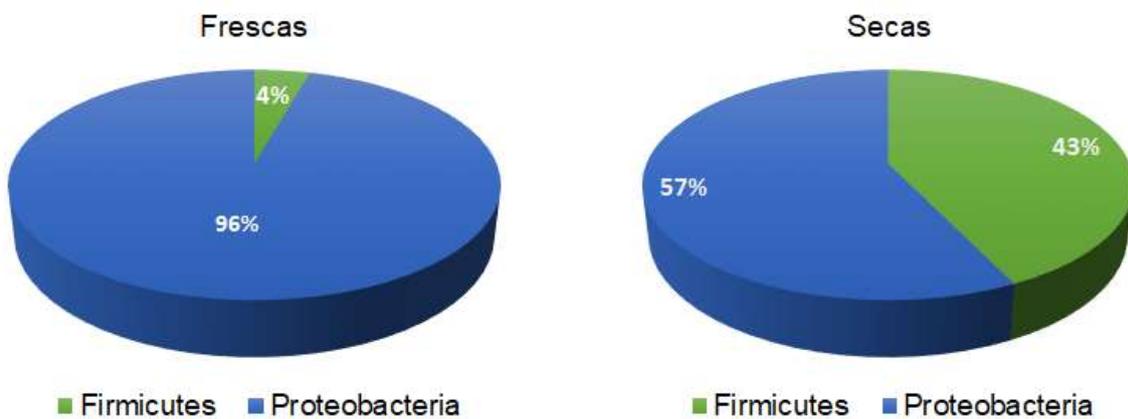


Figura 11. Distribución de comunidades bacterianas en cerezas frescas y secas.

Asignación taxonómica a nivel de phylum.

proporción de Proteobacteria fue del 57% y de Firmicutes del 43%. Estos resultados permitieron observar la abundancia del phylum Proteobacteria; además de una diferente distribución de las poblaciones bacterianas como consecuencia probable del proceso de secado.

El phylum Proteobacteria fue representado mayoritariamente por las familias Acetobacteraceae y Enterobacteriaceae, la primera de ellas incluye un grupo de bacterias que es raramente aislado del café (Sengun, 2016) pero que se ha detectado también en abundancia en cerezas frescas y en su procesamiento por método seco con la técnica de *metabarcoding* (De Bruyn *et al.*, 2017); su hallazgo entonces es probablemente favorecido por el uso de este método independiente del cultivo. La familia Enterobacteriaceae, en cambio, es comúnmente encontrada tanto por aislamiento (Silva *et al.* 2008a) como por métodos independientes del cultivo (Vilela *et al.*, 2010; Hamdouche *et al.*, 2016) y su predominancia, especialmente en cerezas frescas, concuerda también con lo reportado por De Bruyn *et al.* (2017) quienes, por *metabarcoding*, detectaron a esta familia entre las OTUs bacterianas de mayor abundancia relativa en cerezas recién cosechadas y observaron posteriormente la disminución de la misma durante el procesamiento por método seco.

En cerezas secas, la mayor proporción del phylum Firmicutes podría estar relacionada con la fermentación microbiana natural que ocurre en el procesamiento del café por método seco (Silva *et al.*, 2000). Este phylum contiene a las bacterias ácido lácticas (BAL), para las cuales se ha propuesto su papel en la fermentación (Avallone *et al.*, 2001; Evangelista *et al.*, 2015, Neto *et al.*, 2018), y su abundancia fue observada en las dos muestras de cerezas secas, protagonizada específicamente por el género *Weissella* (Figura 12).

En la Figura 12 se presenta la abundancia relativa de los 21 géneros que fueron representados con mayor predominancia entre las muestras. Estos comprenden varios de los que son frecuentemente reportados en la matriz estudiada, entre ellos: *Weissella*, *Pantoea*, *Erwinia*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Bacillus* (Vilela *et al.*, 2010; Evangelista *et al.*, 2015; Neto *et al.*, 2018); no es el caso en cambio del género *Gluconobacter*, encontrado en cerezas frescas, y cuya presencia pudiera estar ligada a la microbiota de la

planta, puesto que este microorganismo ha sido aislado de la raíz de cafetales cultivados en México (Fuentes-Ramírez *et al.*, 2001).

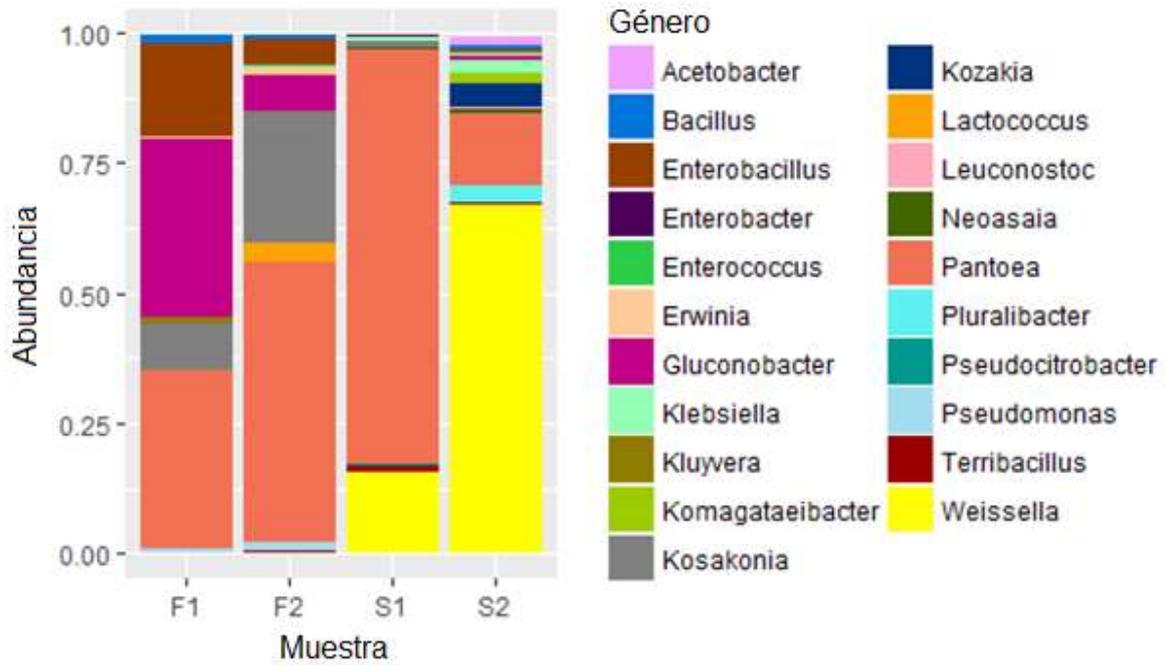


Figura 12. Distribución de comunidades bacterianas en cerezas frescas (F1 y F2) y secas (S1 y S2). Asignación taxonómica a nivel de género.

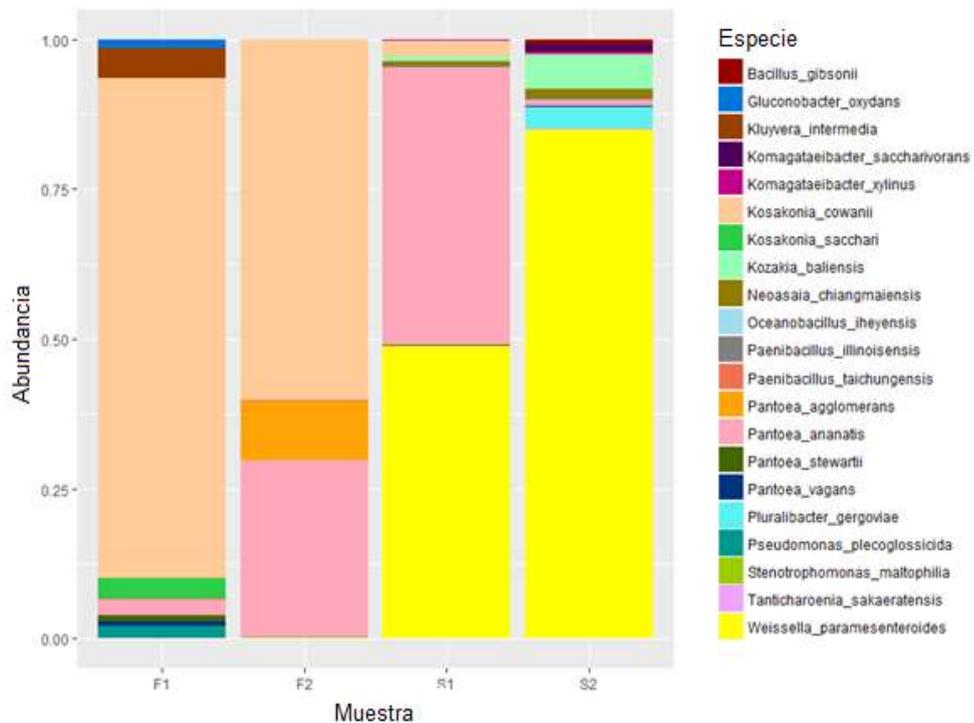


Figura 13. Distribución de comunidades bacterianas en cerezas frescas (F1 y F2) y secas (S1 y S2). Asignación taxonómica a nivel de especie.

Con la finalidad de profundizar en el análisis, en la Figura 13 se presenta la abundancia relativa de las 21 especies representadas con mayor predominancia entre las secuencias para las que la asignación taxonómica fue posible hasta ese nivel. Entre ellas se detectó a *Kosakonia cowanii*, aislado originalmente como patógeno humano pero que ha sido encontrado también frecuentemente en plantas y suelo (Yang *et al.*, 2018); su presencia en las cerezas podría estar relacionada con cualquiera de estas fuentes. *Pantoea ananatis*, por otro lado, ha sido aislada como endófito de plantas de café y es un microorganismo que ha demostrado tener propiedades antibacterianas y antifúngicas que pudieran ser explotadas para control biológico (Coutinho y Venter, 2009); igual que *Pantoea agglomerans*, que se ha usado para biocontrol de hongos del género *Penicillium* (Morales *et al.*, 2008). La predominancia de ésta última entre las comunidades bacterianas del café, además, ha sido observada por diversos autores (Vilela *et al.*, 2010; Nasanit y Satyawut, 2015) y en este estudio por métodos dependientes e independientes del cultivo.

La detección en abundancia de *Weissella paramesenteroides* es también interesante desde la perspectiva de control biológico. Para este microorganismo se ha reportado la capacidad antifúngica contra hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium* y entre ellos contra *A. niger* (Ndagano *et al.*, 2011), potencial productor de OTA (Suárez-Quiroz *et al.*, 2004). Esta bacteria láctica podría entonces constituir una alternativa para el biocontrol indirecto de la presencia de la micotoxina.

### **9.7.3. Análisis de las comunidades bacterianas**

#### **9.7.3.2. Análisis de diversidad alfa ( $\alpha$ ) en cerezas frescas y secas**

Como medidas de la diversidad  $\alpha$ , se presentan en la Figura 14 los diagramas de caja del número de OTUs observadas (riqueza) y los índices ACE y Shannon.

El número de OTUs observadas, o riqueza, es la métrica más simple y más aplicada para representar diversidad (Morris *et al.*, 2014). ACE por otra parte, es un estimador de riqueza que agrega un factor de corrección al número de OTUs observadas (Hughes *et al.*, 2001) y usa la incidencia de aquéllas con baja frecuencia, las que se detectaron entre una y diez veces (Hill *et al.*, 2003). Estos

dos, No. OTUs y ACE, se observaron más altos para las muestras de cerezas secas, en conjunto, que para las muestras de cerezas frescas.

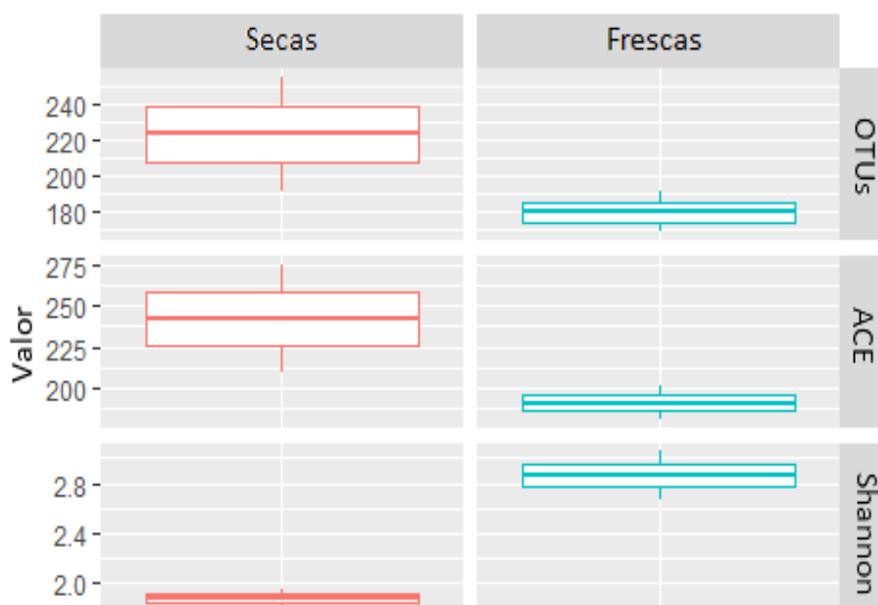


Figura 14. Diversidad  $\alpha$ : N° OTUs e índices ACE y Shannon (Comunidades bacterianas).

El índice Shannon, en cambio, que es un índice compuesto que inherentemente contiene componentes de riqueza y uniformidad (regularidad en la distribución de las OTUs) y es preferido cuando el objetivo es categorizar el nivel de diversidad (Morris *et al.*, 2014), se observó más alto para cerezas frescas que para secas; de este último podría parecer, entonces, que hay una mayor diversidad bacteriana en frescas. Considerando esto cierto, una mayor diversidad podría estar relacionada a que determinadas condiciones favorecieron el desarrollo del grupo de bacterias en cerezas frescas sobre secas y una de ellas pudiera ser la actividad de agua ( $a_w$ ) más alta. Se sabe que el crecimiento de la mayoría de las bacterias se inhibe a un  $a_w$  de 0.91 (Podolak y Black, 2017) y como consecuencia del proceso de secado de las cerezas se alcanzan valores alrededor de 0.6 (Silva *et al.*, 2008a).

Mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon o Mann-Whitney-Wilcoxon (Tabla 17) no se observó diferencia estadísticamente significativa en las medidas de diversidad alfa para cerezas frescas y secas. Sin embargo, este resultado debe tomarse con reserva, considerando que por el bajo número de muestras del experimento la potencia de la prueba es baja.

Tabla 17. Prueba Mann-Whitney-Wilcoxon para medidas de diversidad alfa en cerezas frescas y secas (Comunidades bacterianas).

	<b>OTUs</b>	<b>ACE</b>	<b>Shannon</b>
Prueba	Bilateral	Bilateral	Bilateral
Valor p	0.4142	0.3333	0.3333

### 9.7.3.2 Análisis de diversidad beta ( $\beta$ )

Para revelar la diferencia de las comunidades bacterianas entre cerezas frescas y secas se llevó a cabo una medición de diversidad  $\beta$ . Se hizo un análisis de agrupamiento jerárquico basado en el índice de disimilitud de Bray-Curtis.

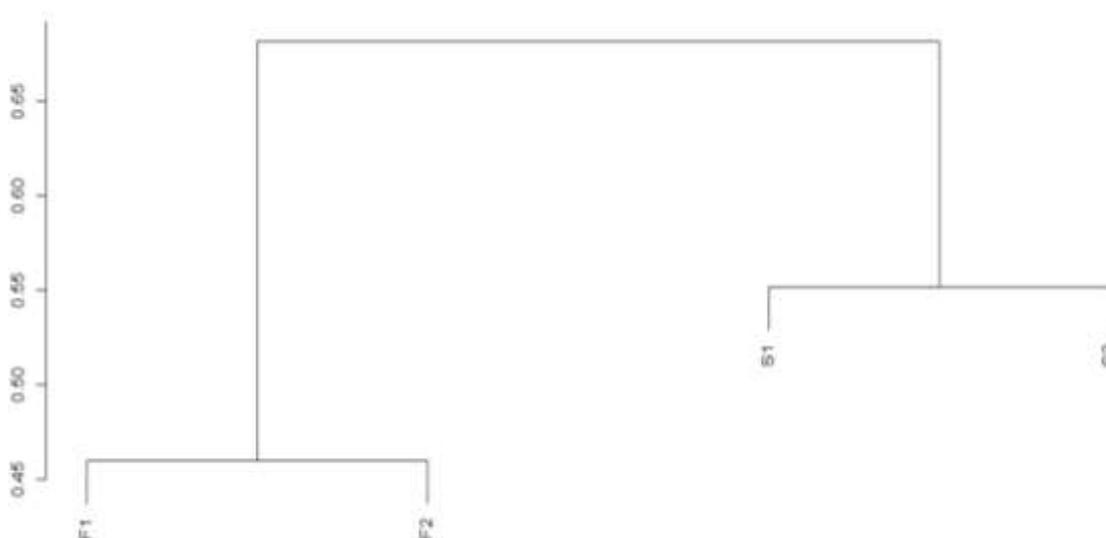


Figura 15. Dendrograma del agrupamiento de muestras por la similitud de sus comunidades bacterianas. Basado en el índice de disimilitud de Bray-Curtis (Método UPGMA).

Del dendrograma obtenido (Figura 15) fue posible observar el agrupamiento de las muestras en dos clústeres distintos, las muestras F1 y F2 en un grupo y las muestras S1 y S2 en otro grupo, lo que indicó una mayor similitud para las comunidades bacterianas de cerezas frescas por un lado y de cerezas secas por otro.

Mediante la prueba de PERMANOVA (basada en la disimilitud de Bray-Curtis) no se detectó diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.3333$ ) en la composición de las comunidades de cerezas frescas y secas.

## 9.7.4. Análisis de las comunidades fúngicas

### 9.7.4.1. Análisis taxonómico

Las secuencias de la región ITS2, representativas de las OTUs, fueron utilizadas para la asignación taxonómica de amplicones mediante el uso de la base de datos UNITE. Lo anterior permitió realizar un análisis de la distribución de las comunidades fúngicas en distintos niveles taxonómicos

A nivel de phylum se determinó la prevalencia del phylum Ascomycota en las cerezas frescas y secas, con una mayor abundancia en secas. En éstas el phylum Basidiomycota se encontró en menor proporción y Mucoromycota no fue detectado; lo que sugiere, igual que como se observó en el caso de bacterias, una diferente distribución de las poblaciones como consecuencia probable del proceso de secado (Figura 16).

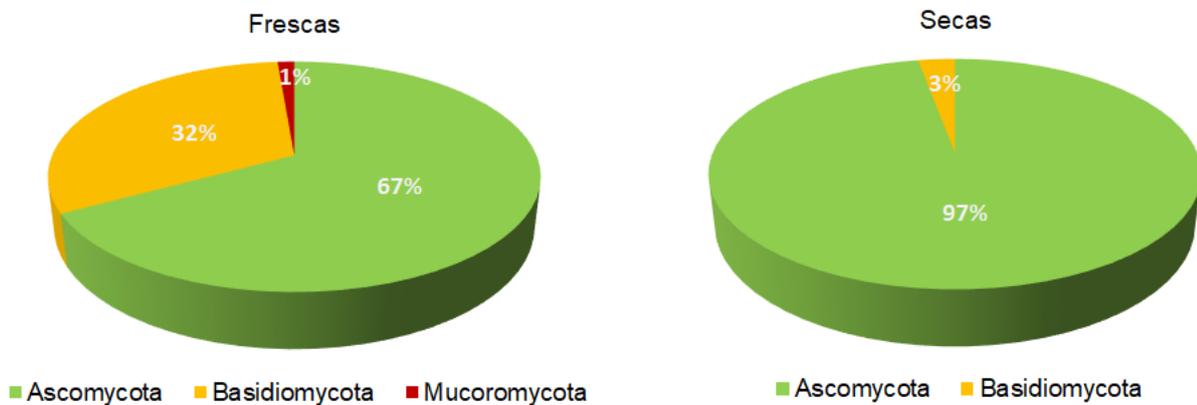


Figura 16. Distribución de comunidades fúngicas en cerezas frescas y secas.

*Asignación taxonómica a nivel de phylum.*

La ausencia del phylum Mucoromycota en cerezas secas puede estar relacionada a un proceso de sucesión; este phylum contiene a los mucorales, que en el decaimiento vegetal se ha visto actúan como colonizadores primarios y son seguidos del phylum Ascomycota como colonizadores secundarios (Sharma, 2007); estos últimos entonces pudieron haber sustituido a los primeros.

El phylum Basidiomycota, por su parte, estuvo representado en cerezas frescas mayoritariamente por la familia de levaduras Trichosporonaceae, género

*Trichosporon*, que se observó en mucha menor proporción en cerezas secas, lo que influyó en la diferente distribución de los phyla (Figura 17).

Además de *Trichosporon* se detectó, entre los 21 géneros de hongos representados con mayor abundancia relativa (Figura 17), una gran proporción de levaduras pertenecientes a los géneros: *Candida*, *Hanseniaspora*, *Meyerozyma* y *Pichia*; todos ellos encontrados previamente en diferentes trabajos como parte de la microbiota de cerezas de café y su procesamiento por medio de aislamiento (Silva *et al.*, 2000; Avallone *et al.*, 2001; Masoud *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008a; Vilela *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2014; Evangelista *et al.*, 2015) y métodos independientes del cultivo (Masoud *et al.*, 2004; Evangelista *et al.*, 2015; De Bruyn *et al.*, 2017).

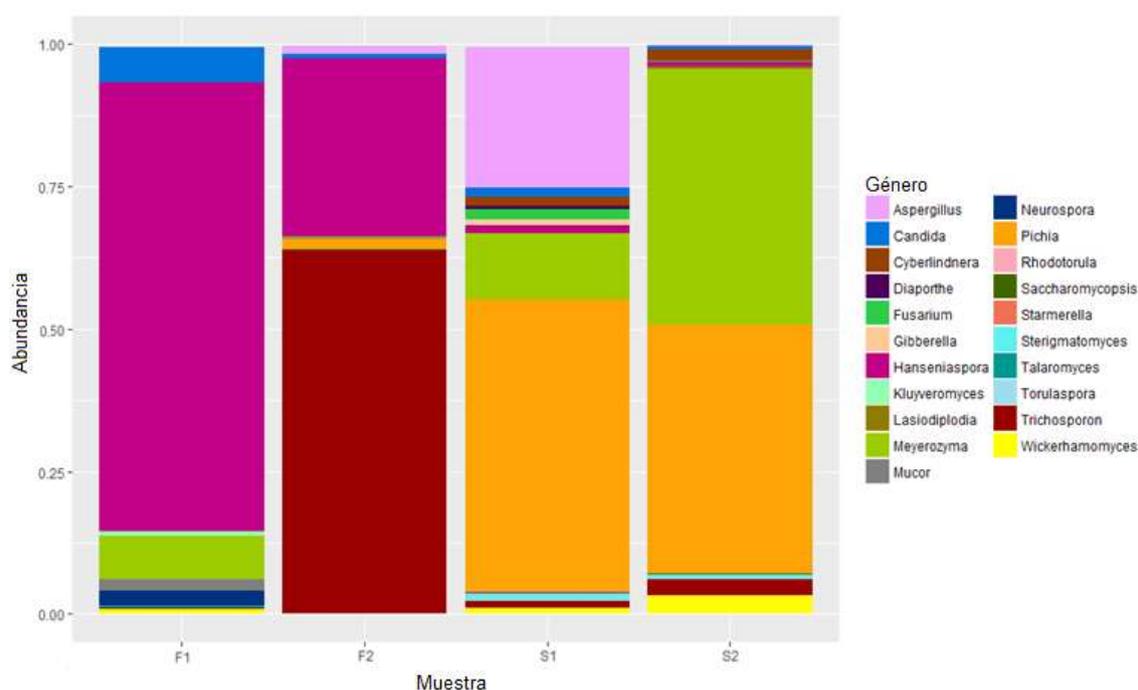


Figura 17. Distribución de comunidades fúngicas en cerezas frescas (F1 y F2) y secas (S1 y S2). Asignación taxonómica a nivel de género.

Para la mayoría de las secuencias asociadas a los diferentes géneros representados en la Figura 17, se logró hacer la asignación taxonómica hasta nivel de especie y en la Figura 18 se presentan aquellas 21 de mayor abundancia relativa. Los géneros de levaduras anteriormente mencionados fueron representados predominantemente por *Candida quercitrusa*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Trichosporon asahii*, *Pichia sporocuriosa* y *Meyerozyma caribbica*.

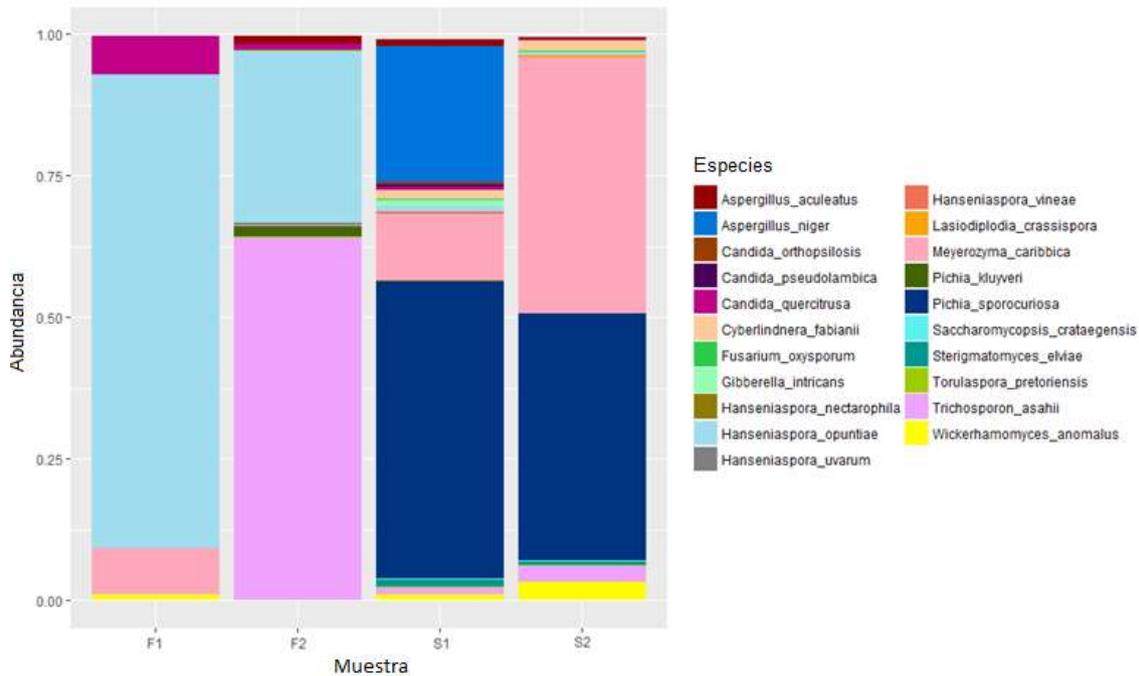


Figura 18. Distribución de comunidades fúngicas en cerezas frescas (F1 y F2) y secas (S1 y S2). Asignación taxonómica a nivel de especie.

*Trichosporon asahii* es un hongo que, aunque puede encontrarse formando parte de la microbiota normal de la piel y el aparato respiratorio, su hábitat también es el suelo, agua y excreciones animales (Pulpyllo Ruiz *et al.*, 2001), por lo que su hallazgo en las cerezas pudo estar relacionado con cualquiera de estas posibles fuentes. *P. sporocuriosa* ha sido aislada de fruta tropical y de la fermentación del vino en España (Kurtzman, 2011). *C. quercitrusa* ha sido reportada como parte del procesamiento del café por Pereira *et al.* (2014), Evangelista *et al.* (2015), Hamdouche *et al.* (2016) y De Bruyn *et al.* (2017); igual que *H. opuntiae*, hallada en abundancia por Pereira *et al.* (2014), y *M. caribbica*, reportada por Evangelista *et al.* (2015) como la levadura de mayor prevalencia en cerezas de café. Para esta última levadura y los géneros *Pichia* y *Candida* se ha propuesto además su importancia en el procesamiento del café, con un probable papel en la degradación del mucilago por su actividad pectinolítica (Masoud y Jespersen, 2006; Silva *et al.*, 2013).

Además de la dominancia de levaduras, se detectó en cerezas secas la abundancia de *A. niger*, que no se encontró en cerezas frescas. Lo anterior fue determinado también mediante el aislamiento y sugirió nuevamente una probable contaminación post-cosecha con esta especie que puede contener

cepas productoras de la OTA (Paterson *et al.*, 2014). Sin embargo, entre las especies que son consideradas como los productores más relevantes de esta micotoxina: *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* y *A. niger* (Amézqueta *et al.*, 2012); únicamente el último ya mencionado fue detectado en este estudio. Lo anterior puede observarse en la Figura 19, en la que se presenta un árbol filogenético construido con todas las secuencias asociadas a los principales géneros productores de micotoxinas, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Paterson *et al.*, 2014), y su distribución entre las muestras de cerezas frescas y secas.

La baja incidencia de hongos ocratoxigénicos observada pudiera estar relacionada con la presencia de microorganismos antagonistas que naturalmente ejercieron un control; tal podría ser el caso de las levaduras *Pichia kluyveri* y *Hanseniaspora uvarum*, que fueron encontradas en abundancia y que han demostrado capacidad de inhibición sobre el hongo *A. ochraceus* (Masoud *et al.*, 2005).

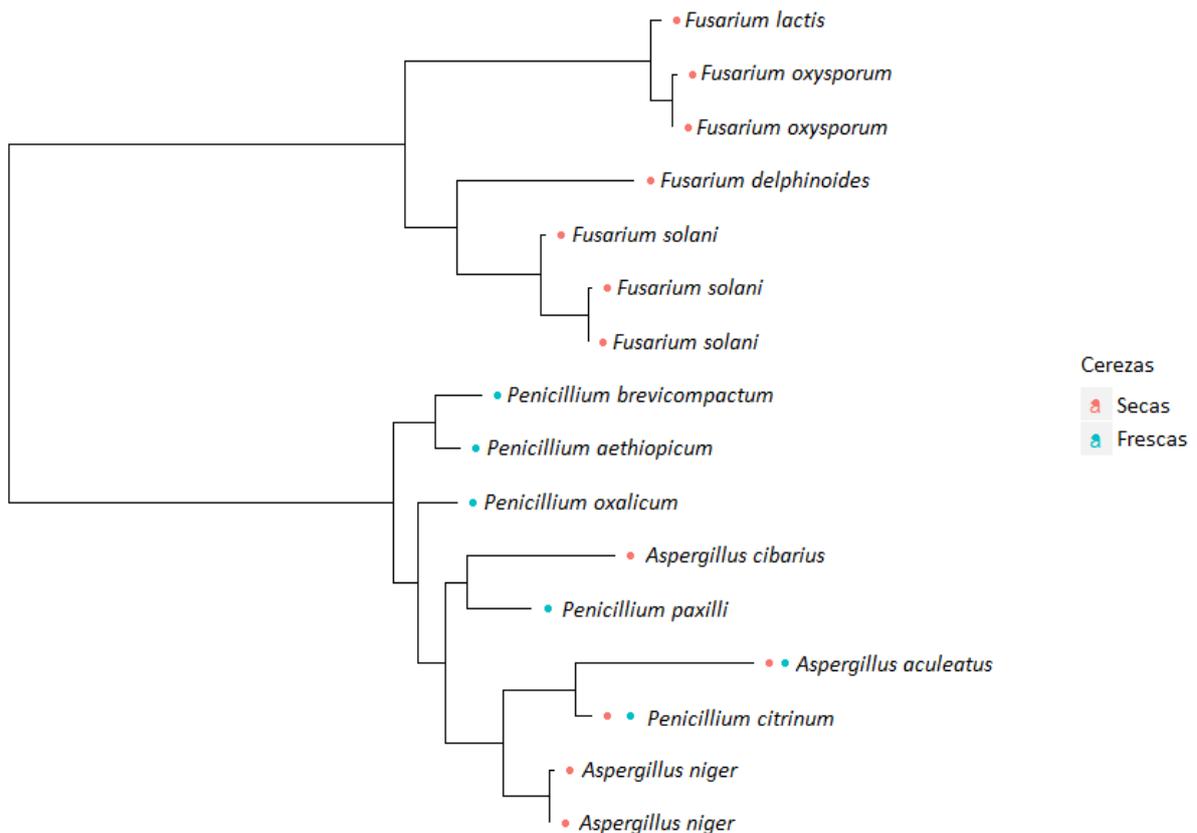


Figura 19. Árbol filogenético basado en las secuencias de los principales géneros productores de micotoxinas: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*.

Si bien la micotoxina de mayor importancia en el café es la OTA, actualmente se espera que otras que se encuentran con menor frecuencia podrían convertirse en un problema en varias regiones geográficas (Paterson *et al.*, 2014). Es el caso de los tricotecenos, las fumonisinas y las emergentes beauvericina y eniانتinas, que han sido detectadas como contaminantes en esta matriz y que son producidas por ciertas especies del género *Fusarium* (García-Moraleja *et al.*, 2015). Las especies detectadas en este trabajo por *metabarcoding* (Figura 19), sin embargo, no correspondieron a las productoras más importantes de tales toxinas (Sifou *et al.*, 2011; Ferrigo *et al.*, 2016).

#### 9.7.4.2. Análisis de diversidad alfa ( $\alpha$ ) en cerezas frescas y secas

Como medidas de la diversidad  $\alpha$ , se presentan en la Figura 20 los diagramas de caja del número de OTUs observadas, los índices ACE y Shannon.

La riqueza, número de OTUs observadas, el estimador ACE y el índice Shannon se observaron más altos para las cerezas secas; lo que indicaría en todos los casos una mayor diversidad fúngica que en frescas. Este resultado pudiera estar relacionado con lo encontrado por aislamiento (sección 9.1), mediante el cual se determinaron cuentas más altas (UFC/g de cerezas) de este grupo microbiano en las cerezas secas que en las frescas.



Figura 20. Diversidad  $\alpha$ : N° OTUs e índices ACE y Shannon (Comunidades fúngicas).

Por otro lado, considerando el índice Shannon únicamente, lo observado para la diversidad de hongos es contrario a lo encontrado respecto a la diversidad de bacterias, donde el índice fue más alto para cerezas frescas que para secas. Lo anterior pudiera deberse a las diferentes condiciones presentes en las dos matrices. Como se mencionó en la sección 9.7.3.2, con el proceso de secado se alcanzan valores de actividad de agua ( $a_w$ ) menores a 0.91, condición en la que la mayoría de las bacterias no crecen; los hongos en cambio, tienen una mayor tolerancia a niveles más bajos de  $a_w$  pudiendo desarrollarse hasta un mínimo de 0.61 y aunque son capaces también de crecer a valores de  $a_w$  altos, en ese tipo de ambientes las bacterias son altamente competitivas (Beuchat, 1983).

Mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon o Mann-Whitney-Wilcoxon (Tabla 18), no se observó tampoco diferencia estadísticamente significativa entre las medidas de diversidad  $\alpha$  en cerezas frescas y secas. Sin embargo, es importante comentar de nuevo que este resultado debe tomarse con reserva.

*Tabla 18. Prueba Mann-Whitney-Wilcoxon para medidas de diversidad alfa en cerezas frescas y secas (Comunidades fúngicas).*

	<b>OTUs</b>	<b>ACE</b>	<b>Shannon</b>
Prueba	Bilateral	Bilateral	Bilateral
Valor p	0.3333	0.3333	0.6666

#### **9.7.4.3 Análisis de diversidad beta ( $\beta$ )**

Para revelar la diferencia de las comunidades fúngicas entre cerezas frescas y secas se llevó a cabo una medición de diversidad  $\beta$ . Nuevamente, se hizo un análisis de agrupamiento jerárquico basado en el índice de disimilitud de Bray-Curtis, y del dendrograma obtenido (Figura 21) se observó el agrupamiento de las muestras de cerezas secas, lo que indicó una mayor similitud entre las comunidades de éstas, con respecto a las de cerezas frescas. Para estas últimas se observó una mayor diferencia en sus comunidades, al presentarse separadas en el dendrograma y no agrupadas en un mismo clúster.



*Figura 21. Dendrograma del agrupamiento de muestras por la similitud de sus comunidades fúngicas. Basado en el índice de disimilitud de Bray-Curtis (Método UPGMA).*

Mediante la prueba de PERMANOVA (basada en la disimilitud de Bray-Curtis) no logró detectarse diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.3333$ ) en la composición de las comunidades fúngicas de cerezas frescas y cerezas secas.

## 10. Conclusiones

- Mediante el método dependiente del cultivo se observó, dentro del grupo de bacterias aisladas en anaerobiosis, la abundancia de bacterias Gram-negativas, entre las que se logró identificar al género *Klebsiella* y a la especie *Pantoea agglomerans*. Entre los hongos, se determinó la presencia de diferentes géneros y especies que en algunos casos no fueron detectados por el método independiente del cultivo y se observó, únicamente en cerezas secas, la contaminación con *A. niger*, para el que además se demostró la producción de OTA por HPLC ( $105.03 \pm 16.36$   $\mu\text{g}$  OTA/kg de medio).
- Mediante el método independiente del cultivo, *metabarcoding*, se observaron algunas coincidencias con los resultados del aislamiento: la detección de *Klebsiella* y *P. agglomerans*, entre las bacterias representadas con mayor abundancia, y la contaminación con *A. niger*, exclusivamente en cerezas secas. Esta técnica sin embargo, permitió realizar un análisis más profundo de la diversidad microbiana presente y evidenciar la diferencia en las poblaciones de cerezas frescas y secas. Entre las OTUs bacterianas se determinó la abundancia de enterobacterias, con mayor proporción en cerezas frescas, y entre las OTUs fúngicas la abundancia de levaduras en los dos puntos del procesamiento, con la diferencia de una mayor proporción de *Aspergillus* en cerezas secas. Por otro lado, entre las OTUs de bacterias y hongos filamentosos específicamente, se detectaron también muchos géneros y especies que no fueron hallados por aislamiento.
- El aislamiento y uso de la técnica *metabarcoding* en conjunto permitió realizar una caracterización complementaria de las comunidades microbianas presentes en las cerezas frescas y secas de café de Tabasco y determinar de esta forma la presencia de microorganismos con un posible papel en el procesamiento, que representan un problema de contaminación o que pudieran ser de utilidad para el desarrollo de productos de biocontrol.

## **11. Perspectivas**

Como complemento a este estudio sería interesante caracterizar las poblaciones microbianas en un mayor número de muestras de cerezas y/o granos de la misma región del país u otras regiones cafetaleras; así como en un mayor número de puntos del procesamiento para tener una idea más clara de la diversidad microbiana presente a lo largo de la cadena de producción de café en México.

Sería interesante, también, identificar las levaduras presentes mediante el aislamiento de este grupo microbiano ya que como se observó en este trabajo, la información obtenida de métodos dependientes e independientes de cultivo es en muchas ocasiones complementaria.

Para un gran número de microorganismos detectados en el presente estudio se propuso su posible papel en el procesamiento del café o el potencial para su uso en biocontrol; sería entonces importante realizar experimentos que corroboren su funcionalidad en cualquiera de los dos aspectos.

## 12. Referencias

- Al-Areqi, A. H. N. A., Chliyeh, M., Touati, J., Outcoumit, A., Sghir, F., Touhami, A. O., Benkirane, R., Douira, A. (2015). Effect of endomycorrhizae on decline of the coffee plants (*Coffea arabica*) caused by *Fusarium solani*. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, 4 (2), 397-404.
- Amézqueta, S., Schorr-Galindo, S., Murillo-Arbizu, M., González-Peñas, E., López de Cerain, A., Guiraud, J. P. (2012). OTA-producing fungi in foodstuffs: a review. *Food Control*, 26, 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.04>
- Andersen, K. S. S., Kirkegaard, R. H., Karst, S. M., Albertsen, M. (2018). Ampvis2: an R package to analyse and visualise 16S rRNA amplicon data. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/299537>
- Arroyo-Manzanares, N., Huertas-Perez J. F., Gámiz-Gracia, L., García-Campaña, A. M. (2014). Control de micotoxinas en alimentos. *Boletín Graseqa*, 7, 16-31.
- Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, J., Olguin, E., Guiraud, J. (2001). Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. *Current Microbiology*, 42, 252–256.
- Avallone, S., Brillouet, J. M., Guyot, B., Olguin, E., Guiraud, J. P. (2002). Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(2), 191–198. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00556.x>
- Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Prado, G., Schwan, R. F., Wheals, A. E. (2003). Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). *International Journal of Food Microbiology*, 85(3), 293–300. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00539-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00539-1)
- Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Silva, C. F., Cirillo, M., Varga, E. A., Schwan, R. F. (2009). Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. *Food Control*, 20(9), 784-790. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.10.003>
- Bazioli, J. M., Amaral, L. D. S., Fill, T. P., Rodrigues-Filho, E. (2017). Insights into *Penicillium brasiliense* secondary metabolism and its biotechnological potential. *Molecules*, 22(6), 858. <https://doi.org/10.3390/molecules22060858>
- Benites, A. J., Fernandes, M., Boletto, A. R., Azevedo, S., Silva, S., Leitão, A. L. (2017). Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples commercialized in Portugal. *Food Control*, 73, 1223–1228. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2016.10.037>

- Beuchat, L. R. (1983). Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeasts and molds. *Journal of Food Protection*, 46 (2), 135-141. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-46.2.135>
- Binenbaum, J., Weinstain, R., Shani, E. (2018). Gibberellin localization and transport in plants. *Trends in Plant Science*, 23(5), 410–421. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2018.02.005>
- Bohle, H. M., Gabaldón, T. (2012). Selection of marker genes using whole-genome DNA polymorphism analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 8, 161–169.
- Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Cabañes, F. J. (2001). An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*, 71(2-3), 139-144. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00581-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00581-5)
- Brera, C., De Santis, B., Debegnach, F., Miraglia, M. (2008). Chapter 12 mycotoxins. En Y. Picó (Ed.), *Comprehensive Analytical Chemistry* (pp. 363–427). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(08\)00012-3](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(08)00012-3)
- Cabañes, F. J., Bragulat, M. R. (2018). Black aspergilli and ochratoxin A-producing species in foods. *Current Opinion in Food Science*, 23, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.006>
- Cardinali, G., Corte, L., Robert, V. (2017). Next Generation Sequencing: problems and opportunities for next generation studies of microbial communities in food and food industry. *Current Opinion in Food Science*, 17, 62–67. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2017.09.009>
- CEFP (2001). El mercado del café en México [pdf]. Recuperado de: <http://www.cefp.gob.mx/intr/edocumentos/pdf/cefp/cefp0542001.pdf>
- Coppock, R. W., Christian R. G. (2007). Chapter 75 – Aflatoxins. En R.C. Gupta (Ed.), *Veterinary Toxicology* (pp. 939-950). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012370467-2/50172-3>
- Coutinho, T. A., Venter, S. N. (2009). *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 325–335. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00542.x>
- Cruaud, P., Rasplus, J.Y., Rodriguez, L. J., Cruaud, A. (2017). High-throughput sequencing of multiple amplicons for barcoding and integrative taxonomy. *Scientific Reports*, 7, 41948–41948. <https://doi.org/10.1038/srep41948>
- De Bruyn, F., Zhang, S. J., Pothakos, V., Torres, J., Lambot, C., Moroni, A. V., Callanan, M., Sybesma, W., Weckx, S., De Vuyst, L. (2017). Exploring the impacts of postharvest processing on the microbiota and metabolite profiles during green coffee bean production. *Applied and Environmental Microbiology*, 83, 2398–2414. <https://doi.org/10.1128/AEM.02398-16>

- De Ruyck, K., De Boevre, M., Huybrechts, I., De Saeger, S. (2015). Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: short review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 766, 32–41. <https://doi.org/10.1016/J.MRREV.2015.07.003>
- Djossou, O., Perraud-Gaime, I., Mirleau, F. L., Rodriguez-Serrano, G., Karou, G., Niamke, S., Roussos, S. (2011). Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. *Anaerobe*, 17(6), 267-272. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.03.006>
- Djossou, O., Roussos, S., Perraud-Gaime, I., Macarie, H., Germain, K., Labrousse, Y. (2015). Fungal population, including ochratoxin A producing *Aspergillus* section Nigri strains from Ivory Coast coffee bean. *Academic Journals*, 10(26), 2576-2589. <https://doi.org/10.5897/AJAR2015.9494>
- Dolci, P., Alessandria, V., Rantsiou, K., Coccolin, L. (2015). Advanced methods for the identification, enumeration, and characterization of microorganisms in fermented foods. En W. Holzapfel (Ed.), *Advances in fermented foods and beverages: Improving Quality, Technologies and Health Benefits* (pp. 157-169). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-015-6.00007-4>
- Durand, N., El Sheikha, A. F., Suarez-Quiros, M., Gonzales-Rios, O., Nganou, N. D., Fontana-Tachon, A., Montet, D. (2013). Application of PCR-DGGE to the study of dynamics and biodiversity of yeasts and potentially OTA producing fungi during coffee processing. *Food Control*, 34, 466-477. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.05.017>
- Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 297–314. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2003.11.006>
- Evangelista, S. R., Miguel, M. G. da C. P., Silva, C. F., Pinheiro, A. C. M., Schwan, R. F. (2015). Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.008>
- FAO (2006). Enhancement of coffee quality through the prevention of mould formation. Final Technical Report [pdf]. Recuperado de: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/agms/pdf/coffee/FMR2006.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agms/pdf/coffee/FMR2006.pdf)
- Ferrigo, D., Raiola, A., Causin, R. (2016). *Fusarium* toxins in cereals: occurrence, legislation, factors promoting the appearance and their management. *Molecules*, 21(5), 627. <https://doi.org/10.3390/molecules21050627>
- FIRA (2017). Panorama agroalimentario. Café 2017 [pdf]. Recuperado de: <https://www.fira.gob.mx/InvYEvalEcon/EvaluacionIF>

- Figuroa-Hernández, E., Pérez-Soto, F., Godínez-Montoya, L. (2015). *La producción y el consumo del café*. España: ECORFAN.
- Fraeyman, S., Meyer, E., Devreese, M., Antonissen, G., Demeyere, K., Haesebrouck, F., Croubels, S. (2018). Comparative in vitro cytotoxicity of the emerging *Fusarium* mycotoxins beauvericin and enniatins to porcine intestinal epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 566–572. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2018.09.053>
- Fuentes-Ramírez, L. E., Bustillos-Cristales, R., Tapia-Hernández, A., Jiménez-Salgado, T., Wang, E. T., Martínez-Romero, E., Caballero-Mellado, J. (2001). Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(4), 1305–1314. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-4-1305>
- García-Moraleja, A., Font, G., Mañes, J., Ferrer, E. (2015). Simultaneous determination of mycotoxin in commercial coffee. *Food Control*, 57, 282–292. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2015.04.031>
- 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*, 69, 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.025>
- Ghosh, A., Bhadury, P. (2019). Methods of assessment of microbial diversity in natural environments. En S. Das, H. R. Dash (Eds.), *Microbial Diversity in the Genomic Era* (pp. 3-14). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00001-0>
- Hamdouche, Y., Meile, J. C., Nganou, D. N., Durand, N., Teyssier, C., Montet, D. (2016). Discrimination of post-harvest coffee processing methods by microbial ecology analyses. *Food Control*, 65, 112–120. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2016.01.022>
- Hill, T. C., Walsh, K. A., Harris, J. A., Moffett, B. F. (2003). Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(1), 1-11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01040.x>
- Huch, M., Franz, C. M. A. P. (2015). Coffee: fermentation and microbiota. En W. Holzapfel (Ed.), *Advances in Fermented Foods and Beverages: Improving Quality, Technologies and Health Benefits* (pp. 501-513) Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-015-6.00021-9>
- Hughes JB., Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannan BJ. (2001). Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4399-406. <https://doi.org/10.1128/aem.67.10.4399-4406.2001>

- ICO-International Coffee Organization (sin fecha). Procesamiento de campo. Recuperado de: [http://www.ico.org/ES/field\\_processing.asp](http://www.ico.org/ES/field_processing.asp)
- Illumina (2013). 16S metagenomic sequencing library preparation. Recuperado de: [https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf)
- Illumina (2015). An introduction to next-generation sequencing technology. Recuperado de: [https://www.illumina.com/documents/products/illumina\\_sequencing\\_introduction.pdf](https://www.illumina.com/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf)
- Illumina (2016). Illumina sequencing by synthesis (now in 3D). Recuperado de: <https://sapac.illumina.com/company/video-hub/fCd6B5HRaZ8.html>
- James, R. S., Ray, J., Tan, Y. P., Shivas, R. G. (2014). *Colletotrichum siamense*, *C. theobromicola* and *C. queenslandicum* from several plant species and the identification of *C. asianum* in the Northern Territory, Australia. *Australasian Plant Disease Notes*, 9(1), 138. <https://doi.org/10.1007/s13314-014-0138-x>.
- Jia, S., Huang, Z., Lei, Y., Zhang, L., Li, Y., Luo, Y. (2018). Application of Illumina-MiSeq high throughput sequencing and culture-dependent techniques for the identification of microbiota of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) treated by tea polyphenols. *Food Microbiology*, 76, 52–61. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2018.04.010>
- Kim, J. C., Choi, G. J., Park, J. H., Kim, H. T., Cho, K. Y. (2001). Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. *Pest Management Science*, 57(6), 554–559. <https://doi.org/10.1002/ps.318>
- Kiriga, A. W., Haukeland, S., Kariuki, G. M., Coyne, D. L., Beek, N. V. (2018). Effect of *Trichoderma* spp. and *Purpureocillium lilacinum* on *Meloidogyne javanica* in commercial pineapple production in Kenya. *Biological Control*, 119, 27–32. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2018.01.005>
- Kraková, L., Šoltys, K., Otlewska, A., Pietrzak, K., Purkrťová, S., Savická, D., Puškárová, A., Bučková, M., Szemes, T., Budiš, J., Demnerová, K., Gutarowska, B., Pangallo, D. (2018). Comparison of methods for identification of microbial communities in book collections: culture-dependent (sequencing and MALDI-TOF MS) and culture-independent (illumina MiSeq). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 131, 51–59. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2017.02.015>
- Kress, W. J., Erickson, D. L. (2008). DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 2761–2762. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800476105>

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549.
- Kurtzman, C.P. (2011). *Pichia* E.C. Hansen (1904). En C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout (Eds.), *The yeasts: a taxonomic study* (pp. 685-707). Londres, Reino Unido: Elsevier.
- Kusai, N. A., Mior Zakuan Azmi, M., Zulkifly, S., Yusof, M. T., Mohd Zainudin, N. A. I. (2016). Morphological and molecular characterization of *Curvularia* and related species associated with leaf spot disease of rice in Peninsular Malaysia. *Rendiconti Lincei*, 27(2), 205–214. <https://doi.org/10.1007/s12210-015-0458-6>
- Leong, K. H., Chen, Y. S., Pan, S. F., Chen, J. J., Wu, H. C., Chang, Y. C., Yanagida, F. (2014). Diversity of lactic acid bacteria associated with fresh coffee cherries in Taiwan. *Current Microbiology*, 68(4), 440-447. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0495-2>
- Liu, W., Li, L., Khan, M.A., Zhu, F. (2012). Popular molecular markers in bacteria. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 27(3), 103–107.
- Liu, M., Tang, Y., Zhao, K., Liu, Y., Guo, X., Ren, D., Yao, W., Tian, X., Gu, Y., Yi, B., Zhang, X. (2017). Determination of the fungal community of pit mud in fermentation cellars for chinese strong-flavor liquor, using DGGE and Illumina MiSeq sequencing. *Food Research International*, 91, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.037>
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M. (2015). Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ*, 3, e1420. <https://doi.org/10.7717/peerj.1420>
- Mahé, F. (2018). Fred's metabarcoding pipeline. Recuperado de: <https://github.com/frederic-mahe/swarm/wiki/Fred%27s-metabarcoding-pipeline>
- Manchester, K. L. (1997). When are nucleic acids not nucleic acids? Problems with estimation of nucleic acid purity by UV absorbance. *Biochemical Education*, 25(4), 214-215. [https://doi.org/10.1016/S0307-4412\(97\)00067-8](https://doi.org/10.1016/S0307-4412(97)00067-8)
- Masoud, W., Cesar, L. B., Jespersen, L., Jakobsen, M. (2004). Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast*, 21(7), 549–556. <https://doi.org/10.1002/yea.1124>
- Masoud, W., Poll, L., Jakobsen, M. (2005). Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *Yeast*, 22(14), 1133–1142. <https://doi.org/10.1002/yea.130>

- Masoud, W., Jespersen, L. (2006). Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 110(3), 291–296. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2006.04.030>
- Massawe, G. A., Lifa, S. J. (2010). Yeasts and lactic acid bacteria coffee fermentation starter cultures. *International Journal of Postharvest Technology and Innovation*, 2(1), 41–82. <https://doi.org/10.1504/IJPTI.2010.038187>
- McAllister, T. A., Dunière, L., Drouin, P., Xu, S., Wang, Y., Munns, K., Zaheer, R. (2018). Silage review: using molecular approaches to define the microbial ecology of silage. *Journal of Dairy Science*, 101 (5), 4060-4074.
- McMurdie, P. J., Holmes, S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Mekete, T., Sikora, R. A., Kiewnick, S., Hallmann, J. (2008). Plant-parasitic nematodes associated with coffee (*Coffea arabica* L., rubiaceae) in Ethiopia. *Nematropica*, 38(2), 177–186. Retrieved from <http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/64461/62129>
- Morales, H., Sanchis, V., Usall, J., Ramos, A. J., Marín, S. (2008). Effect of biocontrol agents *Candida sake* and *Pantoea agglomerans* on *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1–2), 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.056>
- Morris, E. K., Caruso, T., Buscot, F., Fischer, M., Hancock, C., Maier, T. S., Meiners, T., Müller, C., Obermaier, E., Prati, D., Socher, S. A., Sonnemann, I., Wäschke, N., Wubet, T., Wurst, S., Rillig, M. C. (2014). Choosing and using diversity indices: insights for ecological applications from the german biodiversity exploratories. *Ecology and Evolution*, 4(18), 3514-24. <https://doi.org/10.1002/ece3.1155>
- Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M., Ueno, Y. (1997). Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. *Food and Agricultural Immunology*, 9(2), 77–83. <https://doi.org/10.1080/09540109709354938>.
- Nasanit R., Satyawut, K. (2015). Microbiological study during coffee fermentation of *Coffea arabica* var. chiangmai 80 in Thailand. *Kasetsart Journal - Natural Science*, 49, 32–41.
- Ndagano, D., Lamoureux, T., Dortu, C., Vandermoten, S., Thonart, P. (2011). Antifungal activity of 2 lactic acid bacteria of the *Weissella* genus isolated from food. *Journal of Food Science*, 76(6), M305–M311. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02257.x>

- Neto, D. P. de C., Vinícius de Melo, G., Pereira, César de Carvalho, J., Soccol, V. T., Soccol, C. R. (2018). High-throughput rRNA gene sequencing reveals high and complex bacterial diversity associated with brazilian coffee bean fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), 90–95. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5441>
- Nguyen, P.-A., Strub, C., Fontana, A., Schorr-Galindo, S. (2017). Crop molds and mycotoxins: alternative management using biocontrol. *Biological Control*, 104, 10–27. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2016.10.004>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Henry H., M., Stevens, Szoecs, E., Wagner, H. (2018). Vegan: community ecology package. R package versión 2.5-2. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., Colpaert, J. V. (2014). Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. *PloS One*, 9(6), e97629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097629>
- Paterson, R. R. M., Lima, N., Taniwaki, M. H. (2014). Coffee, mycotoxins and climate change. *Food Research International*, 61, 1–15. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.03.037>
- Pereira, G. V. M., Soccol, V. T., Pandey, A., Medeiros, A. B. P., Lara, J. M. R. A., Gollo, A. L., Soccol, C. R. (2014). Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 60–66. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2014.07.008>
- Pereira, G. V. d. M., Soccol, V. T., Soccol, C. R. (2016). Current state of research on cocoa and coffee fermentations. *Current Opinion in Food Science*, 7, 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.001>
- Podolak, R., Black, D.G. (2017). Introduction and overview. En R. Podolak, D.G. Black (Eds.), *Control of salmonella and other bacterial pathogens in low-moisture foods*. (pp. 1-29). West Sussex, Reino Unido: Wiley Blackwell.
- Porrás-Alfaro, A., Liu, K.-L., Kuske, C. R., Xie, G. (2014). From genus to phylum: large-subunit and internal transcribed spacer rRNA operon regions show similar classification accuracies influenced by database composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(3), 829–840.
- Pulpillo Ruiz, A., Sánchez Conejo-Mir, J., Del Canto González, S., Navarrete Ortega, M., Pérez De Soto, I. (2001). Infección sistémica por *Trichosporon asahii*. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 92(7–8), 354–357. [https://doi.org/10.1016/S0001-7310\(01\)79154-5](https://doi.org/10.1016/S0001-7310(01)79154-5)

- R Core Team (2018). R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Ravelo, A., Rubio, C., Gutiérrez, A.J., Hardisson, A. (2011). Ochratoxin A in foods for human consumption: review. *Nutrición Hospitalaria*, 26(6), 1215-1226.
- Ruellan, C. (2017). Biocontrol de la flore fongique toxigène du café. Tesis de licenciatura. UMR QualiSud, CIRAD Montpellier, Francia.
- Salinas, J. C., Lisbona, F. J. Y. (2016). *Manual de prácticas de Bioinformática* (Vol. 5). Universidad Almería.
- Samson, R. A., Houbraken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A., Frank, J. M., Frisvad, J. C. (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. *Studies in Mycology*, 50, 45–61. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac5125>
- Sengun, I. Y. (2016). Acetic acid bacteria in food fermentations. En D. Montet, R.C. Ray (Eds.), *Fermented Foods. Part 1: Biochemistry and Biotechnology* (pp. 91-111). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Sharma, P. D. (2007). *Microbiology*. Nueva Delhi, India: Rastogi Publications.
- SIAP-Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2017). Anuario estadístico de la producción agrícola. Recuperado de: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Sifou, A., Meca, G., Serrano, A. B., Mahnine, N., El Abidi, A., Mañes, J., El Azzouzi, M., Zinedine, A. (2011). First report on the presence of emerging *Fusarium* mycotoxins enniatins (A, A1, B, B1), beauvericin and fusaproliferin in rice on the moroccan retail markets. *Food Control*, 22(12), 1826–1830. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2011.04.019>
- Silva, C. F., Schwan, R. F., Sousa Dias, E., Wheals, A. E. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2–3), 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00315-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00315-9)
- Silva, C. F., Batista, L. R., Abreu, L. M., Dias, E. S., Schwan, R. F. (2008a). Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food Microbiology*, 25(8), 951–957. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2008.07.003>
- Silva, C. F., Batista, L. R., Schwan, R. F. (2008b). Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3), 521–526. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220080003000022>
- Silva, C. F., Vilela, D. M., de Souza Cordeiro, C., Duarte, W. F., Dias, D. R., Schwan, R. F. (2013). Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. *World Journal of Microbiology and*

*Biotechnology*, 29(2), 235–247. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1175-2>

- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6, 791–791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- Suárez-Quiroz, M., González-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., Guiraud, J.-P. (2004). Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. *International Journal of Food Science and Technology*, 39(5), 501–507. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00810.x>.
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Teixeira, A. A., Iamanaka, B. T. (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 173–179. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00310-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00310-0).
- Urbano, G. R., Taniwaki, M. H., Leitão, M. F., Vicentini, M. C. (2001). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. *Journal of Food Protection*, 64(8), 1226–1230. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11510665>
- Vaishnav, N., Singh, A., Adsul, M., Dixit, P., Sandhu, S. K., Mathur, A., Puri, S.K., Singhania, R. R. (2018). *Penicillium*: the next emerging champion for cellulase production. *Bioresource Technology Reports*, 2, 131–140. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2018.04.003>
- Vega, F. E., Posada, F., Peterson, S. W., Gianfagna, T. J., Chaves, F. (2005). *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. *Mycologia*, 98(1), 31–42. <https://doi.org/10.3852/MYCOLOGIA.98.1.31>
- Vilela, D. M., Pereira, G. V. de M., Silva, C. F., Batista, L. R., Schwan, R. F. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology*, 27(8), 1128–1135. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.024>
- Vincent, A. T., Derome, N., Boyle, B., Culley, A. I., Charette, S. J. (2017). Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. *Journal of Microbiological Methods*, 138, 60–71. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2016.02.016>
- Vitale, S., Santori, A., Wajnberg, E., Castagnone-Sereno, P., Luongo, L., Belisario, A. (2011). Morphological and molecular analysis of *Fusarium lateritium*, the cause of gray necrosis of hazelnut fruit in Italy. *Phytopathology*, 101(6), 679–686. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-10-0120>

- Wickham, H. (2016). *Ggplot2: elegant graphics for data analysis*. New York: Springer-Verlag New York.
- Yang, X.J., Wang, S., Cao, J.-M., Hou, J.H. (2018). Complete genome sequence of human pathogen *Kosakonia cowanii* type strain 888-76 T. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1), 16–17.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.03.010>

### 13. Anexos

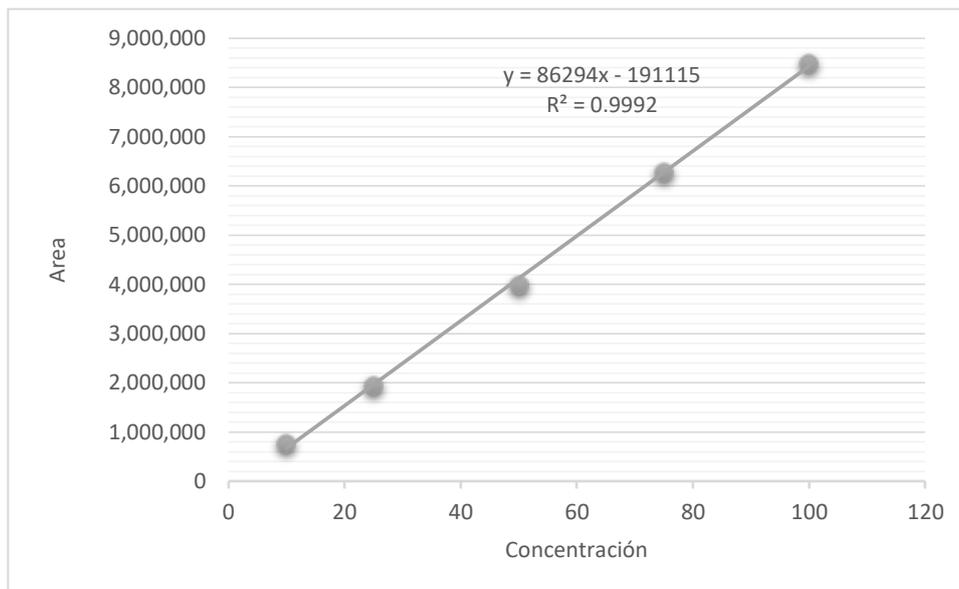
**Anexo 1.** Protocolo de extracción de ADN con el DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen).

1. La suspensión celular para extracción de ADN (aprox. 1.8 mL) se centrifugó a  $10,000 \times g$  durante 30 segundos, a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó con una punta de micropipeta.
2. El pellet celular se resuspendió en 300  $\mu\text{L}$  de la solución "PowerBead solution" y se mezcló con ayuda de un vórtex. Las células resuspendidas se transfirieron al tubo "PowerBead Tube", proporcionado por el proveedor.
3. Se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de la solución "SL" al tubo "PowerBead Tube" y se colocó en un vórtex a máxima velocidad durante 10 minutos.
4. Se prosiguió a centrifugar a  $10,000 \times g$  durante 30 s, a temperatura ambiente, y el sobrenadante resultante se transfirió a un tubo de colecta de 2 mL.
5. Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de la solución "IRS" al tubo con el sobrenadante, se mezcló en vórtex durante 5 segundos e incubó a  $4^\circ\text{C}$  durante 5 minutos.
6. Se centrifugó a  $10,000 \times g$  durante 30 s, a temperatura ambiente, y el sobrenadante resultante se transfirió a un tubo de colecta limpio.
7. Se agregaron 900  $\mu\text{L}$  de la solución "SB" y se mezcló en vórtex durante 5 segundos.
8. Se cargaron 700  $\mu\text{L}$  de la mezcla anterior (sobrenadante con solución "SB") en el tubo "MB Spin Column", se centrifugó a  $10,000 \times g$  durante 30 s y se desechó el líquido que paso a través de la columna. La operación anterior se repitió de dos a tres veces.
9. Se adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de la solución "CB" al tubo "MB Spin Column" y se centrifugó a  $10,000 \times g$  durante 30 segundos.
10. El líquido remanente se desechó y se centrifugó nuevamente a  $10,000 \times g$  durante 1 minuto.
11. El filtro se colocó en un nuevo tubo de colecta y al centro de la membrana se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de la solución "EB".
12. Se centrifugó 30 segundos a  $10,000 \times g$  y se desechó el filtro, conservando el líquido con el ADN.

**Anexo 2.** Protocolo de purificación de productos de PCR con el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

1. A un volumen del producto de PCR (aprox. 50  $\mu$ L) se le agregaron cinco volúmenes del buffer "PB" y la solución se transfirió a la columna "QIAquick column", proporcionada por el proveedor.
2. Se centrifugó durante 30-60 s (17,900  $\times$  g) y se desechó el líquido que pasó a través de la columna.
3. Para lavar, se agregaron 750  $\mu$ L del buffer "PE" a la columna, se centrifugó durante 30-60 s (17,900  $\times$  g) y nuevamente se desechó el líquido que pasó a través.
4. La columna se centrifugó durante 1 minuto más a 17,900  $\times$  g y se colocó en un tubo de colecta nuevo de 2 mL.
5. Para eluir, se agregaron 50  $\mu$ L del buffer "EB" al centro de la membrana de la "QIAquick column" y se centrifugó por 1 minuto (17,900  $\times$  g). En el líquido que paso a través se conservó el producto purificado.

**Anexo 3.** Gráfica de la curva de calibración elaborada con el estándar de OTA (10, 25, 50,75 y 100 ng/mL).





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00258

Matrícula: 2163803381

CARACTERIZACIÓN DE  
COMUNIDADES MICROBIANAS  
ASOCIADAS A CEREZAS FRESCAS  
Y SECAS DE CAFÉ DE LA REGIÓN  
DE TABASCO MEDIANTE MÉTODOS  
DEPENDIENTES E  
INDEPENDIENTES DEL CULTIVO.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:30 horas del día 20 del mes de junio del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO  
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO  
DRA. ISABELLE PERRAUD-GAIME  
DR. JOSE ADELFO ESCALANTE LOZADA



ELISA KAREN GUTIERREZ RODRIGUEZ

ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

DE: ELISA KAREN GUTIERREZ RODRIGUEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO

VOCAL

DR. ULISES CARRASCO NAVARRO

VOCAL

DRA. ISABELLE PERRAUD-GAIME

SECRETARIO

DR. JOSE ADELFO ESCALANTE LOZADA