



Caracterización morfológica, cultural y distribución de hongos asociados a granos de cacao

Morphological and cultural characterization and distribution of fungi associated with cocoa beans

Bryan Delgado-Ruiz¹; Rachel Carranza-Chávez¹; Diana Cedeño-Alcívar^{1*}

¹ Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Carrera de Agroindustria. Calceta, Ecuador.

ORCID de los autores:

B. Delgado-Ruiz: <https://orcid.org/0009-0003-2545-6020>
D. Cedeño-Alcívar: <https://orcid.org/0000-0001-8420-7014>

R. Carranza-Chávez: <https://orcid.org/0009-0001-1119-407X>

RESUMEN

El cacao ecuatoriano constituye un pilar de la economía nacional, aunque su calidad puede verse comprometida por la presencia de hongos productores de micotoxinas durante la fermentación y almacenamiento. El objetivo principal de este estudio fue identificar las cepas fúngicas presentes en granos de cacao fermentados mediante marcadores morfológicos, en cuatro centros de acopio del cantón Bolívar. Se recolectaron 150 granos por centro en la última fase de fermentación, los cuales fueron sembrados en medio DG18 e incubados a 25 °C. Las colonias desarrolladas fueron evaluadas mediante observaciones macroscópicas y microscópicas, apoyadas en claves taxonómicas. Se aislaron y caracterizaron 64 cepas fúngicas con amplia variabilidad en textura, coloración y exudado. El análisis microscópico permitió identificar dos géneros predominantes: *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp., siendo *Aspergillus* el más abundante en todos los centros de acopio. El análisis estadístico evidenció diferencias significativas en la carga fúngica entre centros ($p < 0.05$), lo que refleja la influencia de las prácticas de fermentación y almacenamiento en la diversidad microbiana. En definitiva, la identificación de estos géneros destaca la necesidad de implementar controles rigurosos en el manejo postcosecha, dado que especies de la sección *Aspergillus Nigri* pueden producir ochratoxina A, comprometiendo la inocuidad del cacao.

Palabras clave: Cacao ecuatoriano; Ochratoxina A; *Aspergillus*; Fermentación; Caracterización morfológica; Caracterización cultural.

ABSTRACT

Ecuadorian cocoa is a pillar of the national economy, although its quality can be compromised by the presence of mycotoxin-producing fungi during fermentation and storage. The main objective of this study was to identify the fungal strains present in fermented cocoa beans using morphological markers in four collection centers in the Bolívar canton. One hundred and fifty beans per center were collected in the last phase of fermentation, which were seeded in DG18 medium and incubated at 25°C. The developed colonies were evaluated by macroscopic and microscopic observations, supported by taxonomic keys. Sixty-four fungal strains with wide variability in texture, coloration, and exudate were isolated and characterized. Microscopic analysis identified two predominant genera: *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp., with *Aspergillus* being the most abundant in all collection centers. Statistical analysis showed significant differences in fungal load between centers ($p < 0.05$), reflecting the influence of fermentation and storage practices on microbial diversity. Ultimately, the identification of these genera highlights the need to implement rigorous controls in post-harvest management, given that species of the *Aspergillus Nigri* section can produce ochratoxin A, compromising the safety of cocoa.

Keywords: Ecuadorian cocoa; Ochratoxin A; *Aspergillus*; Fermentation; Morphological characterization; Cultural characterization.

1. Introducción

El cacao no solo es un símbolo de prestigio que distingue a Ecuador a nivel mundial, sino que también ocupa un lugar destacado en su economía (Matute, 2021). El país se caracteriza por producir cacao fino de aroma, con una producción anual que oscila entre 60 y 70 mil toneladas (Solorzano et al., 2021). En 2023 Ecuador exportó cacao en grano por un valor de USD 1.171 millones, posicionándose como el cuarto producto de exportación no petrolero, solo superado por el camarón, el banano y el atún. Según la Revista Gestión Digital (2024) la disminución en la producción en países clave como Costa de Marfil y Ghana ha generado oportunidades para que el cacao ecuatoriano cubra parte de la demanda insatisfecha en los mercados internacionales, donde los precios sobrepasan los \$10,000 por tonelada.

Los cantones Bolívar, Chone, Portoviejo, Junín y Tosagua, todos pertenecientes a la provincia de Manabí, aportan un total de 2,115 hectáreas a la producción de cacao. La Corporación Fortaleza del Valle, situada en Calceta (cantón Bolívar), recolecta aproximadamente 600 toneladas anuales con la participación de cerca de 961 productores distribuidos en los cantones mencionados. Esta producción se somete a múltiples procesos en los centros de acopio, que incluyen la recepción del cacao en baba, fermentación, secado, preselección del grano seco y almacenamiento (Cedeño et al., 2023).

La fermentación constituye una etapa esencial en el procesamiento del cacao, ya que en ella se generan los precursores del aroma y sabor característicos del chocolate. Esta fase está influenciada por el tipo de cacao, el tiempo de almacenamiento del fruto, el método y tipo de fermentación, la duración del proceso y la frecuencia de remoción. Ghisolfi et al. (2023) señalan que la fermentación de los granos de cacao involucra principalmente tres grupos microbianos: levaduras, bacterias del ácido láctico (BAL) y bacterias del ácido acético (AAB).

Estos microorganismos actúan en conjunto para asegurar una fermentación adecuada de los granos de cacao. Sin embargo, Cedeño y Vera (2019) advierten que en la etapa final de la fermentación pueden proliferar hongos filamentosos que generan ocratoxina A (OTA) una micotoxina altamente tóxica con efectos neurotóxicos, inmunosupresores, genotóxicos, carcinogénicos y teratogénicos (Elías et al., 2021). La producción de OTA se atribuye principalmente

a los hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Contreras et al., 2023). En los granos de cacao, los principales hongos responsables de la producción de ocratoxina A pertenecen a los géneros *Aspergillus niger* y *Aspergillus carbonarius*, que son las especies predominantes en la contaminación durante la fermentación y el almacenamiento, especialmente bajo condiciones de alta humedad y temperatura (Ariza, 2021). Baca (2022), señala que la proliferación de estos hongos representa un obstáculo significativo para el comercio internacional del cacao. Además, plantea un riesgo para el mercado local, que frecuentemente absorbe productos de menor calidad, generando impactos negativos tanto en la economía como en la seguridad alimentaria debido a los riesgos toxicológicos asociados. Según Matute (2021), actualmente se implementan procesos de aislamiento y caracterización de cepas fúngicas para evaluar su impacto en la fermentación y en la calidad del producto final.

En Ecuador, la producción de cacao es una de las principales actividades productivas que contribuyen significativamente a la economía, no obstante, según diversos estudios han reportado una alta incidencia de Ocratoxina A (OTA) en chocolates artesanales, atribuida a prácticas deficientes de manejo postcosecha (Subroto et al., 2023). En el cantón Bolívar, algunos centros de acopio carecen de estudios que determinen la presencia de esta micotoxina o que establezcan una línea base de la microbiota patógena presente, lo que genera problemas tanto en la exportación como en el mercado interno, donde se comercializan productos de calidad inferior.

En este contexto, el objetivo del presente estudio es identificar las cepas fúngicas de granos de cacao fermentados, mediante marcadores morfológicos, en los centros de acopio del cantón Bolívar, con el fin de contribuir al conocimiento científico sobre el microbiota fúngico del cacao.

2. Metodología

Muestreo

Se seleccionaron cuatro empresas dedicadas al acopio de cacao, ubicadas en el cantón Bolívar, provincia de Manabí, Ecuador. Los centros de acopio participantes fueron: Kaakao S.A. (coordenadas 0°49.6057'S, 80°11.2376'W), Fortaleza del Valle (0°50.0561'S, 80°9.3211'W), Aroma de Montaña (0°49.5782'S, 79°52.9932'W) y Piedra de Plata (0°50.9450'S, 79°56.0429'W).

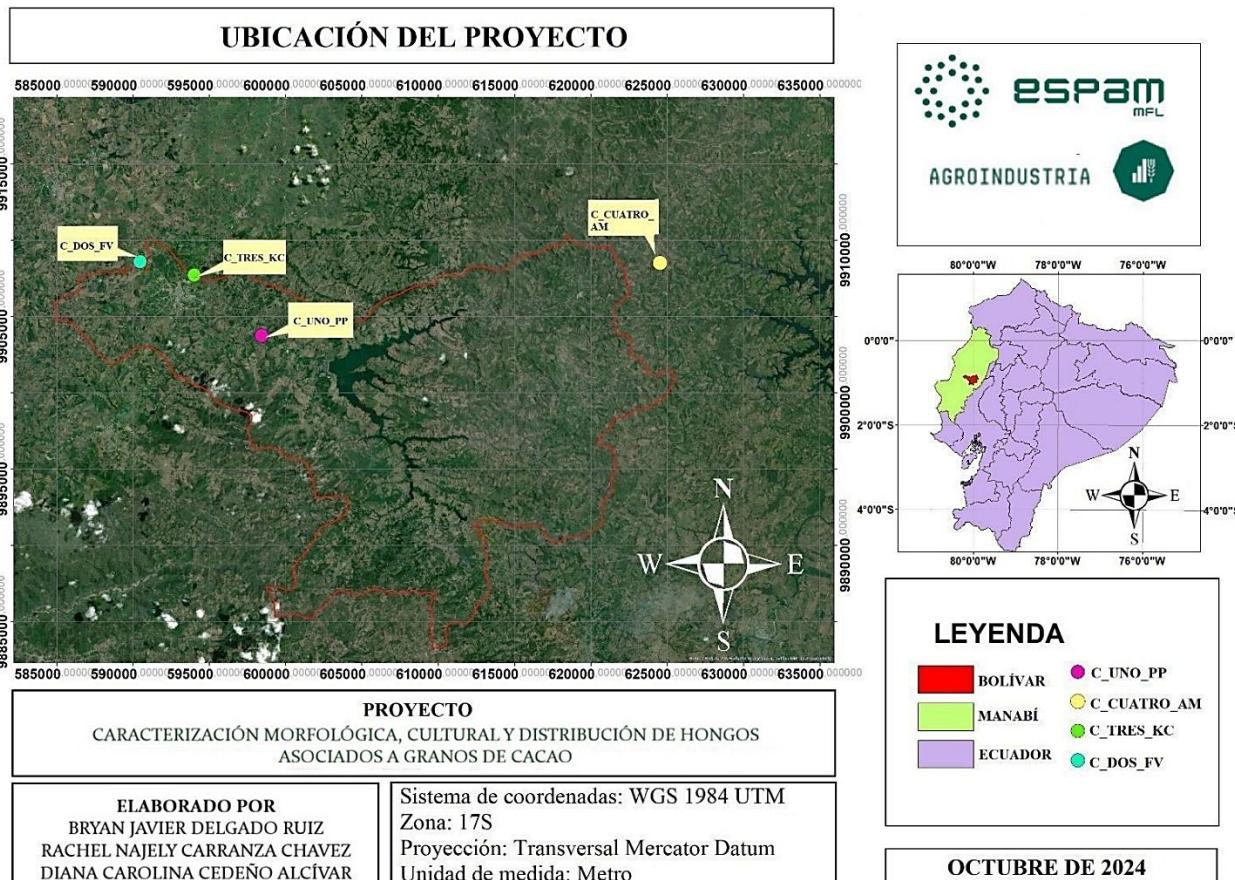


Figura 1. Ubicación del área de estudio.
Figure 1. Location of the study area.

Se recolectaron 150 granos de cacao en cada uno de los cuatro centros de acopio del cantón Bolívar durante la última fase del proceso de fermentación, realizada en cajones de madera. Las muestras se obtuvieron de manera uniforme en los cuatro centros de acopio donde los granos de cacao recolectados fueron almacenados en bolsas plásticas herméticas y trasladados al laboratorio de Biología Molecular de la ESPAM MFL para su posterior aislamiento e identificación.

Aislamiento de diferentes géneros fúngicos

Para aislar e identificar hongos filamentosos se empleó el método de siembra directa en Agar Glicerol Dicloran al 18% (DG18), metodología propuesta por Pitt & Hocking (2009). Se seleccionaron aleatoriamente 150 granos de cacao, los cuales fueron distribuidos en 30 placas de Petri (5 granos por placa) que contenían el medio DG18. Las placas incubadas a una temperatura de 25 °C durante un periodo de 5 a 7 días. Las colonias desarrolladas se evaluaron mediante observación macroscópica y microscópica para su posterior identificación morfológica.

Identificación morfológica de los diferentes géneros fúngicos

La identificación morfológica de los aislados fúngicos se realizó mediante siembra en medios específicos, observaciones macroscópicas y microscópicas, y el uso de claves taxonómicas descritas anteriormente por Pitt & Hocking (2009). Las colonias fúngicas obtenidas de cada muestra fueron contabilizadas y agrupadas según sus características morfológicas, con el fin de determinar la abundancia relativa (%) de cada género identificable, así como la densidad relativa (DR%), calculada según el método por González et al. (1996).

Las cepas pertenecientes a la sección Nigri del género *Aspergillus* fueron clasificadas en tres grupos, de acuerdo con la morfología de sus esporas y cabezas conidiales: aquellas con cabezas conidiales uniseriadas, como *Aspergillus uniseriatus*, y aquellas con cabezas biseriadas, entre las que se incluyen *A. niger* y *A. carbonarius*, conforme a lo señalado por Prendes (2016).

3. Resultados y discusión

La fermentación del cacao se caracteriza por una compleja sucesión microbiana que influye directamente en el desarrollo del sabor y aroma del producto final. Esta dinámica, en la que intervienen levaduras, bacterias y hongos, resulta esencial para transformar los granos, eliminar el mucílago y activar enzimas que potencian sus características organolépticas (Laranjo, 2021).

Análisis macroscópico de cepas fúngicas

Se aislaron y caracterizaron un total de 64 cepas fúngicas provenientes de los cuatro centros de acopio, evidenciando variabilidad en la textura, coloración y presencia de exudado. En el centro Piedra de Plata, se aislaron 18 cepas. Se observó una predominancia de colonias con superficie lisa y aterciopelada (12 de 18 cepas) muchas de las cuales presentaban exudado central (Figura 2). El color del micelio y del anverso mostró una amplia diversidad, destacándose tonalidades amarillas, verdes y marrones. Las cepas M18 Café y M1 Verde oliva registraron el mayor número de cepas aisladas.

En el centro Aroma de Montaña, las cepas fúngicas evaluadas presentaron una amplia

diversidad morfológica, aunque la mayoría presentó una textura densa, aterciopelada y flocosa, se observó una notable variabilidad en la coloración del micelio y del anverso (Figura 3). Predominaron los micelios en tonos verdes y amarillos, mientras que el anverso mostró combinaciones de colores, como verde, blanco y amarillo. La presencia de exudado varió entre las cepas: algunas presentaron secreciones abundantes, concentradas en el centro de la colonia, como ocurrió con las cepas L1 M5 Verde oliva y L2 M20 Café. La cepa L1 M11 Amarillo registró el mayor número de colonias aisladas (30), caracterizándose por un micelio verde y un anverso verde amarillento, sin exudado detectable.

En el centro KAACAO se identificaron cinco cepas fúngicas que presentaron uniformidad en sus características de textura (Figura 4). Todas exhibieron una superficie densa y aterciopelada, lo que sugiere una consistencia similar en el patrón de crecimiento. En cuanto a la coloración, predominaron los micelios en tonos blanco y amarillo, mientras que el anverso mostró ligeras variaciones con combinaciones de blanco, amarillo y tonalidades intermedias.

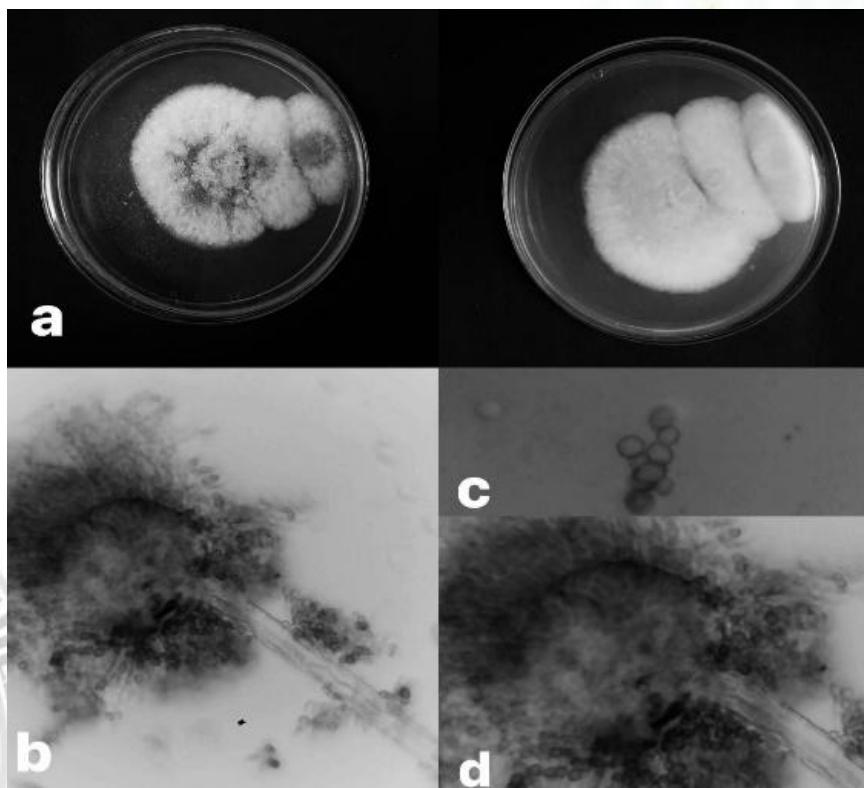


Figura 2. *Aspergillus* (a) colonias en DG18 Reverso y aduerso, 7 días, 25 C; (b) conidióforo = 241,30 µm, lente 40x; (c) conidios = superficie 92,659 µm² radio 5,604 µm, lente 100x; (d) vesícula = superficie 2304,79 µm², radio 27,086 µm, lente 40x.

Figure 2. *Aspergillus* (a) colonies on DG18 Reverse and adverse, 7 days, 25 C; (b) conidiophore = 241.30 µm, lens 40x; (c) conidia = surface area 92.659 µm² radius 5.604 µm, lens 100x; (d) vesicle = surface area 2304.79 µm², radius 27.086 µm, lens 40x.

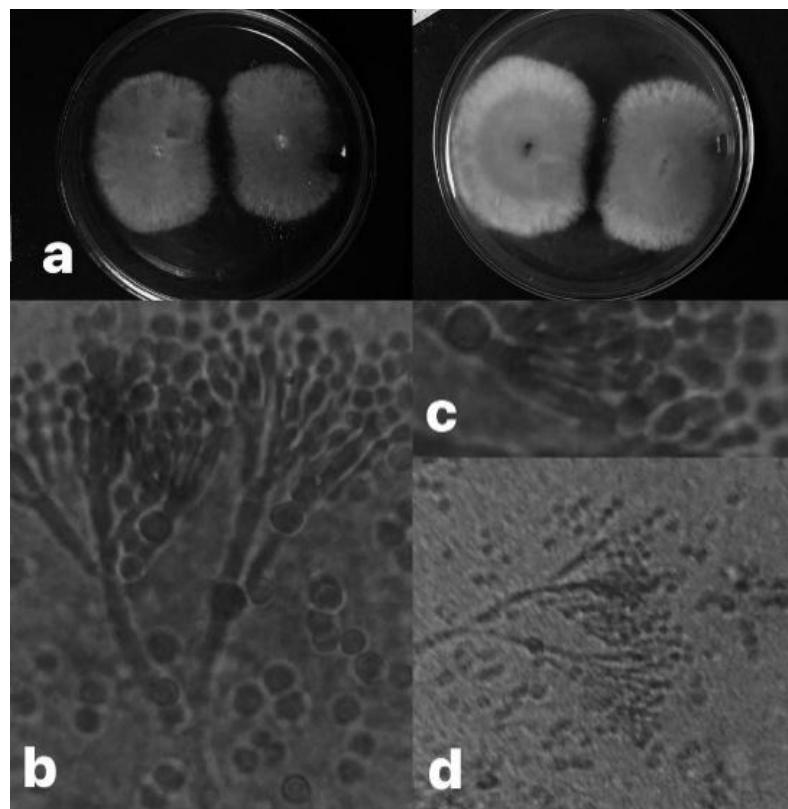


Figura 3. Penicillium (a) colonias en DG18 Reverso y adverso, 7 días, 25 C; (b) metula = 17,86 μm , lente 100x; (c) conidios = superficie 18,49 μm^2 radio 2,42 μm lente 100x (d) conidióforo = 93,473 μm , lente 100x.

Figure 3. Penicillium (a) colonies on DG18 Reverse and adverse, 7 days, 25 C; (b) metula = 17.86 μm , lens 100x; (c) conidia = surface 18.49 μm^2 radius 2.42 μm lens 100x (d) conidiophore = 93.473 μm , lens 100x.

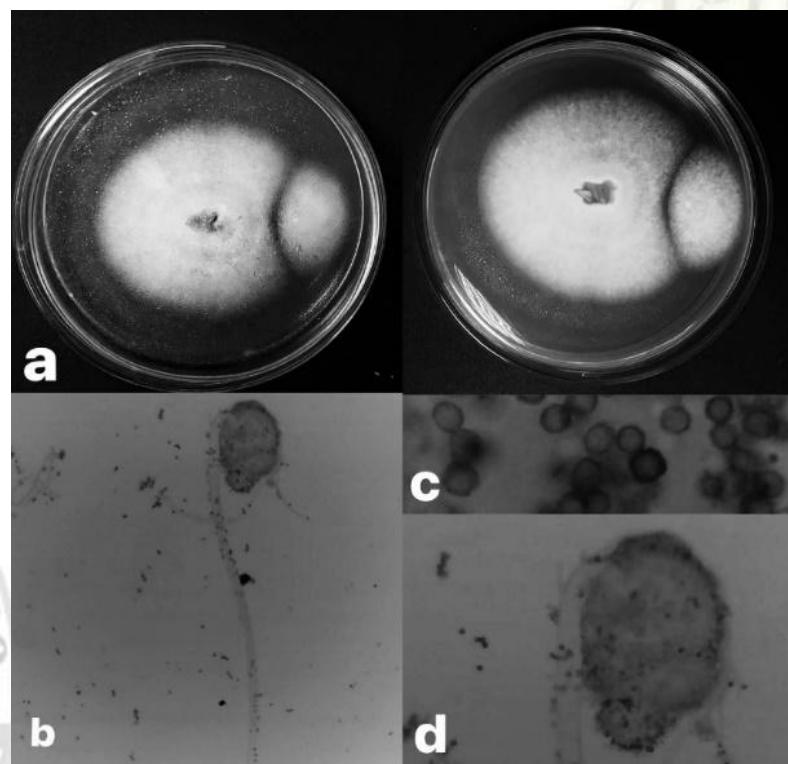


Figura 4. Aspergillus (a) colonias en DG18 Reverso y adverso, 7 días, 25 C; (b) conidióforo = 271,48 μm , lente 10x; (c) conidios = superficie 9,874 μm^2 , radio 1,773 μm , lente 100x; (d) vesícula = superficie 499,46 μm^2 , radio 12,609 μm , lente 40x.

Figure 4. Aspergillus (a) colonies on DG18 Reverse and adverse, 7 days, 25 C; (b) conidiophore = 271.48 μm , lens 10x; (c) conidia = surface 9.874 μm^2 , radius 1.773 μm , lens 100x; (d) vesicle = surface 499.46 μm^2 , radius 12.609 μm , lens 40x.

La cepa M20 Verde oliva presentó un micelio verde amarillento, diferenciándose del resto. Todas las cepas mostraron la presencia de exudado; sin embargo, únicamente en M3 Verde oliva y M5 Blanco se observó secreción localizada en el centro de la colonia. En términos de abundancia, las cepas M1 Verde oliva y M20 Verde registraron el mayor número de colonias aisladas. Las cepas fúngicas aisladas de las muestras provenientes del centro Fortaleza del Valle presentaron una marcada heterogeneidad en sus características morfológicas, aunque se observó una predominancia de texturas densas, aterciopeladas y flocosas (Figura 5). La coloración del micelio fue altamente variable, con tonalidades que incluyeron blanco, verde, café, amarillo y rosado. La cepa M10 Verde oliva y M7 Negro sobresalieron por registrar el mayor número de colonias aisladas y fueron las únicas que no presentaron exudado. En contraste, las demás cepas mostraron secreciones visibles, lo cual sugiere diferencias en sus procesos metabólicos.

Análisis microscópico y nomenclatura

El análisis microscópico permitió identificar los géneros fúngicos predominantes mediante la observación de sus estructuras reproductivas. Algunas cepas presentaron conidióforos largos que culminaban en una vesícula de la cual

emergían fiáldides que liberaban conidios esféricos, lo que sugiere la presencia del género *Aspergillus*. En otras cepas, conidióforos que se ramificaban en métrulas que sostenían las fiáldides, una característica distintiva del género *Penicillium*.

Los resultados de esta investigación confirman la existencia de una microbiota fúngica diversa en los granos de cacao provenientes de los centros de acopio del cantón Bolívar. La identificación de géneros como *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp concuerda con estudios previos sobre la fermentación del cacao (Nguyen et al., 2025; Odudo-Mensah et al., 2023). La variabilidad observada en las características morfológicas, tanto macroscópicas como microscópicas, resalta la importancia de realizar estudios de identificación detallados para comprender la ecología fúngica asociada al cacao.

La presencia de estos géneros tiene implicaciones significativas para la calidad e inocuidad del producto final, ya que algunas especies de *Aspergillus* y *Penicillium* son capaces de producir micotoxinas, compuestos que representan un riesgo para la salud humana (Viesser et al., 2021). Por ello, el control de la microbiota fúngica durante las etapas de fermentación y almacenamiento resulta esencial para asegurar un producto de alta calidad y seguro para el consumo.

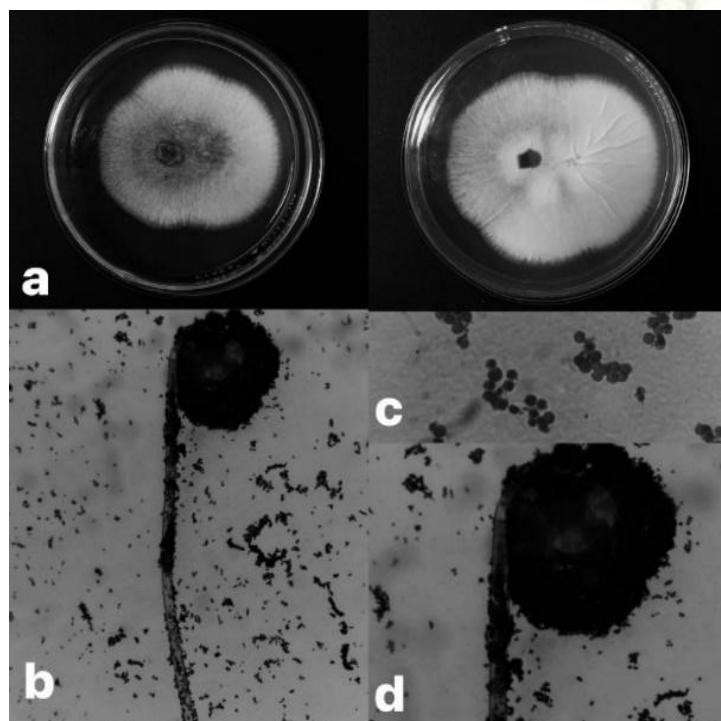


Figura 5. *Aspergillus* (a) colonias en DG18 Reverso y aduerso, 7 días, 25 C; (b) conidióforo = 1196,07 μm , lente 10x; (c) conidios = superficie 29,78 μm^2 , radio 3,079 μm , lente 100x; (d) vesícula = superficie 1997,85 μm^2 , radio 25,218 μm , lente 40x.

Figure 5. *Aspergillus* (a) colonies on DG18 Reverse and adverse, 7 days, 25 C; (b) conidiophore = 1196.07 μm , lens 10x; (c) conidia = surface 29.78 μm^2 , radius 3.079 μm , lens 100x; (d) vesicle = surface 1997.85 μm^2 , radius 25.218 μm , lens 40x.

Identificación y recuento de cepas fúngicas

Se identificaron cepas fúngicas en los granos de cacao fermentados provenientes de los 4 centros de acopio (Figura 6). La presencia y abundancia de variaron entre las muestras: en los granos de Aroma de Montaña (C CUATRO_AM) y la Asociación Piedra de Plata (C UNO_PP) se detectaron *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. En las muestras de KAACAO (C_TRES_KC) y Fortaleza del Valle (C_DOS_FV), únicamente se identificó la presencia de *Aspergillus* spp. En cuanto a la cantidad, el recuento de aislados fúngicos de *Aspergillus* spp. fue el género dominante en todos los centros de acopio. El orden de abundancia fue el siguiente: Aroma de Montaña (110 UFC aislados), Asociación Piedra de Plata (70 UFC aislados), KAACAO (35 UFC aislados) y Fortaleza del Valle (28 UFC aislados). El *Penicillium* spp. se encontró en menor proporción, con 15 aislados en Aroma de Montaña y 5 en la Asociación Piedra de Plata.

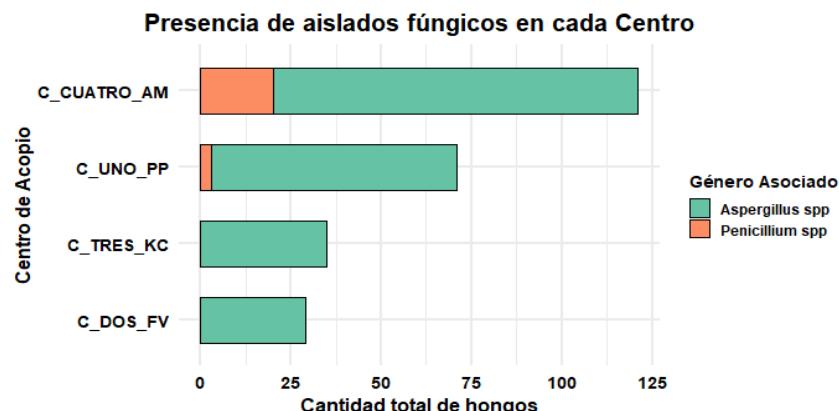


Figura 6. Distribución y recuento de los géneros fúngicos (*Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp.) aislados de granos de cacao por centro de acopio.

Figure 6. Distribution and count of fungal genera (*Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp.) isolated from cocoa beans by collection center.

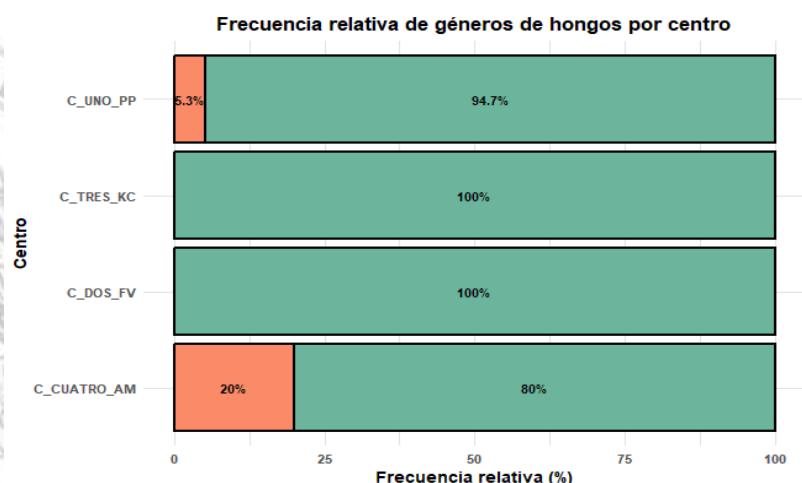


Figura 7. Distribución porcentual de los géneros fúngicos en granos de cacao por centro de acopio.

Figure 7. Percentage distribution of fungal genera in cocoa beans by collection center.

El análisis de la frecuencia relativa de los géneros fúngicos por centro de acopio evidenció una distribución diferenciada de *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. En la Asociación Piedra de Plata (C_UNO_PP), el 94,7% de los aislamientos correspondieron a *Aspergillus* spp., mientras que *Penicillium* spp representó el 5,3%. En el centro Aroma de Montaña (C CUATRO_AM), *Aspergillus* spp. constituyó el 80% de los hongos aislados y *Penicillium* spp. el 20. En contraste, en KAACAO (C_TRES_KC) y Fortaleza del Valle (C_DOS_FV), se registró una presencia exclusiva de *Aspergillus* spp. (100%), sin aislamientos de *Penicillium* spp. (Figura 7).

Este análisis de frecuencia complementa los recuentos absolutos, revelando que, aunque la cantidad total de hongos varía entre centros, el perfil de los géneros fúngicos es homogéneo en algunos casos y más diverso en otros, lo que sugiere diferencias en las condiciones de fermentación y manejo postcosecha.

Los resultados sobre la diversidad fúngica en los centros de acopio del cantón Bolívar se alinean con investigaciones previas realizadas en Ecuador. El estudio de Álvarez-Romero et al. (2025), enfocado en variedades tradicionales de cacao como CCN 51, Súper Árbol y Nacional, reportó una diversidad fúngica significativa, con alta abundancia de géneros como *Penicillium*, *Epicoccum*, *Lasiodiplodia*, *Trichoderma* y *Fusarium*. De manera particular, la investigación desarrollada en La Joya de los Sachas evidenció una notable riqueza de hongos endófitos, identificando hasta 14 géneros distintos. Por su parte, Tigrero-Vaca et al. (2022) describieron una sucesión microbiana en variedades Nacional × Trinitario, compuesta por levaduras, bacterias ácido-lácticas y acéticas, así como especies del género *Bacillus*. Por lo que, los perfiles fúngicos en el cacao pueden variar considerablemente dependiendo de la variedad y la región, reforzando la importancia de investigar los puntos de control a nivel local.

La elevada cantidad de hongos encontrada podría estar directamente relacionado con prácticas subóptimas durante la fermentación o el almacenamiento del cacao. Esta hipótesis coincide con estudios realizados en Colombia, donde Delgado-Ospina et al. (2022) reportaron recuentos de mohos superiores a 4 log UFC/g en muestras con procesos de fermentación prolongados (6 - 7 días). La duración inadecuada y el manejo deficiente del proceso fermentativo, así como la inclusión de granos dañados, pueden explicar los altos recuentos observados. Esto subraya la necesidad de un control riguroso de cada etapa, desde la selección de los granos hasta su almacenamiento, para mitigar el riesgo de proliferación fúngica.

Más allá de la frecuencia, la presencia predominante de *Aspergillus* spp. en los aislamientos que constituyen un resultado crítico para la seguridad alimentaria. Se ha documentado que cepas pertenecientes a la sección *Aspergillus Nigri* tienen el potencial de producir ocratoxina A (OTA), una micotoxina de gran relevancia. Delgado-Ospina et al. (2022) observaron que el cacao puede estimular la producción de OTA en *Aspergillus Nigri*, con niveles que varían significativamente. Si bien los hongos cumplen un papel multifacético en el cacao, y algunos pueden ser beneficiosos, la creciente preocupación por las micotoxinas, intensificada por factores como el cambio climático, hace indispensable el monitoreo y control. En esta misma línea, Konan et al. (2024) en Costa de Marfil, subraya que el riesgo no es

local, sino que es una preocupación global en la cadena de producción del cacao.

En respuesta a la amenaza que representan las micotoxinas, diversos estudios han explorado métodos para controlar el crecimiento fúngico durante la fermentación. La adición de cultivos iniciadores, como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* y *Saccharomyces cerevisiae*, ha demostrado ser una estrategia eficaz para suprimir el crecimiento de mohos (Marwati et al., 2021; Rahayu et al., 2021). De manera similar, Cedeño Alcívar et al. (2023) en un estudio en Manabí, lograron inhibir significativamente el crecimiento de *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. con cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*. A su vez, Kadjo et al. (2023) evidenciaron que *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792 puede suprimir el crecimiento fúngico. En conjunto, estos hallazgos respaldan el potencial del control biológico como alternativa viable para la reducción de contaminantes micotoxigénicos en la cadena de producción del cacao.

Otros factores, como la densidad de la masa fermentativa (Guzmán-Armenteros et al., 2023) y uso de método de fermentación en cajas (Ghisolfi et al., 2023) también han demostrado su eficacia en la reducción del crecimiento fúngico. Estos resultados confirman que la optimización de las condiciones de constituye un aspecto clave para fortalecer la seguridad microbiológica. En este sentido, la identificación de puntos críticos de control a lo largo de la cadena de producción, tal como se evidenció en el presente estudio, representa un paso esencial para la implementación de estrategias de mitigación a nivel industrial.

Variabilidad de la carga fúngica entre centros de acopio

Para comparar la distribución de la carga fúngica entre los centros de acopio, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis aplicada a las medianas (Tabla 1). Los resultados evidenciaron diferencias estadísticamente significativas (p -valor = 0,0033), lo que indica que la cantidad de hongos en los granos de cacao está asociada al centro de acopio de procedencia. Esta variabilidad puede explicarse por las diferencias en los procesos de fermentación y almacenamiento implementados en cada centro. En cambio, los factores climáticos fueron descartados como variables influyentes, dado que los cuatro centros se localizan en el mismo cantón y comparten condiciones meteorológicas similares.

La prueba de Kruskal-Wallis fue complementada con la prueba post-hoc de Dunn, aplicando la corrección de Bonferroni para identificar las diferencias específicas entre los centros de acopio (Figura 4). Los resultados mostraron que la Asociación Piedra de Plata (C_UNO_PP) difirió significativamente de Fortaleza del Valle (C_DOS_FV) y de KAACAO (C_TRES_KC), con valores de p-ajustada de 0,042 y 0,017, respectivamente. En contraste, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de hongos al comparar los demás centros. Estos resultados sugieren que la Asociación Piedra de Plata (C_UNO_PP) presenta un comportamiento atípico respecto a la carga fungica, mientras que Fortaleza del Valle (C_DOS_FV), KAACAO (C_TRES_KC) y Aroma de Montaña (C CUATRO_AM) muestran niveles compatibles.

Estudios previos, como el de Mendoza Salazar & Lizarazo-Medina (2021), han demostrado que la diversidad microbiana en la fermentación del cacao varía significativamente entre regiones influenciada

tanto por la microbiota autóctona como por las condiciones ambientales. De manera similar, los resultados del presente estudio indican que el perfil fúngico de los granos de cacao en el cantón Bolívar está fuertemente influenciado por las condiciones específicas de cada centro de acopio.

En consecuencia, la carga y la composición de los hongos no son aleatorias, sino que están directamente asociadas a las prácticas de procesamiento y al microambiente específico de cada ubicación.

La evidencia sobre el cacao ecuatoriano apoya esta conclusión. Falconí et al. (2023) demostraron que la aplicación de un cóctel microbiano nativo como cultivo iniciador altera de manera significativa la composición de azúcares y ácidos orgánicos, además de modificar parámetros críticos como la temperatura y el pH durante la fermentación. Este control sobre la dinámica microbiana conduce a la reducción de hongos filamentosos, demostrando el impacto directo que tiene la gestión del proceso en la calidad microbiológica del grano.

Tabla 1

Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de la carga fungica entre centros de acopio

Table 1

Results of the Kruskal-Wallis test for the comparison of fungal load between collection centers

Prueba	Variable dependiente	Variable independiente	Chi-cuadrado (χ^2)	GL	p-valor
Kruskal-Wallis	Cantidad de hongos	Centros de acopio	13,742	3	0,0033

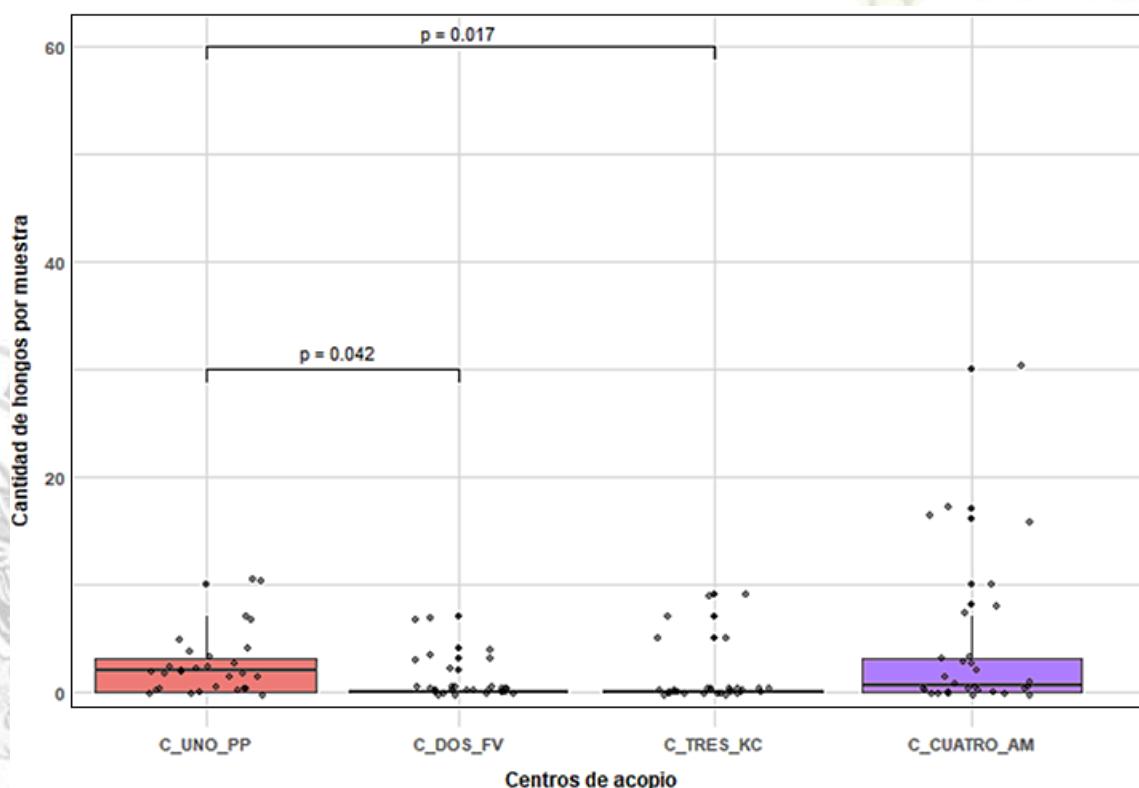


Figura 4. Comparaciones post-hoc de Dunn de la carga fungica entre centros de acopio con corrección de Bonferroni.

Figure 4. Dunn post-hoc comparisons of fungal load between collection centers with Bonferroni correction.

Asociación entre géneros de hongos y centros de acopio

La prueba exacta de Fisher aplicada sobre la tabla de contingencia que cruza los centros de acopio y la presencia de hongos indicó un p -valor = 0,0003234 (Tabla 2),, evidenciando una asociación significativa ($p < 0,05$). Este resultado indica que la distribución de la presencia de hongos no es independiente del centro de acopio, lo que refleja diferencias relevantes entre ellos.

Tabla 2

Resultados de la prueba exacta de Fisher para la asociación entre la presencia de hongos y los centros de acopio

Table 2

Results of Fisher's exact test for the association between the presence of fungi and collection centers

Prueba	Variables analizadas	p-value
Fisher's Exact Test	Centros de acopio/Presencia de hongos	0,0003234

Se aplicó la prueba de Fisher para evaluar la asociación entre los géneros fúngicos (*Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp.) y los centros de acopio. El análisis de la tabla de contingencia reveló una asociación estadísticamente significativa ($p = 0,00052$; Tabla 3), lo que evidencia que la distribución de estos géneros no es aleatoria si no que está fuertemente influenciada por el centro de acopio de donde provienen los granos de cacao. Este resultado sugiere que factores selectivos de cada centro, como las prácticas de fermentación o las condiciones de almacenamiento, influyen directamente en el establecimiento de la carga fúngica. La presencia predominante de *Aspergillus* spp. en todos los centros, frente a la detección de *Penicillium* spp. únicamente en Aroma de Montaña y en la Asociación Piedra de Plata, refuerza la idea de que cada centro de acopio presenta un perfil microbiológico particular determinado por sus métodos de procesamiento.

Tabla 3

Resultados de la prueba exacta de Fisher para la asociación entre los géneros fúngicos (*Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp.) y los centros de acopio

Table 3

Results of Fisher's exact test for the association between fungal genera (*Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp.) and collection centers

Prueba	Variables analizadas	p-value
Fisher's Exact Test	Género de hongos / Centro de acopio	0,0005188

Estos resultados se alinean con estudios internacionales, como la investigación en Costa de Marfil por Konan et al. (2024), donde se evidenció una correlación directa entre las condiciones de fermentación y la presencia de microorganismos. Los autores reportaron que los granos fermentados en vainas presentaron un pH superior a 5,5, mientras que aquellos almacenados en bolsas de polipropileno mostraron una humedad mayor al 8%. Estas variaciones condicionaron la microbiota, con una mayor frecuencia de bacterias del género *Bacillus* en los granos fermentados en vainas. Asimismo, se observó el predominio de mohos como *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus niger* en los granos almacenados en sacos de yute y en vainas, lo que confirma que las prácticas postcosecha constituyen un factor determinante en el perfil fúngico del cacao.

La identificación de las cepas fúngicas presentes en los granos de cacao fermentados de los centros de acopio del cantón Bolívar, mediante el uso de marcadores morfológicos, permitió determinar que la distribución y abundancia de géneros como *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. están directamente influenciadas por las prácticas de procesamiento en cada centro. Este resultado no solo favorece al conocimiento científico de la microbiota fúngica asociada al cacao, sino que también destaca la necesidad de optimizar los procesos de fermentación y almacenamiento para garantizar la calidad e inocuidad del cacao fermentado, principal materia prima en la elaboración de chocolate.

4. Conclusiones

La fermentación de cacao en los centros de acopio del cantón Bolívar está marcada por una elevada diversidad fúngica, en la que predominan los géneros *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp., cuya distribución y abundancia mostraron variaciones significativas en los centros analizados. Las diferencias observadas en la morfología, abundancia y asociación de las cepas fúngicas confirman que los procesos de fermentación y almacenamiento ejercen un papel determinante en la configuración del perfil microbiológico del grano. En particular, la predominancia de *Aspergillus* spp. en todos los centros y la presencia de *Penicillium* spp. en algunos de ellos, resalta la influencia de las prácticas postcosecha sobre la calidad microbiológica del cacao.

Estos resultados, además de coincidir con investigaciones previas a nivel nacional e

internacional, advierten sobre el riesgo que presenta la proliferación de cepas con potencial, lo que implica la necesidad de establecer puntos críticos de control a lo largo de la cadena productiva. En este sentido, la implementación de estrategias de manejo optimizadas, como el uso de cultivos iniciadores y el control biológico, junto con el fortalecimiento de las condiciones de fermentación y almacenamiento, se proyecta como una alternativa clave para garantizar un cacao de alta calidad e inocuidad, consolidando así su valor en la industria chocolatera.

Agradecimientos

Agradecemos a Dios por brindarnos la sabiduría, fortaleza y salud para llevar a cabo este trabajo. Expresamos nuestro sincero agradecimiento a la Mgtr. Diana Cedeño por su valiosa guía y acompañamiento como tutora durante el desarrollo de este proyecto. De igual manera, al Ing. Andrés Santana, por su apoyo técnico y constante disposición a lo largo del proceso en el laboratorio.

Referencias bibliográficas

- Alvarez-Romero, P., Román-Robalino, D., Salazar-Castañeda, E., Suárez-Cedillo, S., Hinojosa-Sánchez, L., Ferreira, A., & Gualpa-Calva, M. (2025). Diversity and composition of endophytic fungal communities associated with cocoa (*Theobroma cacao L.*) fruits in the northern Ecuadorian Amazon. *International Journal of Plant Biology*, 16(1). <https://doi.org/10.3390/ijpb16010017>
- Ariza Aguayo, A. (2021). Evaluación del nivel de ocratoxina A en las fases de post cosecha de *Theobroma cacao L.* "cacao trinitario" y chocolates artesanales en el distrito de Pisana – San Martín, 2018. [Tesis de grado, Universidad Norbert Wiener].
- Baca-Maldonado, D. (2022). Aislamiento e identificación de hongos con potencial micotoxígeno en granos de cacao. [Tesis de grado, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas].
- Cedeño Alcivar, D., Cedeño Guzmán, W., Vera Macías, L., & Vélez Zambrano, S. (2023). Inhibición del crecimiento in vitro de *Bacillus* spp sobre hongos asociados al proceso de fermentación en cacao. *Manglar (Tumbes)*, 20(3), 233-238. <https://doi.org/10.57188/manglar.2023.026>
- Cedeño-Alcivar, D. y Vera-Macías, L. (2019). Efecto antagonista in vitro de *Bacillus* spp sobre hongos filamentosos asociados a la fermentación del cacao (*Theobroma cacao L.*). [Tesis de posgrado, ESPAM MFL].
- Contreras Altahona, F., Jaimes Méndez, N., Gil Durán3, M. y Rojas Contreras, O. (2023). *Citotoxicidad de la ocratoxina A sobre la propagación celular de HepG2*. [Tesis de grado, Universidad de Pamplona].
- Delgado-Ospina, J., Molina-Hernández, J., Chaves-López, C., Romanazzi, G., & Paparella, A. (2021). The role of fungi in the cocoa production chain and the challenge of climate change. *Journal of Fungi*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/jof7030202>
- Delgado-Ospina, J., Molina-Hernandez, J., Viteritti, E., Maggio, F., Fernández-Daza, F., Sciarra, P., Serio, A., Rossi, C., Paparella, A., & Chaves-López, C. (2022). Advances in understanding the enzymatic potential and production of ochratoxin A of filamentous fungi isolated from cocoa fermented beans. *Food Microbiology*, 104. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.103990>
- Elías Silupu, J. W., García Rivas, C. E., Pérez Salcedo, R., & Yauris Silvera, C. R. (2021). Identificación de Ocratoxina A en vinos artesanales. *SENDAS*, 2(3), 1-13. <https://doi.org/10.47192/rccs.v2i3.65>
- Erazo Solórzano, C. Y., Bravo Franco, K. J., Tuárez García, D. A., Fernández Escobar, Ángel O., Torres Navarrete, Y. G. y Vera Chang, J. F. (2021). Efecto de la fermentación de cacao (*Theobroma cacao L.*), variedad nacional y trinitario, en cajas de maderas no convencionales sobre la calidad física y sensorial del licor de cacao. *Revista De Investigación Talentos*, 8(2), 42-55.
- Falconí, C., Yáñez-Mendizábal, V., Haro, R., & Claudio, D. (2023). Inoculum of a native microbial starter cocktail to optimize fine-aroma cocoa (*Theobroma cacao*) bean fermentation. *Agronomy*, 13(10). <https://doi.org/10.3390/agronomy13102572>
- Ghisolfi, R., Bandini, F., Vaccari, F., Bellotti, G., Bortolini, C., Patroni, E. y Morelli, L. (2023). Bacterial and fungal communities are specifically modulated by the cocoa bean fermentation method. *Foods*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/foods12102024>
- Gonzalez, H. H. L., Pacin, A., Resnik, S. L., Martinez, E. J. (1996). Deoxynivalenol and contaminant mycoflora in freshly harvested argentinian wheat in 1993. *Mycopathologia*, 135, 129-134.
- Guzmán-Armenteros, T., Ramos-Guerrero, L., Guerra, L., Weckx, S., & Ruales, J. (2023). Optimization of cacao beans fermentation by native species and electromagnetic fields. *Helijon*, 9(4). <https://doi.org/10.1016/j.helijon.2023.e15065>
- Kadjo, A., Beugre, G., Sess-Tchotch, D., Kedjebo, K., Mounjouenpou, P., Durand, N, Fontana, A., & Guehi, S. (2023). Screening of anti-fungal *Bacillus* strains and influence of their application on cocoa beans fermentation and final bean quality. *Journal of Advances in Microbiology*, 8-17. <https://doi.org/10.9734/jamb/2023/v23i1700>
- Konan, K., Coulibaly, I., Kouassi, K., Sthéphane, F., Coulibaly, A., & Konaté, I. (2024). Impact of new fermentation systems on the health quality of cocoa beans (*Theobroma cacao L.* 1753) in the main cocoa-growing regions of Côte d'Ivoire: Nawa, Bassassandra and haut-sassandra. *Journal of Advances in Microbiology*, 24(8), 35-51. <https://doi.org/10.9734/jamb/2024/v24i8845>
- Laranjo, M. (2021). *Fermentation: Processes, Benefits and Risks*. INTECHOPEN LIMITED.
- Marwati, T., Purwaningsih, Djaafar, T., Sari, A., & Hernani. (2021). Inhibition the growth of fungi and improving the quality of cocoa beans through fermentation using lactic acid bacteria. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 807. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/807/2/022048>
- Matute-Pinos, J. (2021). Aislamiento e identificación molecular de levaduras a partir de la fermentación de una mezcla de pulpa de frutas y granos de cacao de la variedad CCN-51. [Tesis de grado, Universidad del Azuay].
- Mendoza Salazar, M., & Lizarazo-Medina, P. (2021). Assessment of the fungal community associated with cocoa bean fermentation from two regions in Colombia. *Food Research International* (Ottawa, Ont.), 149. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110670>
- Nguyen, T. C., Hoang, T. T., & Nguyen, H. H. (2025). Evaluation of anti-*Aspergillus flavus* activity of lactic acid bacteria isolated from Vietnamese fermented cocoa beans. *Microbiology Research*, 16(6), 111. <https://doi.org/10.3390/microbiolres16060111>
- Oduro-Mensah, D., Lowor, S. T., Bukari, Y., Donkor, J. K., Minnah, B., Nuhu, A. H., Donto, D., Amadu, A. A., & Ocloo, A. (2023). *Cocoa-associated filamentous fungi for the biocontrol of aflatoxigenic *Aspergillus flavus**. *Journal of Basic Microbiology*, 63(11), 1279-1292. <https://doi.org/10.1002/jobm.202300163>
- Pitt, J. I., y Hocking, A.D. (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. 519, p. 388). New York: Springer. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Prendes, L. P. (2016). "Hongos filamentosos de uvas Malbec de la DOC San Rafael: potencial biocontrol de los productores de micotoxinas con levaduras del mismo ecosistema". [Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Cuyo].
- Rahayu, E., Triyadi, R., Khusna, R., Djaafar, T., Utami, T., Marwati, T., & Hatmi, R. (2021). Indigenous yeast, lactic acid bacteria, and acetic acid bacteria from cocoa bean fermentation in Indonesia can inhibit fungal-growth-producing mycotoxins. *Fermentation*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation7030192>

- Revista Gestión Digital. (2024). El cacao en su pico histórico de precio: ¿eso es bueno o malo para el Ecuador?. <https://revistagestion.ec/analisis-economia-y-finanzas/el-cacao-en-su-pico-historico-de-precio-eso-es-bueno-o-malo-para-el/>
- Subroto, E., Djali, M., Indiarto, R., Lembong, E., & Baiti, N. (2023). Microbiological Activity Affects Post-Harvest Quality of Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Horticulturae*, 9(7), 805. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9070805>
- Tigrero Vaca, J., Maridueña-Zavala, M., Liao, H., Prado-Lince, M., Zambrano-Vera, C., Monserrate-Maggi, B., & Cevallos-Cevallos, J. (2022). Microbial diversity and contribution to the formation of volatile compounds during fine-flavor cacao bean fermentation. *Foods*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/foods11070915>
- Viesser, J. A., de Melo Pereira, G. V., de Carvalho Neto, D. P., Favero, G. R., de Carvalho, J. C., Goés-Neto, A., Rogez, H., & Soccol, C. R. (2021). Global cocoa fermentation microbiome: revealing new taxa and microbial functions by next generation sequencing technologies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(7), 118. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03079-2>