

Antagonismo de microorganismos aislados a partir de la borra de café, generada en la Universidad EAFIT, sobre el crecimiento del hongo *Pleurotus* sp.

Vanesa Caro Miranda¹, Nicolás Pinel Peláez², Claudia Jaramillo-Mazo¹

¹Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad EAFIT. Medellín, Colombia.

²Grupo de Investigación en Biodiversidad, Evolución y Conservación (BEC), Universidad EAFIT. Medellín, Colombia.

Resumen

La creciente producción de café ha ido acompañada de un aumento en la cantidad de residuos sólidos generados a partir de su preparación, como lo es la borra de café. Actualmente existen alternativas de reutilización de la borra, entre ellas se encuentra el cultivo de hongos comestibles. Este estudio evaluó el potencial antagonico de los microorganismos asociados con la borra de café producida en la Universidad EAFIT, sobre el crecimiento de *Pleurotus ostreatus*, con la finalidad de aprovechar su reutilización como sustrato en el cultivo de hongos comestibles. Se recolectaron aleatoriamente muestras del sustrato antes y después de esterilizar para la realización de los experimentos utilizando técnicas microbiológicas estándar. Los microorganismos aislados incluyen especies de los géneros fúngicos *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Cladosporium* spp. Entre las especies de bacterias aisladas se encuentra *Empedobacter brevis* y *Wohlfahrtiimonas populi*. Comprender la interacción que se da entre *Pleurotus ostreatus* y microorganismos oportunistas presentes en el sustrato, y cómo estas interacciones influyen en varios aspectos de la producción, permitirán a futuro buscar alternativas para disminuir o manejar los microorganismos contaminantes, de tal manera que se pueda mejorar el proceso de producción del hongo *Pleurotus ostreatus*.

Palabras clave

Borra de café, hongos comestibles, residuo orgánico.

1. Introducción

El café es uno de los principales productos de la agroindustria colombiana, reconocido y ampliamente demandado a nivel mundial por sus características organolépticas y del cual se obtiene una producción total de aproximadamente 14 millones de sacos (sacos de 60 kg)

anuales, lo cual le permite a Colombia posicionarse como el tercer mayor productor de café del mundo (8,05% de la producción mundial) en 2019 después de Brasil (33,23%) y Vietnam (17,40%) (International Coffee Organization [ICO], 2020). Para ese mismo año, el consumo anual de café se estimó en 164,53 millones de sacos entre países importadores y exportadores, siendo Colombia el séptimo país con mayor tasa de consumo anual (4,05%) con un consumo de aproximadamente 2 millones de sacos (ICO, 2021). No obstante, el gran volumen de café producido y procesado por la industria cafetera da como resultado la generación de una amplia cantidad de desechos; entre los subproductos de la cadena de producción de café se encuentra la cáscara, el mucílago, la pulpa y la borra de café. De acuerdo con Tehrani et al. 2015, la mayor parte de los desechos generados hacen referencia a la borra de café o “Spent Coffee Ground” (SCG), este es un residuo sólido el cual se produce durante el consumo después de la filtración en papel de filtro o por proceso de filtración en máquinas de café. Se estima que, en promedio, se generan 650 kg de borra por cada tonelada de granos de café (Murthy y Naidu, 2012). Alrededor del 50% de SCG, es generado por la industria del café soluble, especialmente las cadenas de cafeterías, mientras que el consumo interno representa el resto (Scully et al., 2016). Para la eliminación de SCG se manejan diversos procedimientos, entre ellos la descarga en alcantarillado y rellenos sanitarios, lo que implica la contaminación de cuerpos de agua y suelos alrededor de las unidades de producción, pudiendo representar un problema ambiental para los países productores y consumidores si es que estos desechos no se tratan adecuadamente (Cruz et al., 2012). Sin embargo, la composición química del SCG permite su reutilización como sustrato en procesos biotecnológicos de los cuales se deriva la producción de etanol, compuestos aromáticos volátiles, enzimas, hongos comestibles, carotenoides, entre otros, generando productos de valor agregado que reducen los riesgos causados por los desechos (Mussatto et al., 2011).

En su estudio, Valencia y Alamá (2009) mencionan que “el uso del café para cultivar hongos no es un enfoque nuevo”, desde la década de los 90, se han realizado diversos estudios acerca del cultivo de hongos del género *Pleurotus* sp. en las zonas cafeteras de Colombia. También se ha evaluado la borra de café como posible sustrato para la inoculación y cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Carrasco-Cabrera et al., 2019; Alsanad et al., 2020; Ropciuc et al., 2016). Las propiedades químicas y estructurales del SCG permiten su reutilización debido a su alto contenido en celulosa (12,4 g / 100 g de producto seco), hemicelulosa (39,10 g / 100 g de materia seca), lignina (23,90 g / 100 g de producto seco), nitrógeno (12,79 g / 100 g de producto seco), fibra dietética (60,40 g / 100 g de producto seco) (Jeena et al., 2014).

El hongo *Pleurotus ostreatus* perteneciente al Phylum Basidiomycota, Orden Agaricales; es uno de los hongos comestibles mayormente cultivados a nivel mundial con un equivalente al 19% de la producción total (Royse et al., 2017). Sus importantes cualidades gastronómicas lo convierten en un alimento con alto impacto nutricional (Cheung, 2010; Carrasco-Cabrera et al., 2019), que es ampliamente producido gracias a que tiene un rendimiento de crecimiento alto en una gran cantidad de tipos de sustratos, algunos de los cuales no necesitan ningún tipo de suplementación (Gonçalves et al., 2010; Siqueira et al., 2012). Por lo tanto, es posible cultivar hongos ostras, teóricamente, en cualquier tipo de residuo agrícola y los residuos de café siendo sustratos con una composición rica en nutrientes, permiten que el cultivo de hongos ostra sea óptimo sin necesidad de una suplementación en grandes cantidades.

Cuando se pretende cultivar hongos, la esterilización del sustrato es un paso importante para evitar la contaminación y promover el crecimiento de micelio para así obtener el máximo rendimiento y evitar pérdidas, no obstante, su producción artesanal en condiciones externas a laboratorio no siempre permite cumplir con este proceso de esterilización.

Aunque Khan et al., (2011) afirman que la esterilización del sustrato es el método más apropiado para un cultivo eficaz de hongos y para eliminar la existencia de varios microorganismos no deseados, se sabe que éste no es un proceso 100% eficiente porque la eliminación de contaminantes depende de la población microbiana presente en el sustrato y qué tan buena aireación se le da luego de salir de la autoclave (Ahmed et al., 2020). Las bacterias y hongos que sobreviven al proceso de esterilización podrían disminuir el rendimiento de producción del hongo comestible o en casos extremos ser patógenos humanos potenciales, por eso es necesario disminuir su carga en el sustrato durante el proceso de esterilización, de tal manera que el proceso de producción sea exitoso.

Por todo lo anterior, esta investigación pretende explorar el potencial efecto de inhibición en el crecimiento *in vitro* del hongo *Pleurotus* sp., por microorganismos aislados a partir de borra de café. Ésto debido a que dentro del campus de la Universidad EAFIT se producen grandes cantidades de este subproducto de café (2 toneladas mensuales, comunicación interna Universidad EAFIT), provenientes de los cafetines dispersos alrededor de toda la universidad y las cafeterías dentro de la misma. Al utilizar un desecho generado en el mismo campus y convertirlo en un producto biotecnológico comestible, podremos estar un paso más cerca hacia un campus de circuito cerrado. Estos hongos comestibles se pueden cultivar sin la necesidad de suelos buenos, espacios abiertos o grandes cantidades de insumos de fertilidad pues solo es

necesario un espacio adecuado para su crecimiento. Sin embargo, dada la importancia de los microorganismos contaminantes en la producción de setas comestibles, existe información limitada sobre cómo las poblaciones fúngicas y bacterianas contaminantes presentes en la borra de café afectan el crecimiento del hongo. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto microbiano *in vitro* que tienen estos microorganismos oportunistas presentes en la borra de café sobre el crecimiento del hongo *Pleurotus* sp. Cumplir este objetivo permitirá avanzar en la comprensión de los fenómenos que ocurren durante la producción en cultivo de dicho hongo.

2. Metodología

2.1. Aislamiento y cultivo de *Pleurotus* sp.

Cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp., fueron colectados en Medellín (Antioquia, Colombia) en entornos naturales y trasladados al laboratorio de Biología Animal de la Universidad EAFIT. Con ayuda de un bisturí se realizaron cortes de aproximadamente 1 cm a los carpóforos del hongo *Pleurotus* sp., los fragmentos se sumergieron en hipoclorito de sodio al 1,5% durante 1 minuto, luego en etanol al 75% durante 30 segundos y finalmente se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de estos dos compuestos; todo esto con el objetivo de eliminar patógenos superficiales. Finalmente, el tejido desinfectado se cultivó en medio Agar Papa Dextrosa (PDA (ITW Reagents)) (suplementado con ácido láctico al 0,2%) para evitar el crecimiento de bacterias contaminantes. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente por 10-15 días y se repicaron para obtener aislados del hongo.

2.2. Preparación del sustrato y verificación del crecimiento fúngico.

Para la fase intermedia, se realizó un proceso de estandarización en el cual se prepararon en tarros de vidrio 50g de arroz cocido mezclado con 30 ml de agua destilada estéril y acidificados con ácido láctico al 0,2%, se esterilizaron a 121°C por 15 minutos y se inoculó el 1% del micelio del hongo contenido en las cajas de Petri con medio PDA (ITW Reagents), los tarros se sellaron con tres capas de gasa estéril y una capa de aluminio estéril con pequeñas aberturas para permitir el intercambio de oxígeno, se dejaron incubando a temperatura ambiente por 15 días hasta observar una colonización total del sustrato por parte del micelio del hongo.

Las bolsas con borra de café se obtuvieron de los residuos de cafetines ubicados en la Universidad EAFIT. Para elaborar la mezcla del sustrato, se tomaron 400g de borra en 4 bolsas

de polipropileno y se esterilizaron en autoclave a 121°C por 30 minutos, luego de salir de la autoclave, se dejaron enfriar hasta alcanzar una temperatura de 28 – 30 °C y se mezclaron con 6% de Carbonato de Calcio. Posteriormente las bolsas con borra fueron inoculadas, con el equivalente al 5% de peso total, de micelio fúngico crecido previamente en arroz. Las bolsas fueron incubadas a temperatura ambiente (23 a 26°C) y conservadas a una humedad relativa de 40 a 60% bajo condiciones de oscuridad hasta el desarrollo completo del micelio en el sustrato. Luego se incubaron en condiciones de luz por 12 horas y oscuridad por 12 horas para el desarrollo de los cuerpos fructíferos.

2.3. Aislamiento de ADN y caracterización molecular de la cepa de *Pleurotus*.

El aislado fue transferido a un Erlenmeyer con 25ml de medio líquido YPD (Extracto de levadura, Peptona, Dextrosa), el cual fue incubado a una temperatura de 27+/-1°C en agitación constante (90rpm) por 5-7 días. El ADN total se obtuvo del micelio utilizando la técnica de fenol-cloroformo/CTAB. El ADN resultante fue cuantificado con un nano-espectrofotómetro. Se utilizó el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar los marcadores ITS 1-4 y Factor de Elongación (EF) 1-2.

Los programas de amplificación que se implementaron fueron: para ITS 1-4; 5 min a 95 ° C, 35 ciclos x (1 min 94 ° C, 1 min 55 ° C, 2 min 72 ° C), 5 min a 72 ° C. Para EF; 5 min a 95 ° C, 35 ciclos x (1 min 94 ° C, 55 seg 50.1 ° C, 2 min 72 ° C), 5 min a 72 ° C. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador (BioRad Technologies). Los productos amplificados fueron visualizados por medio de una electroforesis en un gel de agarosa a una concentración de 1.2% y las fotografías fueron documentadas usando un fotodocumentador (ENDURO™), para su posterior envío al servicio de secuenciación Sanger en las instalaciones de la Universidad de los Andes, Colombia. Los archivos AB1 obtenidos de la secuenciación fueron analizados (recortando bases por debajo de P20 y ensamblados para obtener consenso) utilizando el software BioEdit versión 7.2, para luego ser analizadas con la herramienta BLAST del NCBI (National Center for Biotechnology Information - EE. UU.) y así obtener las secuencias con alineaciones significativas.

2.4. Aislamiento de microorganismos oportunistas presentes en la borra de café.

A partir de 4 bolsas con 300g de borra de café, se tomaron 10 gramos de cada una de ellas antes de esterilizar y pasadas 24 horas de haber sido esterilizadas. Estas muestras fueron usadas como sustrato madre para realizar diluciones 1:2 e inocular 100 µl de cada dilución en cajas Petri con medio de cultivo Agar Nutritivo (ITW Reagents) para determinar el crecimiento bacteriano y Papa Dextrosa Agar (PDA) (ITW Reagents) para determinar el crecimiento fúngico. Los cultivos se prepararon por triplicado

Transcurridas 24 horas, se realizó verificación y conteo del crecimiento bacteriano en Unidades formadoras de colonia y pasados 4-5 días se verificó el crecimiento fúngico. Las colonias que crecieron al final de cada incubación fueron contadas y expresadas en Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC/g) discriminadas entre bacterias y hongos. Posterior al periodo de incubación en las cajas de Petri, se purificaron todos los morfotipos viables de hongos y bacterias obtenidos del sustrato, realizando inoculación en los medios de cultivo anteriormente mencionados. Se realizaron caracterizaciones morfológicas a nivel macroscópico y a nivel microscópico con el objetivo de identificar de manera general estos microorganismos aislados.

El análisis macroscópico de los hongos se llevó a cabo observando la morfología, el diámetro, el color (pigmentación), la textura y el aspecto de la superficie de la colonia. El análisis microscópico se realizó mediante el método de montaje en húmedo y mediante la observación de estructuras reproductivas sexuales y asexuales como esporangios, esporas, conidios y micelio vegetativo (hifas septadas o no septadas). Para ello, se usó una gota de Azul de lactofenol en un portaobjetos limpio de forma aséptica y se introdujo en él un trozo del crecimiento del hongo; paso seguido, los portaobjetos se cubrieron suavemente con un cubreobjetos para evitar burbujas de aire y permitir su visualización por microscopía óptica. Las características observadas se registraron y compararon con la clave de identificación establecida por Barnett y Hunter (1972).

Las distintas colonias viables de bacterias se describieron de acuerdo con su color, forma, textura y posteriormente tiñeron con Gram y se examinaron al microscopio para observar su coloración.

2.5. Experimento de antagonismo *in vitro* entre *Pleurotus* sp., y microorganismos aislados desde la borra de café

Se evaluó el crecimiento e inhibición del hongo *Pleurotus* sp. *in vitro* en presencia de los microorganismos obtenidos a partir del proceso de aislamiento. El procedimiento desarrollado se explica a continuación:

- Inoculación *Pleurotus* sp. y bacterias aisladas: Para evaluar la interacción con bacterias, se siguió la metodología del cultivo dual descrita por Passera et al., 2017. En cajas Petri con medio de cultivo TGYA (Tryptone-Glucose-Yeast Extract Agar), se inoculó el hongo *Pleurotus* sp. en el centro de esta y simultáneamente, en cajas Petri independientes para cada morfotipo, se impregnaron discos de papel filtro con la solución bacteriana en cuatro puntos equidistantes. Paso seguido, se registró fotográficamente y midió el crecimiento del hongo 5 y 9 días posteriores a la inoculación. Este mismo proceso fue llevado a cabo, realizando la inoculación de las bacterias 2 días posterior a la inoculación del hongo en el medio de cultivo, esto con la finalidad de explorar la respuesta de crecimiento del hongo considerando las diferencias en las tasas de crecimiento que éste tiene respecto a las bacterias. Como control negativo, se utilizaron cajas de Petri que contenían (C1) las cepas fúngicas solas y (C2) los hongos con discos de papel de filtro esterilizados. El crecimiento del hongo se midió 5 y 9 días después de la inoculación (dpi) como diámetro de crecimiento del micelio. Cada ensayo se llevó a cabo con cajas por triplicado y se realizaron medidas independientes para cada placa en cada tiempo de medición.
- Inoculación *Pleurotus* sp. y hongos aislados: se utilizó el método Dual Culture Test, propuesto por Qiu et al., 2017, en el cual se sembró primero la cepa de *Pleurotus* a un extremo de la caja de Petri y se dejó crecer por dos días, luego se sembró el hongo al otro extremo de la caja y se observó el crecimiento de ambos. Como control negativo, se utilizaron cajas de Petri solo con el inóculo de *Pleurotus*. El crecimiento del hongo, tanto en las cajas Petri en donde estaba en presencia de los otros hongos como en los controles, se midió 6 y 14 días después de la inoculación (dpi) como diámetro de crecimiento del micelio. Cada enfrentamiento dual se realizó por triplicado y las mediciones se realizaron de manera independientes para cada placa en los tiempos de medición establecidos.

Los enfrentamientos duales (Hongo-Hongo) se describieron de acuerdo con los lineamientos planteados por Rayner y Boddy (1988), usando las modificaciones propuestas por Barua et al., (2012) de esta manera:

- Cuando los micelios de ambos hongos inoculados se entremezclaron completamente entre sí, esto se definió como entremezclado neutro (N).
- Cuando los hongos mostraron por primera vez inhibición de la zona de contacto, pero luego se entremezclaron, esto se definió como Ci(N).
- Cuando cualquiera de los hongos inoculados invadió más allá de la zona de contacto hacia la región micelial de los otros hongos y la invasión se detuvo en unos pocos centímetros, esto se definió como un punto muerto competitivo (Dc).
- Cuando se formó una zona de contacto entre los micelios de los dos hongos y se observó una baja densidad micelial detrás de la zona de contacto, esto se definió como un punto muerto antagonista (Da).
- Cuando se observó una inhibición significativa del crecimiento de cualquiera de los dos hongos antes de que el micelio de ambos entrara en contacto, esto se definió como un punto muerto de inhibición (Di).
- Cuando el micelio de cualquiera de los hongos cubrió la colonia del otro hongo en la caja de Petri, esto se definió como recubrimiento (R).

2.6. Análisis estadístico

Los datos colectados a partir de las mediciones de diámetro fueron almacenados y organizados de acuerdo con los tratamientos y a los dos momentos de lectura definidos para los experimentos. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa estadístico R (R Core Team, 2021). Se realizó la prueba de t de Student y la prueba de Tukey con un 95% de confianza, para expresar los valores numéricos.

3. Resultados y discusión

3.1. Fructificación de *Pleurotus* sp. en borra de café

Cuerpos fructíferos de siete (7) centímetros de alto y ocho (8) centímetros de ancho fueron recolectados del sustrato después de 45 días de incubación (Figura 1.), cuyas características coinciden con los caracteres más representativos de las cepas de *Pleurotus* reportadas en la literatura por Miles y Chang (2004). El basidiocarpo presenta coloración crema a marrón, el píleo es deprimido, el himenio es blanquecino y el estípite es excéntrico. La medición de

eficiencia biológica no se llevó a cabo pues no era objetivo del presente estudio. No obstante, Ropciuc et al., (2016) reportan que los hongos cultivados sobre residuos de café aprovechan bien el sustrato, obteniendo una eficiencia biológica del 41,86%, siendo una importante fuente de proteínas desde el punto de vista nutricional.

Después de que hubo fructificación y la bolsa estuviera completamente colonizada por el micelio, a los pocos días surgió una contaminación de coloración verdosa en la bolsa (Figura 2.), afectando también los primordios de cuerpos fructíferos que se encontraban desarrollándose en ese momento. Esta contaminación fue aislada y purificada obteniendo cuatro diferentes morfotipos, los cuales se nombraron de la siguiente manera: H0012, H013, H014, H015 para luego ser sometidos a experimento de cultivo dual con *Pleurotus*. Oseni et al., (2012) encontraron esta misma coloración en las bolsas de sustrato y concluyeron que los contaminantes más abundantes fueron *Penicillium* sp. y *Trichoderma* sp. Este último, también conocido como moho verde, es un hongo filamentoso que frecuentemente contamina los sustratos de los hongos y que a menudo se observa en las primeras etapas del proceso de cultivo, especialmente durante el período de reproducción, pero también durante el período de fructificación generando grandes pérdidas en los cultivos de hongos comestibles (Jandaik y Guleria, 1999) Estos hongos producen varias enzimas involucradas en la degradación de las paredes celulares de los hongos que pueden contener quitinasas y glucanasas (Ait-Lahssen et al., 2001). Balasubramanya & Kathe (1996) informaron que estas especies de microorganismos (*Penicillium* sp. y *Trichoderma* sp.) compiten con *Pleurotus* sp., después de la pasteurización probablemente debido a que el sustrato se descompone parcialmente, poniéndolo a disposición de los competidores. Mazumder & Rathaiah (2001) informaron sobre contaminantes similares en sustratos de hongos ostra.



Figura 1. Basidiocarpo de Pleurotus sp.



Figura 2. Contaminación de coloración verdosa encima del micelio de Pleurotus sp. el sustrato de borra de café.

3.2. Caracterización molecular de *Pleurotus* sp y bacterias que inhiben su crecimiento

A partir del ADN genómico aislado de *Pleurotus* se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 650 pares de bases en la amplificaron con marcadores de ITS 1- 4 y EF. Las secuencias obtenidas para ITS y EF, analizadas en la herramienta Standard Nucleotide BLAST del NCBI, arrojaron resultados con un porcentaje de identidad del 99,68% para *Pleurotus ostreatus* strain ICMP 11679.

Adicionalmente, se llevó a cabo la amplificación de 16S y la posterior secuenciación para las cepas de bacterias B003 y B004, ya que estas tuvieron un impacto marcado en el crecimiento de *Pleurotus* sp. Encontramos que la cepa B004 tentativamente corresponde a la especie *Empedobacter brevis*, con una identidad del 100% de acuerdo a la información obtenida del NCBI y la cepa B003 corresponde a la especie *Wohlfahrtiimonas populi* igualmente con una identidad del 100%; al revisar las características genómicas de *E. brevis* se observa que tiene la capacidad de producir una amplia diversidad de metabolitos secundarios que podrían estar involucrados en los procesos de interacción que esta bacteria tiene en el ambiente en el que se desarrolla (Estreptomycin, Acarbosa, Novobiocina) (Kanehisa, 2002), puede que estos compuestos no necesariamente sean los que actúan en contra del micelio del hongo, no obstante es importante aclarar que la presencia de este tipo de metabolitos secundarios podría desempeñar un rol importante en procesos de interacción microbiana. Para el caso de *W. populi*, esta pertenece al Phylum Proteobacteria y es aerobia facultativa, es muy poca la información que se puede encontrar sobre esta especie por lo que no se puede decir exactamente cómo influye de manera específica en el crecimiento de *Pleurotus*. Sus fuentes de aislamiento incluyen plantas y corteza de árboles (Li et al., 2017).

3.3. Caracterización de morfotipos aislados y determinación de su concentración

Se encontró una concentración de 6×10^2 UFC/g para bacterias en la borra sin esterilizar y una concentración de 1×10^3 UFC/g en la borra estéril. Para los hongos, se encontró una concentración de 532 UFC/g en la borra sin esterilizar y 3×10^2 UFC/g en la borra estéril. Debido a la complejidad de los materiales que se utilizan como sustrato para el cultivo de hongos comestibles y las variaciones dentro de los mismos sustratos, se ha encontrado un número considerable de especies microbianas, Shu-Ting y Miles, 2004 reportan una lista de algunos de los géneros comúnmente aislados en estos estudios, entre los cuales se encuentran microorganismos mesófilos como *Serratia marcescens*, termo tolerantes como *Pseudomonas* spp., *Bacillus licheniformis* y *Aspergillus fumigatus* e incluso termófilos como *Bacillus*

coagulans, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Mucor pusillus*. Estos hallazgos vuelven a corroborar la idea de que el proceso de esterilización no necesariamente elimina al 100% los microorganismos presentes en el sustrato y que la presencia de hongos y bacterias presentes en el sustrato estéril se atribuye a la presencia de esporas que fueron tolerantes al calor de la autoclave.

Un total de 16 morfologías fueron aisladas a partir de la borra de café. Cinco de estas corresponden a bacterias (Figura 3) y 11 a hongos (Figura 4). La descripción de los morfotipos obtenidos se presenta en las Tablas 1 y 2. Donde también se especifica si la cepa fue obtenida en el proceso previo o posterior a la esterilización, obteniendo como resultado 5 cepas luego de esterilizar, 11 cepas antes de esterilizar y 4 cepas obtenidas como contaminación luego de que el sustrato estuviese colonizado por el micelio de *Pleurotus ostreatus*. La descripción de algunos morfotipos de hongos no está completamente definida ya que fue difícil encontrar las estructuras reproductivas y/o esporas que indicaran un acercamiento a algún género en específico. Sin embargo, se pudieron diferenciar algunos géneros como *Penicillium*, *Aspergillus* y *Cladosporium* entre los contaminantes crecidos en el proceso de fructificación. Como los hongos ostra se cultivan en una amplia variedad de sustratos compuestos por desechos orgánicos que incluyen residuos agrícolas y forestales ricos en carbohidratos, es muy probable que sean invadidos por un amplio espectro de hongos y de mohos. Según Sánchez y Royse (2017), entre los mohos más comunes encontrados en estos tipos de sustratos se encuentran especies de *Mucor*, *Phialospora*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Momniella*, *Oedocephalum* y *Trichoderma*. Obire & Ogechi (2015) también reportan a *Aspergillus* como uno de los hongos invasores más frecuente en el sustrato para el cultivo de *Pleurotus*. Esto sugiere que los hongos encontrados en los resultados del presente estudio hacen parte del espectro de hongos invasores del sustrato de *Pleurotus*.

Estos autores indican que la infestación temprana por parte de estos competidores puede causar agotamiento de nutrientes, lo que conduce a una caída de hasta 70% en la productividad del cultivo afectado. Además, algunos de estos mohos invasores son capaces de producir productos químicos tóxicos que inhiben el crecimiento de la seta y afectan el rendimiento del cultivo. Esto puede explicar el por qué no hay una buena fructificación, a veces produciendo una pérdida total de la cosecha dependiendo de la etapa en que ocurra la infección. No obstante, en cualquier fase, un crecimiento indeseable de cualquier contaminante puede afectar adversamente el rendimiento final de hongos comestibles.

Bacterias

Código	Descripción	
B001	Coloración amarilla, colonias circulares, planas con margen entera. Cocos Gram positivos.	Obtenida en sustrato sin esterilizar
B003	Coloración rosácea, colonias circulares con margen irregular. Bacilos Gram negativos	Obtenida en sustrato sin esterilizar
B004	Coloración beige, colonias redondas con margen irregular. Bacilos Gram positivos.	Obtenida en sustrato sin esterilizar
B005	Coloración blanca, textura babosa, no se diferencian colonias. Bacilos Gram positivos.	Obtenida en sustrato sin esterilizar
B006	Coloración blanca, colonias circulares con margen regulares. Bacilos Gram negativos.	Obtenida en sustrato estéril

Tabla 1. Descripción de morfotipos bacterianos.

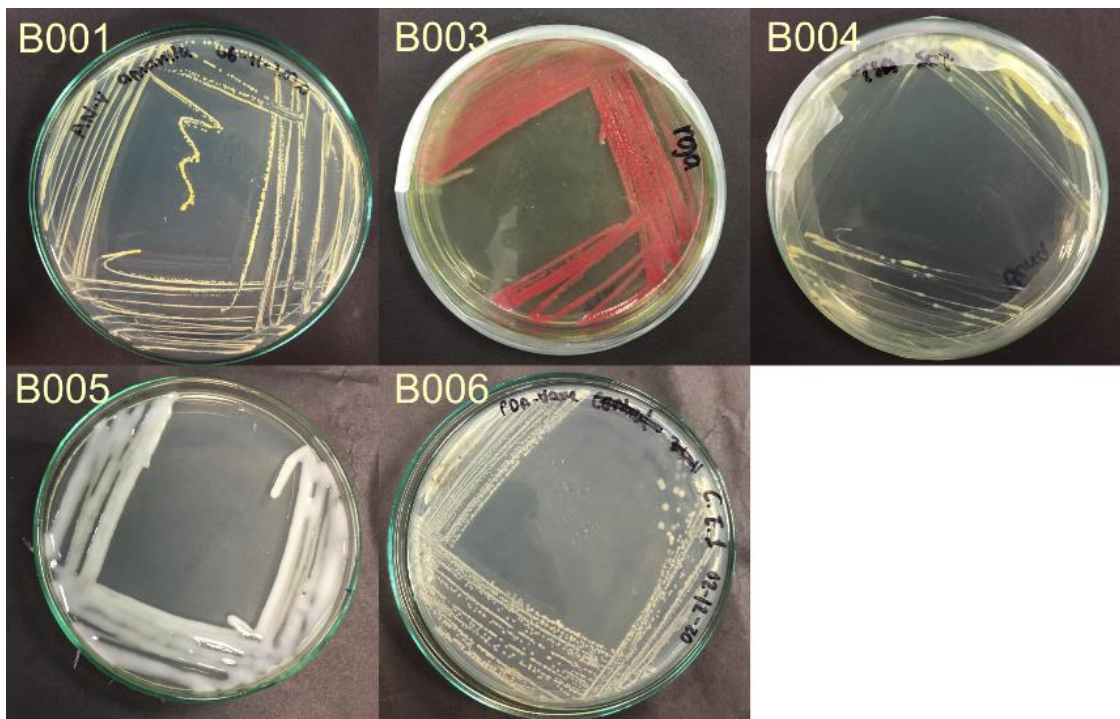


Figura 3. Morfotipos bacterianos aislados a partir de la borra de café.

Hongos

Código	Descripción	
H001	Hongo filamentoso de color verde lima con un tono más claro en el centro, textura pulverulenta, hifas septadas, esporas ovaladas, conidióforos que surgen del micelio individualmente ramificados cerca del ápice.	Obtenida en sustrato sin esterilizar
H002	Hongo filamentoso, presenta un recimiento irregular, color blanco con halos de color más intenso que resaltan a medida que crece.	Obtenida en sustrato sin esterilizar
H003	Hongo filamentoso, posee una coloración inicial blanca, pero después toma una coloración verdosa en el centro y blanca en los extremos. Hifas septadas con monofíalides.	Obtenida en sustrato sin esterilizar
H004	Hongo filamentoso de color blanco, textura fibrosa, crece simulando una raíz. Hifas cenocíticas con presencia de clamp connections.	Obtenida en sustrato sin esterilizar
H005	Hongo filamentoso de crecimiento lento, coloración verde grisácea.	Obtenida en sustrato estéril
H006	Hongo filamentoso de color blanco, textura algodonosa, hifas cenocíticas con presencia de clamp connections.	Obtenida en sustrato sin esterilizar
H007	Hongo filamentoso de color blanco, crecimiento irregular, con agrupaciones en el centro y crecimiento más espaciado hacia el exterior.	Obtenida en sustrato sin esterilizar
H008	Hongo filamentoso de color verde, textura pulverulenta, hifas septadas, esporas redondas, conidióforos que surgen del micelio	Obtenida en sustrato sin esterilizar
H009	Hongo filamentoso, textura fibrosa, crecimiento radial, se oxida a medida que crece, tomando un color café pálido en el centro y blanco en el exterior. Hifas cenocíticas con presencia de clam connections.	Obtenida en sustrato estéril
H010	Hongo filamentoso, coloración verde con un halo más claro en el extremo, crecimiento lento, con grietas. Hifas septadas a partir de las cuales se forman cadenas de conidias por segmentación en forma de barril.	Obtenida en sustrato estéril
H011	Hongo filamentoso de coloración blanca con tonos verdes en el centro, textura granulosa. Hifas septadas que terminan en una hinchazón globosa.	Obtenida en sustrato estéril
H012	Hongo filamentoso de color verde, textura pulverulenta, hifas septadas, esporas circulares en hileras, conidióforos que surgen del micelio individualmente.	Obtenida en sustrato colonizado por <i>Pleurotus</i>
H013	Hongo filamentoso de color verde turquesa con un halo blanco en el exterior, hifas cenocíticas, esporas circulares, conidióforos erguidos, simples, que terminan en una hinchazón globosa, que llevan fiálides en el ápice o irradian desde el ápice o toda la	Obtenida en sustrato colonizado por <i>Pleurotus</i>
H014	Hongo filamentoso, color grisáceo con un halo blanco en el exterior, crecimiento regular, conidióforos altos, erguidos, ramificados diversamente cerca del ápice, agrupados o solos; ovoides a cilíndricos e irregulares, algunos típicamente con forma de limón.	Obtenida en sustrato colonizado por <i>Pleurotus</i>
H015	Hongo filamentoso de color blanco, textura algodonosa.	Obtenida en sustrato colonizado por <i>Pleurotus</i>

Tabla 2. Descripción de morfotipos fúngicos.

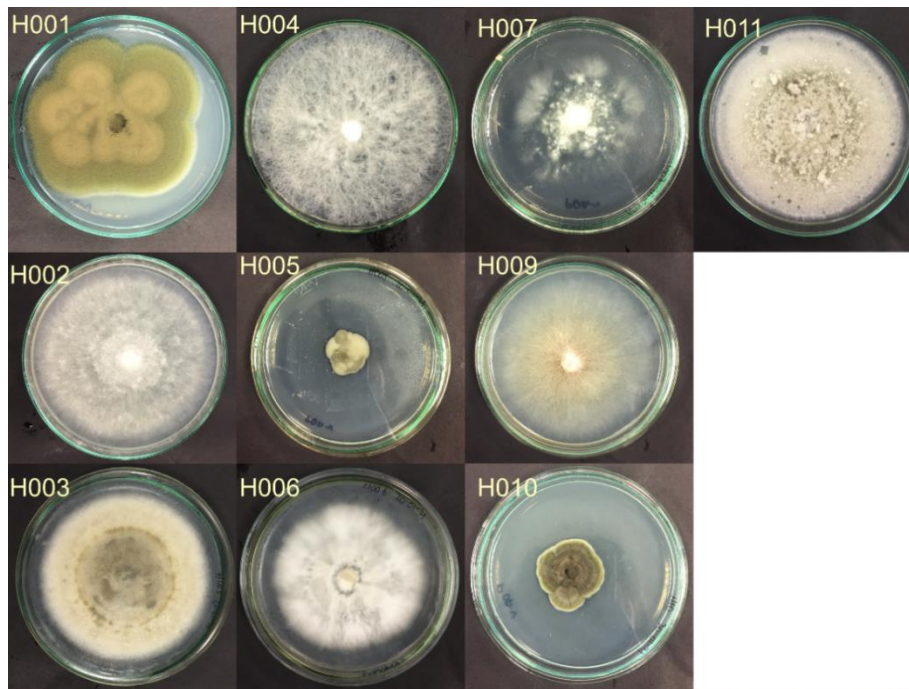


Figura 4. Morfotipos fúngicos aislados a partir de la borra de café.

3.4. Experimento de antagonismo *in vitro* entre *Pleurotus* sp. y microorganismos aislados desde la borra de café

Las mediciones diametrales de *Pleurotus* sp. en los experimentos con bacterias y hongos se muestran numéricamente en las Tablas 3 y 4 y visualmente en las Figuras 5, 6 y 7, el porcentaje de inhibición se obtuvo con las mediciones del último día (día 9 para bacterias y día 14 para hongos). Los enfrentamientos *Pleurotus ostreatus* – Bacteria permitieron detectar que el hongo tuvo una disminución de su crecimiento con respecto al control, cuando estaba en presencia de las cepas B006 y B003. En ninguno de estos dos casos se observa un crecimiento del micelio por encima de la colonia bacteriana, por esto, se hipotetizó que posiblemente haya inhibidores bien sea volátiles o disueltos en el medio de cultivo, por lo cual sería interesante validar en futuros estudios, si efectivamente éste fue el mecanismo usado por la bacteria para detener el crecimiento del hongo. En cuanto a las cepas B001, B004 y B005 en el experimento donde fueron inoculadas 2 días después que el hongo *P. ostreatus* (T2), se puede observar que el micelio es capaz de crecer por encima de las colonias bacterianas, mientras que cuando se inocularon al mismo tiempo con el hongo (T0), parece haber un efecto inhibitor. Esto puede deberse a que en el experimento T2, el hongo pudo sobrepasar su etapa de adaptación en el medio de cultivo sin ningún tipo de estrés o amenaza competitiva, lo que posiblemente le dio tiempo de tomar mayor cantidad de nutrientes que en T0 y, por consiguiente, ser capaz de reaccionar desarrollando mecanismos de defensa. Por su parte, es poco el conocimiento

investigativo registrado sobre la existencia de interacciones entre los potenciales contaminantes procariotas sobre el crecimiento de *P. ostreatus*.; algunos investigadores (Cho et al., 2002) reportan un efecto positivo sobre el crecimiento micelial de *P. ostreatus* inducido por la presencia de *Pseudomonas fluorescens*.

Los resultados correspondientes al ensayo de hongos, nos muestra que *Pleurotus ostreatus* crece de manera similar en la mayoría de los tratamientos a excepción de H001, H002, H004 y H012, los cuales muestran una inhibición marcada en el crecimiento de *Pleurotus* por parte de los hongos antagonistas desde la primera medición. En la medición realizada en el día 14, se pueden observar cambios drásticos en las medidas de todos los hongos, H003, H006 y H009, exhiben un crecimiento hasta la mitad de la caja de Petri, en donde ni el micelio de *Pleurotus*, ni el micelio de los hongos crece más allá de la zona de contacto, indicando una interacción de tipo neutralista, ya que no hay beneficio ni daño para ambos (Rayner y Boddy, 1988).

Cepa bacteriana	Medición	T0 (cm)	T2 (cm)	Porcentaje de Inhibición
C1	5 dpi	3.3		
	9 dpi	8.4		
C2	5 dpi	3.4		
	9 dpi	8.6		
B001	5 dpi	5.1	3.5	
	9 dpi	7.7	7.3	12
B003	5 dpi	4.4	3.4	
	9 dpi	4.6	5.8	39
B004	5 dpi	4.6	4.2	
	9 dpi	6.1	7.5	20
B005	5 dpi	2.5	3.2	
	9 dpi	7.3	8.3	8
B006	5 dpi	3.2	2.9	
	9 dpi	4.2	4.2	51

Tabla 3. Resultados de los ensayos de antagonismo en cultivo dual. Para cada una de las bacterias se informan los resultados del diámetro de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* medido a los 5 y 9 días después de la inoculación (dpi). Los resultados se organizan en columnas según el tratamiento al que se refieren: C1 (*Pleurotus* solo), C2 (*Pleurotus* + discos de papel filtro), T0 (cepa bacteriana inoculada el mismo día que *Pleurotus*), o T2 (cepa bacteriana inoculada 2 días después que *Pleurotus*) y porcentaje de inhibición de cada cepa.

Cepa fúngica	Medición	T0 (cm)	Interacción micelar en el medio	Porcentaje de Inhibición
C1	6 dpi	5.7		
	14 dpi	9		
H001	6 dpi	4.3		
	14 dpi	5.2	Dc	42
H002	6 dpi	4.3		
	14 dpi	4.4	Di	51
H003	6 dpi	5.4		
	14 dpi	7.0	Da	22
H004	6 dpi	4.7		
	14 dpi	4.9	Da	46
H005	6 dpi	5.4		
	14 dpi	8.8	R	2
H006	6 dpi	5.7		
	14 dpi	7.0	Ci(N)	22
H007	6 dpi	5.3		
	14 dpi	7.0	R	22
H008	6 dpi	4.9		
	14 dpi	6.3	Di	30
H009	6 dpi	5.3		
	14 dpi	6.8	Ci(N)	24
H010	6 dpi	5.3		
	14 dpi	7.8	Dc	13
H011	6 dpi	5.1		
	14 dpi	6.9	R	23
H012	6 dpi	2.5		
	14 dpi	3.4	Dc	62
H013	6 dpi	4.9		
	14 dpi	5.9	Di	34
H014	6 dpi	4.5		
	14 dpi	4.6	Di	49
H015	6 dpi	5.3		
	14 dpi	6.2	Di	31

*Tabla 4. Resultados de los ensayos de antagonismo en cultivo dual. Para cada una de las cepas fúngicas se informan los resultados del diámetro de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* medido a los 6 y 14 días después de la inoculación (dpi) y el tipo de interacción observada en la caja de Petri. Los resultados se organizan en columnas según el tratamiento al que se refieren: T0 (cepa fúngica inoculada el mismo día que *Pleurotus*), tipo de interacción y porcentaje de inhibición de cada cepa.*

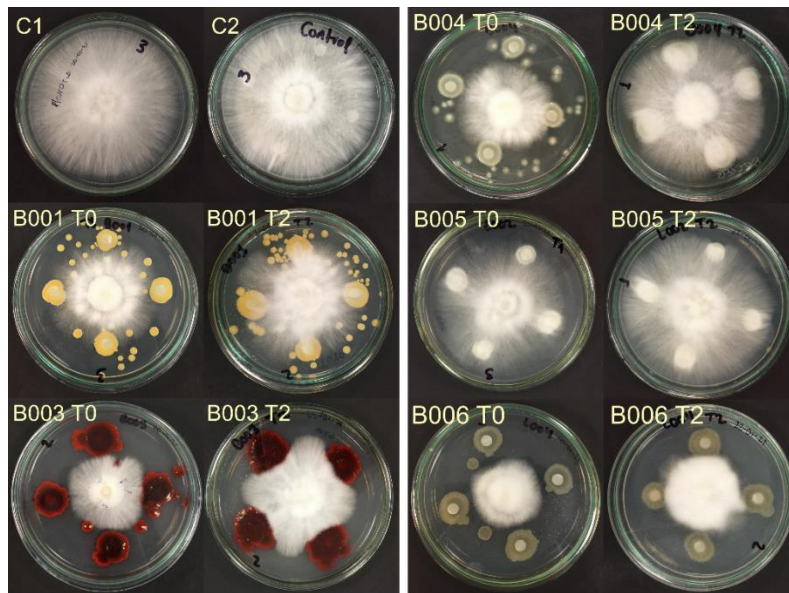


Figura 5. Comparación entre tratamientos de cultivo dual: *Pleurotus ostreatus* - bacterias aisladas del sustrato. Se muestran fotografías representativas por cada morfotipo al día 9. Tratamiento T0 (cepa de *Pleurotus* inoculada el mismo día que las bacterias) y tratamiento T2 (cepa de *Pleurotus* inoculada 2 días después que las bacterias) C1 representa el crecimiento del control negativo solo con el inóculo de *P. ostreatus* y C2 representa el crecimiento del control negativo con el inóculo de *P. ostreatus* y los discos de papel filtro.

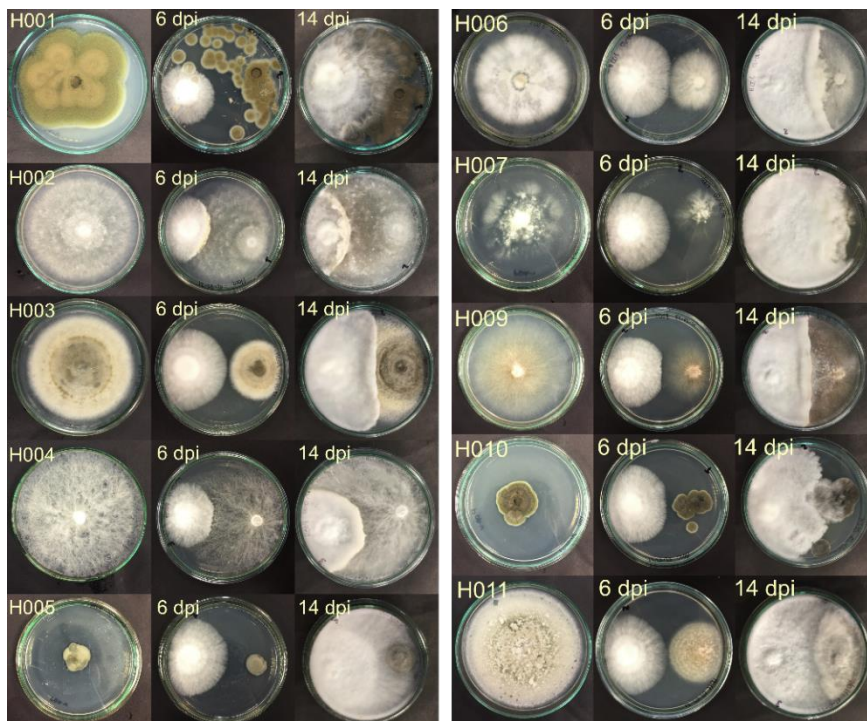


Figura 6. Comparación entre tratamientos de cultivo dual con la cepa de *Pleurotus ostreatus* y los hongos aislados del sustrato. Se muestran fotografías representativas por cada morfotipo, tomadas 6 y 14 días después de la inoculación.

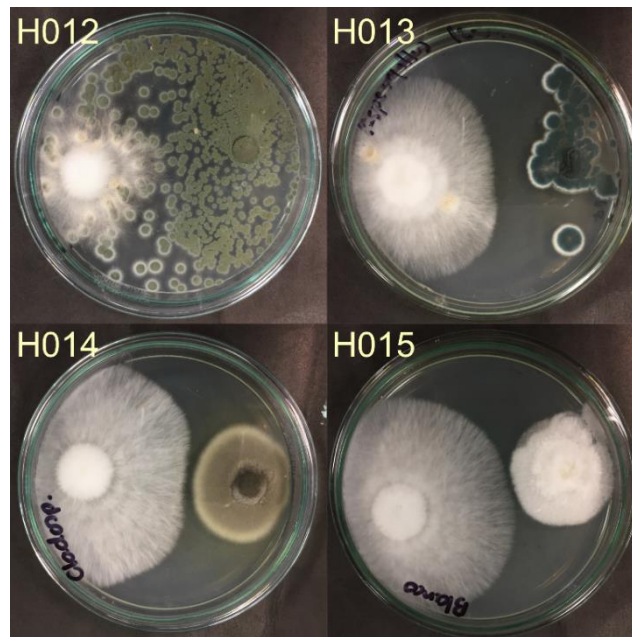


Figura 7. Comparación entre tratamientos de cultivo dual con la cepa de *Pleurotus* y los hongos aislados del sustrato colonizado por el micelio de *Pleurotus*. Se muestran fotografías representativas por cada morfotipo, tomadas 6 días después de la inoculación.

3.4.1. Análisis estadístico.

Se realizó la prueba de t de Student en R para el soporte estadístico (Anexo 1 y 2.) con un intervalo de confianza del 95%, verificando qué tan significativo era el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en los experimentos de cultivo dual en comparación con su crecimiento el control. Los resultados de esta prueba permitieron evidenciar que para el caso de las bacterias la que tuvo un efecto negativo en ambos experimentos fue B006. Adicional se realizó una prueba de Tukey con un coeficiente de confianza del 95%, la cual tiene como fin comparar las medias de todos los tratamientos en conjunto con el control. La prueba de Tukey, igualmente nos permite discernir si los resultados obtenidos son significativamente diferentes o no (Pulido et al., 2012). Se puede comprobar que los datos observados de manera visual coinciden con el análisis realizado mediante la prueba de Tukey, en donde para los hongos, H001, H002, H004 y H0012, el crecimiento micelial se ve disminuido incluso desde la primera lectura (6 dpi) (Figura 8), observándose de una forma más evidente a los 14 dpi (Figura 9.). Para el caso de las bacterias en T0, nos damos cuenta de que en el experimento de enfrentamiento entre B006 y *Pleurotus*, este último presenta menor crecimiento respecto a los controles, lo cual también es evidente en su enfrentamiento con los aislados, B001, B003 y B004 (Figura 10.). Sin embargo, para la segunda lectura (9 dpi), solo B001 tiene un tamaño similar al de los controles,

mientras que las demás cepas, están por debajo (Figura 11.); esto nos sugiere que B001, puede tener un efecto positivo sobre el crecimiento de *Pleurotus*, al promover la expansión del micelio; esto coincide con los reportes de Velázquez-Cedeño et al., (2004) donde se menciona que existen bacterias que promueven el crecimiento del hongo comestible.

Para el ensayo en T2 con bacterias, se observa que *Pleurotus* crece de manera similar en todos los tratamientos en 5 dpi (Figura 12.), aunque en antagonismo con B004 parece que el hongo crece un poco más, no es un crecimiento significativo según la prueba de Tukey, mientras que, a los 9 dpi, observamos de nuevo un efecto inhibitorio significativo por la cepa B003 y B006 (Figura 13.); las demás cepas no presentan una inhibición significativa.

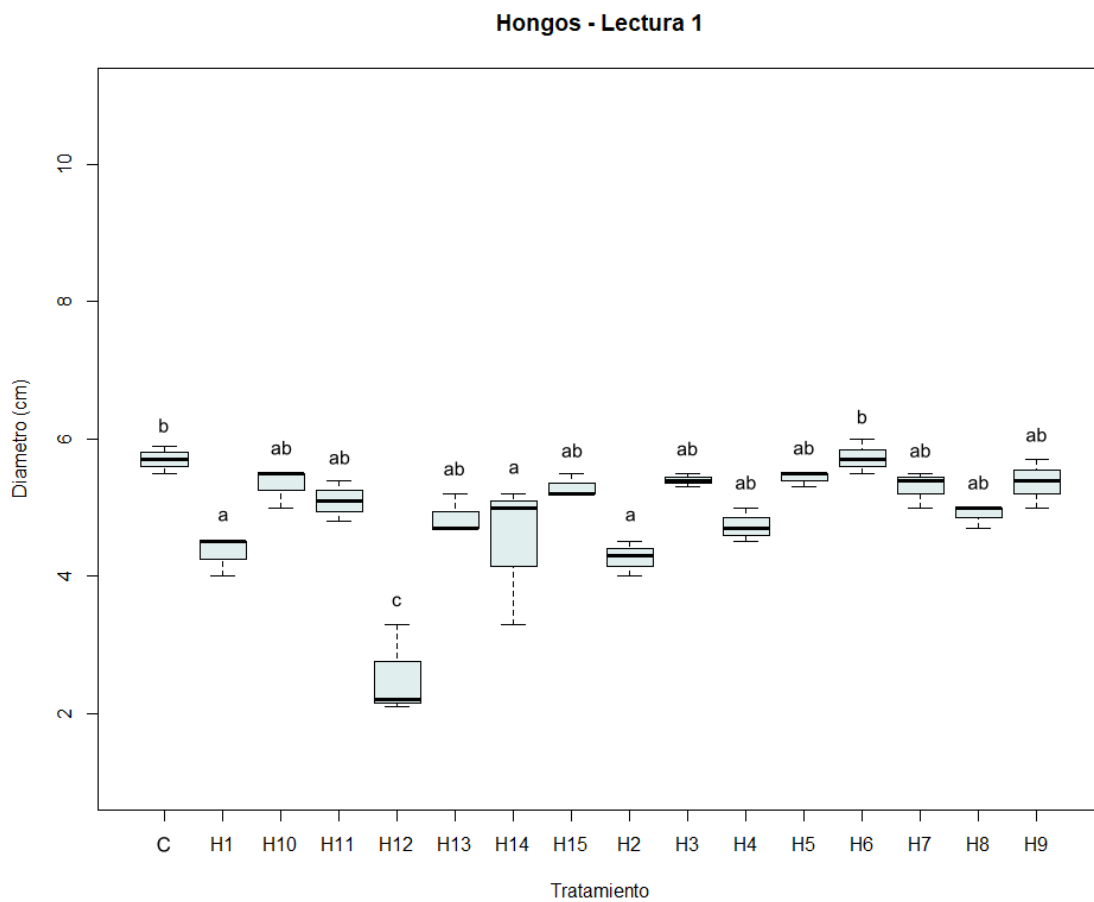


Figura 8. Medidas del experimento de interacción *Pleurotus ostreatus* – Hongo al día 6, expresadas en gráficos de caja. El eje Y corresponde al diámetro de *Pleurotus* medido y el eje X corresponde a cada tratamiento, siendo C el control.

Hongos - Lectura 2

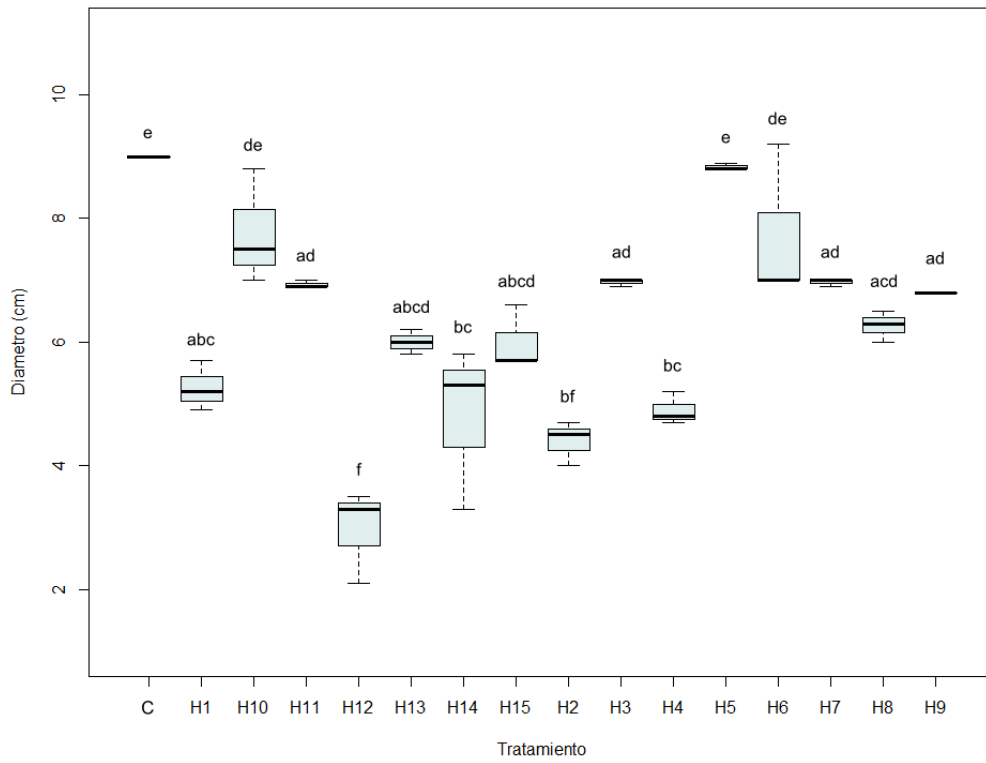


Figura 9. Medidas del experimento de interacción *Pleurotus ostreatus* – Hongo al día 14, expresadas en gráficos de caja. El eje Y corresponde al diámetro de *Pleurotus* medido y el eje X corresponde a cada tratamiento, siendo C el control.

Bacterias Experimento 1 - Lectura 1

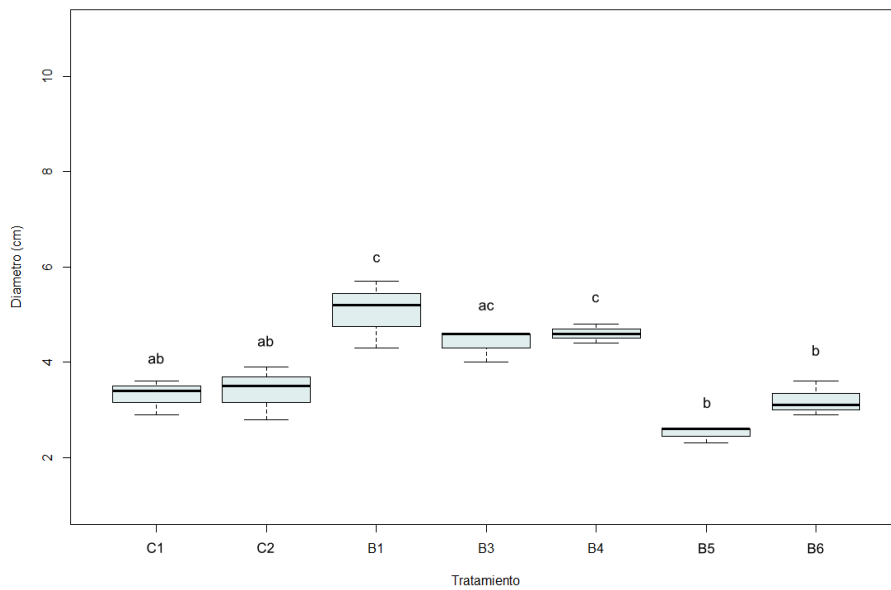


Figura 10. Medidas del experimento de interacción *Pleurotus ostreatus* – Bacteria T0 al día 5, expresadas en gráficos de caja. El eje Y corresponde al diámetro de *Pleurotus* medido y el eje X

corresponde a cada tratamiento, C1 representa el crecimiento del control negativo solo con el inóculo de *Pleurotus ostreatus* y C2 representa el crecimiento del control negativo con el inóculo de *Pleurotus ostreatus* y los discos de papel filtro.

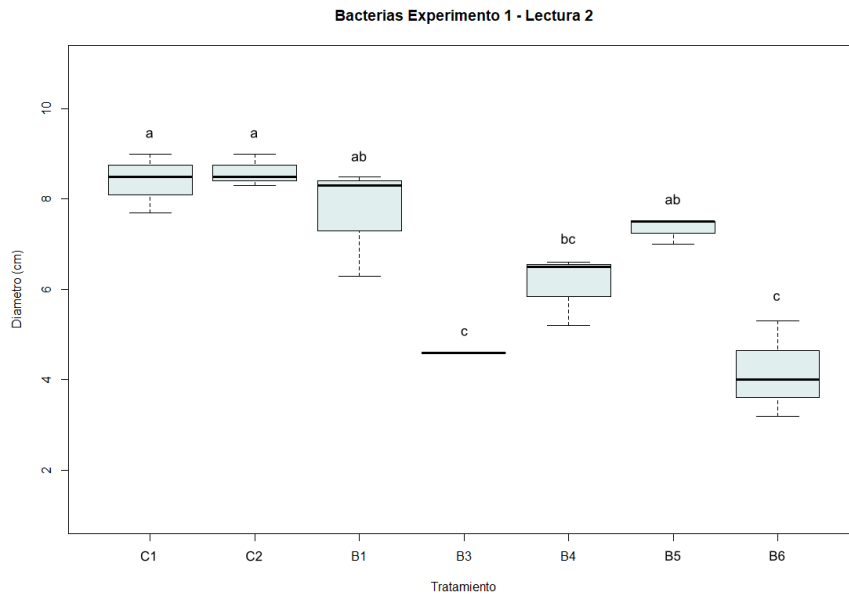


Figura 11. Medidas del experimento de interacción *Pleurotus ostreatus* – Bacteria T0 al día 9, expresadas en gráficos de caja. El eje Y corresponde al diámetro de *Pleurotus* medido y el eje X corresponde a cada tratamiento, C1 representa el crecimiento del control negativo solo con el inóculo de *Pleurotus ostreatus* y C2 representa el crecimiento del control negativo con el inóculo de *Pleurotus ostreatus* y los discos de papel filtro.

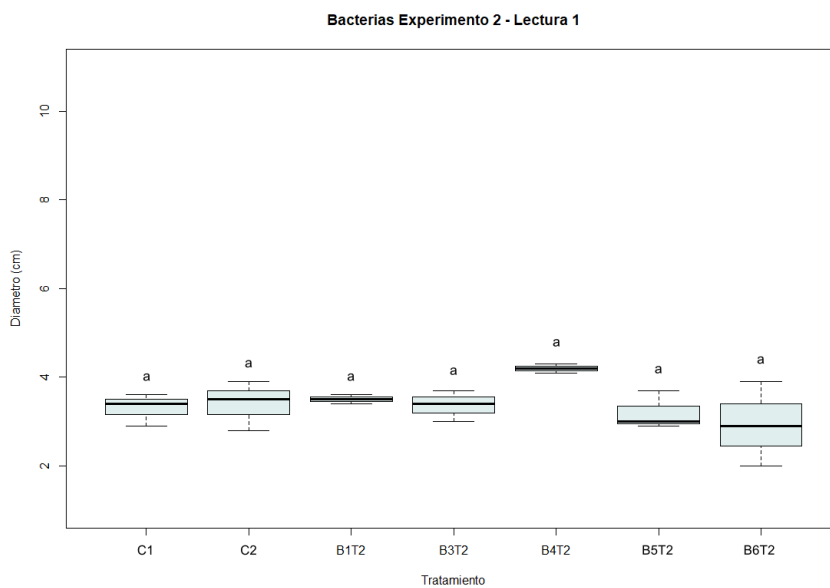


Figura 12. Medidas del experimento de interacción *Pleurotus ostreatus* – Bacteria T2 al día 5, expresadas en gráficos de caja. El eje Y corresponde al diámetro de *Pleurotus* medido y el eje X

corresponde a cada tratamiento, C1 representa el crecimiento del control negativo solo con el inóculo de *Pleurotus ostreatus* y C2 representa el crecimiento del control negativo con el inóculo de *Pleurotus ostreatus* y los discos de papel filtro.

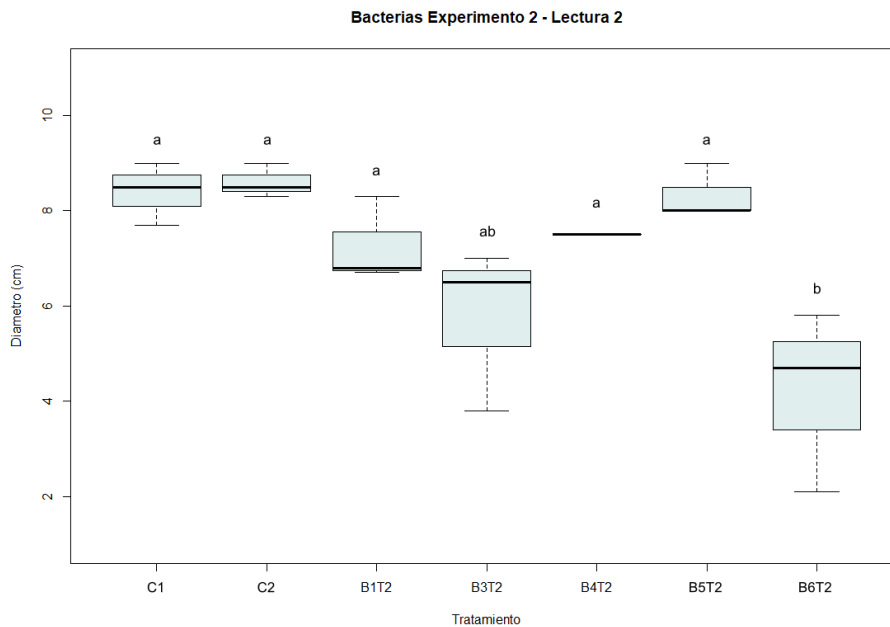


Figura 13. Medidas del experimento de interacción *Pleurotus ostreatus* – Bacteria T2 al día 9, expresadas en gráficos de caja. El eje Y corresponde al diámetro de *Pleurotus* medido y el eje X corresponde a cada tratamiento, C1 representa el crecimiento del control negativo solo con el inóculo de *Pleurotus ostreatus* y C2 representa el crecimiento del control negativo con el inóculo de *Pleurotus ostreatus* y los discos de papel filtro.

Conclusiones

El presente estudio ha revelado los tipos de hongos y bacterias que se asocian con la borra de café utilizada como sustrato en el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* en la Universidad EAFIT. Este cultivo sobre residuos de café puede considerarse una alternativa de producción local de comida en el campus de la Universidad. Sin embargo, se determinó que la mayoría de los microorganismos presentes en este sustrato, como *Penicillium* sp. pueden influir en el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* de una manera negativa, ya que disminuyen su tasa de crecimiento. Como se sabe que el proceso de esterilización no es 100% eficiente y que el nivel de contaminación depende del tamaño de la partícula del sustrato utilizado, es conveniente mezclar los residuos de café con diferentes sustratos que favorezcan la circulación del aire y por consiguiente la colonización completa por parte del micelio de *Pleurotus*. Estos resultados abren un escenario interesante para futuros estudios que determinen el efecto de

estos microorganismos asociados al sustrato de una manera más detallada, así como diferentes métodos de inoculación del hongo comestible en el sustrato que sean eficientes para su óptimo crecimiento. De la misma manera, una mejor comprensión de cómo cambian las comunidades microbianas en el cultivo de hongos y cómo estos cambios influyen en varios aspectos de la producción permitirán a futuro buscar alternativas para disminuir o manejar los microorganismos contaminantes, de tal manera que se pueda mejorar el proceso de producción del hongo *Pleurotus ostreatus* de manera artesanal a partir del uso de borra de café como sustrato principal para su desarrollo.

Referencias

- Ahmed, M. F., Rahman, M. J., Islam, M. N., Ullah, M. J., & Sarker, N. C. (2020). Effect of Substrate Sterilization and Spawning Method on the Yield and Yield Attributes of Milky White Mushroom (*Calocybe indica*). *Universal Journal of Plant Science* 8(2): 17-21.
- Ait-Lahsen, H., Soler, A., Rey, M., de la Cruz, J., Monte, E., & Llobell, A. (2001). An antifungal exo- α -1, 3-glucanase (AGN13. 1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5833-5839.
- Alsanad, M., Sassine, Y. N., El Sebaaly, Z., & Abou Fayssal, S. (2020). Spent coffee grounds influence on *Pleurotus ostreatus* production, composition, fatty acid profile, and lignocellulose biodegradation capacity. *CyTA-Journal of Food*, 19(1), 11-20.
- Balasubramanya, R. H., & Kathe, A. A. (1996). An inexpensive pretreatment of cellulosic materials for growing edible oyster mushrooms. *Bioresource Technology*, 57(3), 303-305.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi. *Illustrated genera of imperfect fungi.*, (3rd ed).
- Barua, B. S., Suzuki, A., & Hoang, P. N. D. (2012). Effects of different nitrogen sources on interactions between ammonia fungi and non-ammonia fungi. *Mycology*, 3(1), 36-53.
- Carrasco-Cabrera, C. P., Bell, T. L., & Kertesz, M. A. (2019). Caffeine metabolism during cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with spent coffee grounds. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(14), 5831-5841.

- Cheung, P. C. K. (2010). The nutritional and health benefits of mushrooms. *Nutrition Bulletin*, 35(4), 292-299.
- Cho, Y. S., Kim, J. S., Crowley, D. E., & Cho, B. G. (2003). Growth promotion of the edible fungus *Pleurotus ostreatus* by fluorescent pseudomonads. *FEMS microbiology letters*, 218(2), 271-276.
- Cruz, R., Cardoso, M. M., Fernandes, L., Oliveira, M., Mendes, E., Baptista, P., et al. (2012). Espresso coffee residues: a valuable source of unextracted compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), 7777-7784.
- Dias, E. S., Koshikumo, E., Schwan, R. F., & Silva, R. D. (2003). Cultivation of the mushroom *Pleurotus sajor-caju* in different agricultural residues. *Ciência e Agrotecnologia*, 27(6), 1363-1369.
- Gonçalves, C. C. D. M., Paiva, P. C. D. A., Dias, E. S., Siqueira, F. G. D., & Henrique, F. (2010). Avaliação do cultivo de *Pleurotus sajor-caju* (fries) sing. sobre o resíduo de algodão da indústria têxtil para a produção de cogumelos e para alimentação animal. *Ciência e Agrotecnologia*, 34(1), 220-225.
- ICO-International Coffee Organization: Monthly Coffee Market Report. (2021) Recuperado de: <http://www.ico.org/Market-Report-20-21-e.asp>
- ICO-International Coffee Organization: Total Production – Crop Year. (2020) Recuperado de: http://www.ico.org/new_historical.asp?section=Statistics
- Jandaik, S., & Guleria, D. S. (1999). Yield loss in *Agaricus bisporus* due to *Trichoderma* sp infection. *Mushroom Res*, 8, 43-46.
- Jeena, G. S., Punatha, H., Prakash, O., Chandra, M., & Kushwaha, K. P. S. (2016). Study on in vitro antioxidant potential of some cultivated *Pleurotus species* (Oyster mushroom). *Indian Journal of Natural Products and Resources (IJNPR)* 5(1), 56-61.
- Kanehisa, M. (2002, January). The KEGG database. In *Novartis Foundation Symposium* (pp. 91-100). Chichester; New York; John Wiley; 1999. Recuperado de: https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_organism?menu_type=pathway_maps&org=ebv
- Khan, N. A., Abbas, M., Rehman, A., ul Haq, I., & Hanan, A. (2011). Impact of various sterilization methods using different substrates for yield improvement of *Pleurotus* spp. *Pak. J. Phytopathol*, 23(1), 20-23.

- Li, Y., Fang, W., Xue, H., Yang, X. Q., Xie, S. J., & Wang, L. F. (2017). *Wohlfahrtiimonas populi* sp. nov., isolated from symptomatic bark of a *Populus× euramericana* canker. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(11), 4424-4428.
- Mazumder, N., & Rathaiah, Y. (2001). Management of fungal and bacterial contaminations of oyster mushroom spawn. *Mushroom Research*, 10(2).
- Miles, P. G., & Chang, S. T. (2004). *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. Florida, United States, CRC press.
- Murthy, P.S., Naidu, M.M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition – a review. *Resources, Conservation and Recycling*, 66, 45–58.
- Mussatto, S.I., Machado, E.M.S., Martins, S. & Teixeira, J.A. (2011). Production, composition and application of coffee and its industrial residues. *Food Bioprocessing & Technology*, 4, 661–672.
- No R Core Team. (2021). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Obire, O., & Ogechi, A. A. (2015). Cultivation of mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and the microorganisms associated with the substrate used. *e-Journal of Science & Technology (e-JST)*, 8(4), 49-59.
- Oseni, T. O., Dlamini, S. O., Earnshaw, D. M., & Masarirambi, M. T. (2012). Effect of substrate pre- treatment methods on oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) production. *Int. J. Agric. Biol.*, 14, 251–255.
- Passera, A., Venturini, G., Battelli, G., Casati, P., Penaca, F., Quaglino, F., & Bianco, P. A. (2017). Competition assays revealed *Paenibacillus pasadenensis* strain R16 as a novel antifungal agent. *Microbiological research*, 198, 16-26.
- Pulido, H. G., De la Vara Salazar, R., González, P. G., Martínez, C. T., & Pérez, M. D. C. T. (2012). *Análisis y diseño de experimentos*. New York, NY, USA:: McGraw-Hill.
- Qiu, Z., Wu, X., Zhang, J., & Huang, C. (2017). High temperature enhances the ability of *Trichoderma asperellum* to infect *Pleurotus ostreatus* mycelia. *PLoS One*, 12(10), e0187055.
- Rayner, A. D. M., & Boddy, L. (1988). Fungal communities in the decay of wood. *Advances in microbial ecology*, 115-166.

- Ropciuc, S., Leahu, A., Oroian, M., & Damian, C. (2016). Researches on *Pleurotus ostreatus* Mushroom's Quality Cultivated on Coffee Grounds. *Scientific Papers: Animal Science & Biotechnologies/Lucrari Stiintifice: Zootehnie si Biotehnologii*, 49(2).
- Royse, D. J., Baars, J., & Tan, Q. (2017). Current overview of mushroom production in the world. *Edible and medicinal mushrooms: technology and applications*, 5-13.
- Sánchez, J. E., & Royse, D. J. (2017). La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas *Pleurotus* spp. *Uteha-Ecosur, San Cristóbal de las Casas*.
- Scully, D.S., Jalswal, A.K., Abu-Ghannam, N. (2016). An investigation into spent coffee waste as a renewable source of bioactive compounds and industrially important sugars. *Bioengineering*, 3 (4),33.
- Shu-Ting, C., & Miles, P. G. (2004). Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. *CRC Pressp*, 159-185.
- Siqueira, F. G., Maciel, W. P., Martos, E. T., Duarte, G. C., Miller, R. N., da Silva, R., & Dias, E. S. (2012). Cultivation of *Pleurotus* mushrooms in substrates obtained by short composting and steam pasteurization. *African Journal of Biotechnology*, 11(53), 11630-11635.
- Tehrani, N. F., Aznar, J. S., & Kiros, Y. (2015). Coffee extract residue for production of ethanol and activated carbons. *Journal of Cleaner Production*, 91, 64-70.
- Valencia, N. R., & Alamá, M. R. (2009). Estudio de un biosistema integrado para el postratamiento de las aguas residuales del café utilizando macrófitas acuáticas. [Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia]. <https://pdfs.semanticscholar.org/859e/3e23d49349dc40abccff91938af3828cb939.pdf>
- Velázquez-Cedeño, M. A., Farnet, A. M., Ferré, E., & Savoie, J. M. (2004). *Variations of lignocellulosic activities in dual cultures of Pleurotus ostreatus and Trichoderma longibrachiatum on unsterilized wheat straw. Mycologia*, 96(4), 712–719.

Anexos

<u>Cepa bacteriana</u>	<u>t Student p value</u>	<u>Cepa bacteriana</u>	<u>t Student p value</u>
B001	0.4435	B001T2	0.1584
B003	0.009781	B003T2	0.1038
B004	0.01846	B004T2	0.1406
B005	0.0895	B005T2	0.9013
B006	0.007235	B006T2	0.04961

Anexo 1. P value de prueba t de Student para cepas bacterianas.

Cepa fúngica	t Student p value
H001	0.003884
H002	0.002042
H003	0.0002686
H004	0.001385
H005	0.03775
H006	0.2263
H007	0.0002686
H008	0.002814
H009	0.0002227
H010	0.1482
H011	0.00026
H012	0.005209
H013	0.001478
H014	0.03151
H015	0.009852

Anexo 2. P value de prueba t de Student para cepas fúngicas.