



Posgrado en Biotecnología

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

**“IDENTIFICACIÓN DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA DE
Coffea arabica Y *Coffea canephora* EN LOS DIFERENTES MÉTODOS
DE CULTIVO Y DE PROCESAMIENTO MEDIANTE
SECUENCIACIÓN MASIVA DE NUEVA GENERACIÓN Y LA
PREVALENCIA DE OCRATOXINA A EN CAFÉ DE CHIAPAS”**

TESIS

Que para obtener el grado de Doctora en Biotecnología

PRESENTA

**M. en B. María Eugenia Aguilar Álvarez
Matrícula: 2173801657**

Directora:

Dra. Gabriela M. Rodríguez Serrano

Asesores:

Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda

Dr. Noël Durand

Jurado:

Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda

Dr. Jesús Eduardo Zúñiga León

Dr. Sergio Andrés Alatorre Santamaria

Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

Iztapalapa, Ciudad de México a 25 de abril de 2022

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana de la Unidad Iztapalapa está incluido en el Programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC) del CONACYT con la referencia 001466

La presente investigación fue auspiciada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del fondo de financiamiento FONCICYT ANR-CONACYT (259874).

Y por la Secretaría de Educación Pública/Subsecretaría de Educación Media Superior/Coordinación Sectorial de Desarrollo Académico/ Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria y Ciencias del Mar por la beca-comisión para el doctorado de Ma. Eugenia Aguilar Álvarez.

Iztapalapa, Ciudad de México a 25 de abril de 2022

El H. Jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma
Metropolitana de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

“IDENTIFICACIÓN DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA DE *Coffea arabica* Y *Coffea canephora* EN LOS DIFERENTES MÉTODOS DE CULTIVO Y DE PROCESAMIENTO MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA DE NUEVA GENERACIÓN Y LA PREVALENCIA DE OCRATOXINA A EN CAFÉ DE CHIAPAS”

Que presentó:

M. en B. María Eugenia Aguilar Álvarez

COMITÉ TUTORIAL

Directora de tesis: Dra. Gabriela M. Rodríguez Serrano
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.

Asesor: Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.

Asesor: Dr. Noël Durand
Agricultural Research Centre for International Development (CIRAD), UMR, Qualisud, Fr.
[*Centro Francés de investigación agrícola para el desarrollo internacional*].



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No 00262

Matricula: 2173801657

IDENTIFICACIÓN DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA DE *Coffea arabica* Y *Coffea conephora* EN LOS DIFERENTES MÉTODOS DE CULTIVO Y DE PROCESAMIENTO MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA DE NUEVA GENERACION Y LA PREVALENCIA DE OCHRATOXINA A EN CAFÉ DE CHIAPAS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 25 del mes de abril del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JESUS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA
- DR. JESUS EDUARDO ZUÑIGA LEON
- DR. SERGIO ANDRES ALATORRE SANTAMARIA
- DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA BUENDIA



MARIA EUGENIA AGUILAR ALVAREZ
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:


DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: MARIA EUGENIA AGUILAR ALVAREZ

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

Aprobar

REVISÓ



MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

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

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. JESUS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA

VOCAL

DR. JESUS EDUARDO ZUÑIGA LEON

VOCAL

DR. SERGIO ANDRES ALATORRE SANTAMARIA

SECRETARIO

DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA BUENDIA

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gabriela M. Rodríguez Serrano, mi directora, maestra, y amiga, por su confianza y apoyo para la realización de este proyecto y lograr resultados que abonan el maravilloso mundo del café en México. Mi gratitud y cariño para ti.

Al Dr. Gerardo Saucedo Castañeda por aceptar ser mi asesor y abrirme las puertas de la PP4, por sus sabios consejos y experiencia que enriquecieron el trabajo realizado.

Al Dr. Noël Durand, por su apoyo, consejos y amplia comunicación durante el trabajo experimental lo que fortaleció mi formación y los resultados de esta investigación.

A la Dra. Isabelle Perraud Gaime, por tu apoyo, experiencia y alegría motivadora.

Al Dr. Eduardo Zúñiga León por asesoría, la realización del análisis bioinformático y brindarme tu amistad. Eres un gran ser humano.

A mis queridas maestras y amigas Rosa Obdulia Gonzales Robles[†] y Alejandra Serrato Díaz[†]. Las honro y recuerdo con amor. Gracias por lo compartido y por abrir las puertas de su corazón para mí. Ahí justo en mi corazón las encuentro siempre.

A los doctores, maestros y estudiantes de la PP2 por acogerme en un selecto grupo de trabajo y hacerme sentir como parte de una gran familia.

A la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria y Ciencias del Mar por la beca-comisión para estudiar este doctorado.

A los C.P. José Bersabel Jiménez López, Ing. Hernán Aguilar Alvarado, a la Lic. Georgina Hernández López, y a todos los productores de café de la Unión de Ejidos de La Selva y de Montañas Chiapanecas. Gracias por brindarme las facilidades para penetrar a las raíces del café a través de su diario quehacer y vivir.

A las mujeres y hombres que se dedican al cultivo del café.... ¡Gracias!

DEDICATORIA

*“Todo lo puedo en Cristo que me fortalece”
(Filipenses 4,13)*

A Dios, Padre-Madre, por darme el valor y la fuerza para levantarme cada día y seguir caminando sostenida por la Fe.

A mi amada hija María Eugenia Bermúdez Aguilar, por enseñarme el significado del verdadero amor y, porque contigo me reencontré con Dios en el primer instante de saberte viva.

A mis padres Profesores Armando y Luz Amparo[†], con amor y gratitud por su ejemplo de vida.

Para mis hermanos Lolis, Amparito y Armando y a mis cuñados Hugo, Carlos y Rocío, porque me han acompañado y aceptado en todas las locuras de mi vida, entre ellas este doctorado.

Mención de gratitud especial a mis sobrinos. Por ser mi alegría y luz, en momentos de profunda tristeza y, acompañarnos a Maru y a mí, siempre. Si Dios me hubiera concedido la oportunidad de tener otro hijo, los hubiera elegido a todos.

A mi querida tía Florecita Moreno, por su amor incondicional y sus palabras de vida y sabiduría, que me hicieron recobrar la fe y el aliento cuando creí que no podría continuar.

A mis familiares y amigos, gracias por acompañarme en el viaje de mi vida.

RESUMEN

La Ocratoxina A (OTA) es una amenaza para la salud por su toxicidad. Es producida por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, en diferentes etapas del procesamiento del café. El grado de contaminación depende de factores como el clima, la humedad, la localización geográfica, tipo de procesamiento postcosecha. Chiapas es el principal productor de café arábica convencional y orgánico. Y México ocupa el onceavo lugar en la producción de café convencional y el segundo lugar de café orgánico a nivel mundial. A la fecha no hay estudios sobre la incidencia de la OTA en el café producido y comercializado en Chiapas, por lo que en el ciclo 2017/18 se adquirieron 100 muestras de café de Chiapas, se clasificaron según su variedad (arábica o robusta), tipo (tostado o no tostado), procesamiento postcosecha (seco o húmedo) y sistema de cultivo (orgánico o convencional). En 97 muestras analizadas la OTA promedio fue de $0.41 \pm 0.62 \mu\text{g}/\text{kg}$. No se detectó OTA en el 52%; en el 45% la concentración osciló entre 0.05 y $3.4 \mu\text{g}/\text{kg}$, por debajo del límite de la norma europea ($<5 \mu\text{g}/\text{kg}$), solo en el 3% de las muestras los valores de OTA rebasaron la norma. Se encontró también que la prevalencia de la OTA en el café chiapaneco depende de la variedad, tipo y procesamiento ($p \leq 0.05$). La OTA presente en el café cultivado orgánica y convencionalmente no presentó estadísticamente diferencias significativas. El promedio de OTA en las 14 muestras de café soluble (de producción nacional) fue de $0.93 \pm 0.71 \mu\text{g}/\text{kg}$ y tuvo mayor probabilidad de encontrar OTA que el café de Chiapas estudiado. Estos resultados sugieren que la prevalencia de OTA en el café de Chiapas es baja y que es menos probable que se encuentre en el café arábica tostado y procesado en húmedo.

Mediante secuenciación masiva de nueva generación (NGS) se analizó la diversidad microbiana presente en café a partir de la cereza madura fresca y, procesado por los métodos seco y húmedo, en diferentes tiempos de secado, en tres regiones cafetaleras de Chiapas (Cruz del Rosario, de las Margaritas, Nuevo Anexo Ojo de Agua, de la Independencia y Santo Domingo, de Unión Juárez, Chiapas), durante el ciclo 2018/19. Se cuantificó la OTA presente en 26 muestras de café, se les extrajo el ADN metagenómico y se analizó el gen ribosomal 16S y la región ITS. En las cerezas frescas y en el café procesado por el procesamiento húmedo se identificó un conjunto de bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Weissella*, además de enterobacterias y levaduras como *Pichia*, *Candida* y *Wickerhamomyces*. Durante el procesamiento seco la diversidad de especies fue mayor y se

encontraron otros géneros como *Corynebacterium*, *Lysinibacillus*, *Acetobacter* y *Pantoea*. También en estas muestras se identificó de manera abundante el género *Penicillium* y en menor porcentaje *Aspergillus*. Un comportamiento contrario se observó en las muestras procesadas por el método húmedo en donde *Aspergillus* fue el más abundante. La concentración de OTA en el 97.7% de las muestras analizadas presentaron un rango entre 0.0-3.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de OTA, es decir, que cumplen con la norma europea ($\leq 0.5\mu\text{g}/\text{kg}$). En estas muestras la presencia de *Lactobacillus* y *Pichia* fue abundante y es posible que favorezcan la baja concentración de OTA ya que ha sido reportado que inhiben el desarrollo de hongos ocratoxigénicos y la producción de OTA. La concentración más alta de OTA (15.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$) se encontró en la muestra de cereza seca arábica con 15 días de secado. En esta muestra, *Penicillium ornatum* fue el más abundante (94%). Un hallazgo importante fue que en todas las muestras de café estudiadas no se identificaron hongos filamentosos con potencial ocratoxigénico lo que posiblemente contribuye a la baja concentración de OTA.

La diversidad bacteriana y fúngica fue analizada mediante los índices alfa y beta. Se observó que la población bacteriana fue más abundante y diversa y presentó diferencias significativas según el tipo de procesamiento y lugar de muestreo ($p < 0.05$). El índice alfa en las poblaciones fúngicas no presentó diferencias estadísticas significativas entre la variedad, tipo de procesamiento, lugar de muestreo, tipo de cultivo. No obstante, si se encontraron diferencias significativas en el índice beta de las comunidades fúngicas según el lugar de muestreo y tipo de procesamiento ($p < 0.05$). Este estudio permite tener una comprensión amplia del café de Chiapas, y podría ser un referente para el análisis e investigaciones posteriores considerando todo la compleja cadena biotecnológica en cada tipo de procesamiento postcosecha para mejorar la calidad del café. Además, aprovechar el potencial de las distintas comunidades bacterianas y fúngicas para el control de la contaminación de la OTA y los hongos que la producen.

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is a threat to health due to its toxicity. OTA is produced by fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* in different stages of coffee processing. The degree of contamination depends on the weather, humidity, geographical location and the kind of post-harvest processing. Chiapas is the primary producer of conventional and organic arabica coffee. Mexico is the second-largest producer of organic coffee globally and eleventh in conventional coffee production. To date, there have been no studies on the incidence of OTA in coffee produced and marketed in Chiapas, so during the 2017/2018 cycle, we took 100 samples of Chiapas coffee and classified them according to variety (arabica or robusta), type (roasted or non-roasted), post-harvest processing (dry or wet) and cultivation system (organic or conventional). The average OTA concentration in 97 % of the samples was 0.41 ± 0.62 $\mu\text{g}/\text{kg}$. OTA was not detected in 52% of the samples; in 45%, the concentration varied between 0.05 and 3.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, below the limit of the European standard (< 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$). In only 3% of the samples did OTA values exceed the standard. It was also found that the prevalence of OTA in Chiapas coffee depends on the variety, type, and processing ($p \leq 0.05$). The OTA found in organically and conventionally grown coffee presented no significant statistical differences. The average OTA in the 14 samples of instant coffee (from national production) was 0.93 ± 0.71 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and showed a higher likelihood of finding OTA than in the Chiapas coffee studied. These results suggest that the prevalence of OTA in Chiapas coffee is low and is less likely to be found in wet-roasted arabica coffee.

Microbial diversity was analyzed using next-generation sequencing (NGS) from fresh ripe cherries and both wet and dry processing methods at different drying times, in three coffee-growing regions in Chiapas (Cruz del Rosario, from Las Margaritas, Nuevo Anexo Ojo de Agua, from Independencia and Santo Domingo, from Unión Juárez, Chiapas), during the 2018-2019 cycle. The OTA present in 26 coffee samples was quantified, the metagenomic DNA was extracted, and the 16S ribosomal gene and ITS region were analyzed. A set of strains from the genera *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Weissella* were identified in fresh cherries and wet-processed coffee, and enterobacteria and yeasts such as *Pichia*, *Candida* and *Wickerhamomyces*. Species diversity was higher in dry processing, and other genera were found, including *Corynebacterium*, *Lysinibacillus*, *Acetobacter* and *Pantoea*. An abundance of the genus *Penicillium* and, to a lesser degree, *Aspergillus* was also found in these samples.

Conversely, *Aspergillus* was the most abundant genera in the wet-processed samples. The OTA concentration in 97.7% of the samples presented in a range of 0.0-3.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ OTA, i.e. within the European standard ($\leq 5 \mu\text{g}/\text{kg}$). In these samples, the presence of *Lactobacillus* and *Pichia* was abundant, which may account for the low concentration of OTA since it has been reported that these bacteria inhibit the development of ochratoxigenic fungi and OTA production. The highest concentration of OTA (15.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was found in the dry Arabica cherries at 15 days of drying. In this sample, *Penicillium ornatum* was the most abundant (94%). One important finding was that in all the coffee samples studied, no filamentous fungi with ochratoxigenic potential were identified, which may explain the low OTA concentration.

The bacterial and fungal diversity was analyzed through alpha and beta indices. The bacterial population was observed to be the most abundant and diverse and presented significant differences according to the processing type and sampling location ($p < 0.05$). The alpha index presented no significant differences between variety, processing type, sampling location or cultivation system in fungal population. Nevertheless, significant differences were found in the beta index of the fungal communities based on sampling location and processing type ($p < 0.05$). This study allows a wider comprehension of the coffee from Chiapas and may result in a referent for the analysis and further research considering the complex biotechnological chain around each type of post-harvest coffee processing. Also, it brings a possibility to improve the quality of coffee and seize the potential of the different bacterial and fungal communities to control the levels of OTA and the fungi quantity that produces this mycotoxin.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Micotoxinas	3
2.2 La Ocratoxina A	3
2.3 Incidencia de Ocratoxina A en café no tostado (verde) y tostado	4
2.4 Ocratoxina A en café soluble	6
2.5 Café y su origen	9
2.5.1 <i>Coffea arabica</i> (arábica).....	10
2.5.2 <i>Coffea canephora</i> (robusta).....	10
2.6 Procesamiento del café	10
2.6.1 Procesamiento húmedo.....	11
2.6.2 Procesamiento seco o natural.....	12
2.7 Producción e importancia del café	12
2.7.1 Producción de café en México.....	12
2.8 Diversidad microbiana del café	13
2.8.1 Bacterias ácido lácticas (BAL).....	18
2.8.2 Levaduras	20
2.9 Análisis de la diversidad microbiana	23
2.9.1 Métodos dependientes e independientes de cultivo	23
2.9.2 Marcadores genéticos	24
2.9.3 Métodos independientes de cultivo	26
2.9.4 Análisis de datos mediante bioinformática	29
2.9.5 Medidas de diversidad	30
3. JUSTIFICACIÓN	37
4. HIPÓTESIS	38
5. OBJETIVO GENERAL	39
5.1 Objetivos particulares	39
6. MATERIALES Y MÉTODOS	40
6.1 Recolección de muestras	40
6.1.1 Café tostado y no tostado comercializado en Chiapas-México.	40
6.1.2 Café soluble	41
6.1.3 Café para el análisis de diversidad microbiana y aislamiento de bacterias ácido-lácticas BAL y hongos filamentosos.....	41

6.2	Extracción y cuantificación de OTA	43
6.2.1	Preparación de la curva de calibración	44
6.3	Aislamiento de BAL y hongos filamentosos (epífitos y endófitos)	45
6.3.1	BAL epífitas	45
6.3.2	BAL endófitas	46
6.3.3	Hongos filamentosos epífitos	46
6.3.4	Hongos filamentosos endófitos.....	47
6.4	Purificación y caracterización de los microorganismos aislados.....	47
6.4.1	Colonias de bacterias ácido lácticas (BAL).....	47
6.4.2	Hongos filamentosos	47
6.5	Cuantificación del potencial ocratoxigénico de los hongos filamentosos aislados de las muestras de café.....	47
6.6	Identificación molecular de bacterias aisladas del café mediante análisis de secuencias de ARNr 16S	48
6.6.1	Integridad ADN	48
6.6.2	Amplificación por PCR	48
6.7	Análisis de las comunidades microbianas por secuenciación masiva (NGS).....	51
6.7.1	Extracción de ADN total para identificación 16S e ITS.....	51
6.8	Preparación de librerías Illumina NGS	54
6.8.1	Preparación de la muestra.....	55
6.8.2	Construcción de la librería.....	55
6.8.3	Secuenciación	55
6.8.4	Datos crudos	56
6.9	Análisis Bioinformático	56
6.9.1	Preparación de la base de datos (data-base).....	56
6.9.2	Procesamiento, agrupación y clasificación de lecturas secuenciadas	56
6.9.3	Análisis de diversidad.....	57
6.9.4	Número de acceso a la secuencia de nucleótidos	58
6.9.5	Análisis estadístico del contenido de OTA en café tostado y no tostado, y café soluble, comercializado en Chiapas-México	58
6.9.6	Análisis estadístico aplicado en los datos de biodiversidad microbiana del café obtenido mediante NGS.....	59
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
7.1	OTA en café comercializado en Chiapas	60
7.2	OTA en café soluble versus café de Chiapas	66
7.3	Identificación de la diversidad microbiana en café utilizando NGS (Illumina-basado en secuencia de amplicón).....	69

7.4	Análisis de diversidad alfa (α).....	72
7.4.1	Índices Chao, Shannon y Simpson para la población bacteriana.....	72
7.4.2	Índices de Chao, Shannon y Simpson para la población fúngica	74
7.5	Identificación taxonómica a nivel de Fila	75
7.5.1	Para bacterias (gen ribosomal rADN 16S.....)	76
7.5.2	Para hongos (ITS).....	78
7.6	Identificación taxonómica a nivel de género y especie para bacterias (16S) y hongos (ITS)	81
7.7	Cereza fresca	81
7.7.1	Diversidad bacteriana en cereza fresca.....	81
7.7.2	Diversidad fúngica en cereza fresca	82
7.8	Procesamiento seco	83
7.8.1	Diversidad bacteriana durante el procesamiento seco	83
7.8.2	Diversidad fúngica durante procesamiento seco.	87
7.9	Procesamiento húmedo	91
7.9.1	Diversidad bacteriana durante el procesamiento húmedo	91
7.9.2	Diversidad fúngica durante el procesamiento húmedo.....	93
7.10	Identificación molecular de bacterias aisladas por métodos dependientes de cultivo	96
7.11	Diversidad Beta (β) en las estructuras bacterianas y fúngicas según Bray Curtis.....	98
7.12	OTA y Diversidad microbiana.....	104
8.	CONCLUSIONES.....	109
9.	PERSPECTIVAS	111
10.	REFERENCIAS	112
ANEXOS.....		126
	Anexo 1. Curva de calibración de la OTA.....	126
	Anexo 2. Resultado de la diversidad microbiana utilizando el kit DNeasy UltraClean Microbial (Kit Microbial) para la extracción de ADN de las muestras de café.....	127
	Anexo 3. Indices de riqueza para las comunidades bacterianas (16S) Kit power soil considerando las diferentes variables	143
	Anexo 4. Indices de riqueza para las comunidades fúngicas (ITS) Kit power soil considerando las diferentes variables	146
	Anexo 5. Potencial ocratoxigénico de los hongos filamentosos aislados	148
	Anexo 6. Validación del modelo para asignación taxonómica.....	152
11.	PRODUCTOS GENERADOS DE ESTE PROYECTO DE NVESTIGACION	166

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la Ocratoxina A	4
Figura 2. Gen 16S rRNA. Las nueve regiones hipervariables y conservadas (Fuente: Gürtler et al., 2014)... 25	25
Figura 3. Genes rARN (rADN) de hongos encontrados como secuencias tándem (ITS) (Fuente: Alhawatema et al., 2019).....	26
Figura 4. Clasificación de métodos para medir la diversidad alfa. (Fuente: Moreno, 2001).	32
Figura 5. Zona de muestreo de café durante ciclo 2017/18 para cuantificación de OTA. (Fuente: Aguilar-Alvarez et al., 2021).	40
Figura 6. Muestras de café (2018/19). (A) Método seco variedades Coffea arabica (arábica) y Coffea canephora (robusta), cultivo convencional. (B). Método húmedo variedad Coffea arabica (arábica) y cultivos orgánico y convencional.....	42
Figura 7. Zona de muestreo del café del ciclo 2018/19.	43
Figura 8. Procedimiento de extracción de ADN kit DNeasy UltraClean Microbial.....	49
Figura 9. Protocolo de extracción de ADN utilizando el kit DNeasy Power Soil	53
Figura 10. Esquema del procedimiento de NGS. (Fuente: MacroGen®).....	55
Figura 11. Número de muestras de café con y sin OTA agrupadas por sus características. ATO: arábica tostada orgánica; ATC: arábica tostada convencional; ANTO: arábica no tostada orgánica; ANTC: arábica no tostada convencional; RT: robusta tostada; RNT: robusta no tostada; Instant: Instantáneo/soluble. (Fuente: Aguilar-Alvarez, et al., 2021)	61
Figura 12. Porcentaje de muestras de café con y sin OTA. Las muestra con OTA de la figura presentan concentraciones por debajo de la regulación europea (<5 µg/kg). (A) Variedad (P<0.05). (B) Tipo de café (p<0.05). (C) Proceso (p<0.05). (D) Tipo de cultivo (p<0.05). (Fuente: Aguilar-Alvarez, et al., 2021).....	62
Figura 13. Curvas de rarefacción (A) para bacterias (16S) y (B) para hongos (ITS).	71
Figura 14. Abundancia relativa a nivel de Fila de las muestras de café. (A) 16S y (B) ITS, con un umbral \geq 1.0%	75
Figura 15. Abundancia relativa a nivel de género de las muestras de café. (A). 16S y (B) ITS, con un umbral \geq 0.1%	79
Figura 16. Abundancia relativa a nivel de especie de las muestras de café por género. (A) 16S y (B) ITS, con un umbral \geq 0.5%	80
Figura 17. Despulpadora de café.....	91
Figura 18. Secado de los granos de café al sol.	91
Figura 19. Abundancia relativa de especies de bacterias aisladas por métodos dependientes de cultivo de diferentes muestras de café analizadas en este estudio de café de Chiapas ciclo 2018/2019.	97
Figura 20. Gráfica tridimensional de PCA de la diversidad beta microbiana de las muestras de café analizadas. El gráfico se basa en las diferencias de Bray Curtis de las comunidades (A) bacterianas (16S) (p \leq 0.05) y (B) fúngicas (ITS) (p \leq 0.05). Las elipses muestran la agrupación aproximada de conglomerados de las muestras considerando el método de procesamiento (húmedo, seco y cereza fresca).....	100

Figura 21. . Gráfica tridimensional de PCA de la diversidad beta microbiana de las muestras de café analizadas. El gráfico se basa en las diferencias de Bray Curtis de las comunidades (A) bacterianas ($p \leq 0.05$) y (B) fúngicas (ITS) ($p \geq 0.05$). Las elipses muestran la agrupación aproximada de los conglomerados según el lugar de muestreo. 101

Figura 22. Gráfica tridimensional de PCA de la diversidad beta de las muestras de café analizadas. El gráfico se basa en las diferencias de Bray Curtis de las comunidades (A) bacterianas (16S) y (B) fúngicas (ITS). Las elipses muestran la agrupación aproximada de los conglomerados de las muestras según el tipo de cultivo ($p \geq 0.05$) 102

Figura 23. Gráfica tridimensional de PCA de la diversidad beta de las muestras de café analizadas. El gráfico se basa en las diferencias de Bray Curtis de las comunidades (A) bacterianas (16S) ($p \geq 0.05$) y (B) fúngicas (ITS) ($p \leq 0.05$). Las elipses muestran la agrupación aproximada de los conglomerados de las muestras según la variedad de café 103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Presencia de OTA en muestras de café de diferentes tipos y origen.	7
Tabla 2. Contaminación de OTA en café soluble comercializado en diferentes países.	9
Tabla 3. Bacterias, levaduras y hongos en café procesado en diferentes países	15
Tabla 4. Bacterias lácticas y su actividad antifúngica.	21
Tabla 5. Plataforma de secuenciación de segunda y tercera generación (Modificada de Glenn, 2011).	27
Tabla 6. Mezcla de reacción amplificación PCR del ARNr 16S	50
Tabla 7. Condiciones utilizadas para la reacción de amplificación del ARNr 16S	50
Tabla 8. Extracción de DNA total. Características de las muestras de café y kit utilizado para extracción. ...	52
Tabla 9. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación por PCR de la región ITS	53
Tabla 10. Condiciones utilizadas para la reacción de amplificación de la región ITS.....	54
Tabla 11. Análisis de las medianas de la concentración de OTA de acuerdo con: variedad (arábica o robusta), tipo de café (No tostado o tostado), proceso (húmedo o Seco) y Cultivo (orgánico o convencional) (prueba Mann-Whitney) **	66
Tabla 12. Análisis de las medianas de la concentración de OTA entre café no soluble (Chiapas) vs soluble, No tostado vs soluble, Tostado vs Soluble, Arábica vs soluble y Robusta vs soluble (prueba Mann-Whitney U) **	68
Tabla 13. Índices de diversidad y riqueza de comunidades microbianas de la secuencias de genes de rARN 16S e ITS para la agrupación de ASVs, obtenidas de granos de café de Chiapas de las variables robusta (R) y arábica (A), cultivadas convencional (C) y orgánicamente (GO), procesadas por los métodos seco (muestras coffee_01 hasta coffee_07) y húmedo (muestras coffee_08 hasta coffee_13).	73
Tabla 14. Concentración de OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en las muestras de café analizadas.....	105

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
18S	El ARNr 18S es el ARN estructural del pequeño componente de los ribosomas citoplasmáticos eucariotas.
26S/28S	EL ARNr 26S/28S es el ARN estructural largo del componente de eucariotas.
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AF(s)	Aflatoxina(s)
AOAC	Association of Official Analytical Chemist
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
ASIC	Asociación Científica Internacional de Café
ASV	Variantes de Secuencia de Amplicon
ATCC	American Type Culture Collection
Aw	Actividad de agua
BAL	Bacterias ácido lácticas
BEN	Nefropatía Endémica de los Balcanes
Chis.	Chiapas
CIRAD	Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
FAO	Organización para la Agricultura y la Alimentación (por sus siglas en inglés)
FDA	Food and Drug Administration
FIRA	Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura
H	Procesamiento Húmedo
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IARC	International Agency for Research on Cancer
ITS	espaciador interno transcrito
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LSU	Subunidad Larga de eucariotas
M	Molaridad
Méx.	México
min	Minuto
NCBI	National Center of Biotechnological Information
NGS	Secuenciación masiva de nueva generación

NMX	Recomendaciones de parámetro o procedimientos mexicanos
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
OTA	Ocratoxina A
OTA DLNE	Ocratoxina A debajo de los límites de la norma europea (5µg/kg para café verde o tostado y 10 µg/kg para café soluble)
OTB	Ocratoxina B
OTU	Unidad taxonómica operacional
PBS	Solución tampón salina de fosfato
PCA	Análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar papa y dextrosa
pH	potencial de Hidrógeno
ppb	partes por billón
RDP	The Ribosomal Database Project
RPM	Revoluciones por Minuto
S	Procesamiento Seco
SAGARPA	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
SIAP	Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera
SILVA	rRNA Database Project
SSU	Subunidad pequeña de eucariotas
Ton	Toneladas
V	Volumen
v/v	volumen a volumen

1. INTRODUCCIÓN

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina producida por hongos principalmente de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Presenta características nefrotóxicas, inmunosupresoras, teratogénicas y se ha clasificado como un posible carcinogénico del grupo 2 (IARC, 2002). La OTA se puede encontrar en una gran variedad de productos agrícolas como los cereales, cacao, uvas, especias, papas, jugos, leche y también en el café, lo que constituye un importante problema de salud y seguridad alimentaria (Codex alimentarius FAO-WHO, 2009; Heussner & Bingle, 2015).

El café es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAO por sus siglas en inglés), en el ciclo 2019/20 la producción mundial fue de 10.8 millones de toneladas de café verde. Los principales países productores fueron Brasil con el 34.52%, Vietnam (16.3%), Colombia (7.71%), Indonesia (7.16%), Etiopía (5.41%) y Honduras (3.37%). También Perú e India se destacan por su producción con un aporte del 3.49 y 2.76%, respectivamente. México durante el mismo ciclo ocupó el décimo primer lugar aportando el 1.26% de la producción mundial de café verde (FAOSTAT, 2020). Las dos variedades que se cultivan en el país son *Coffea arabica* (variedad arábica) que representa el 96% de la producción nacional y el 4% restante es de *Coffea canephora* (variedad robusta) (FIRA, 2019). Chiapas es el principal productor de café arábica cultivado orgánica y convencionalmente; durante el ciclo 2019/20 su producción fue de 367,874 toneladas de café verde, por delante de Veracruz, Puebla, Oaxaca, Guerrero, Hidalgo, San Luis Potosí, Jalisco, Nayarit y Colima (SADER-SIAP, 2020).

En México, el cultivo y procesamiento del café representa un importante eslabón en la cadena productiva y económica, en la que participan miles de hombres y mujeres. Los métodos de procesamiento postcosecha que se utilizan en México son el procesamiento húmedo, que es utilizado para la variedad arábica orgánica y convencional, y el procesamiento seco, empleado para la variedad robusta y una mínima proporción de arábica.

Cada método de procesamiento confiere características organolépticas y sensoriales específicas al grano, ya que intervienen un número importante de microorganismos, entre los que se identifican bacterias, levaduras y hongos, que de manera natural se van desarrollando durante las distintas etapas del procesamiento húmedo o seco (Zhang *et al.*, 2019). No obstante, durante las diferentes etapas desde la cosecha, procesamiento y hasta el almacenamiento puede presentarse la contaminación de microorganismos no deseados, como los hongos filamentosos, que además de afectar a la calidad sensorial del café, constituyen un riesgo para la salud al favorecer la producción de micotoxinas como la OTA (Batista *et al.*, 2009; Evangelista *et al.*, 2015; Rezende *et al.*, 2013).

La presencia de OTA en el café fue descrita por primera vez en 1974 y aunque hasta la fecha se han establecido mecanismos para prevenir y reducir la OTA en los puntos críticos de contaminación en la cadena de producción, no se ha logrado evitarla por completo (Codex alimentarius FAO-WHO, 2009). Se han realizado diversas investigaciones para estudiar los mecanismos biológicos para contrarrestar la contaminación de esta micotoxina en el café mediante el control e inhibición del crecimiento de los hongos ocratoxigénicos, utilizando bacterias ácido lácticas (BAL) y otros microorganismo como las levaduras (Batista *et al.*, 2009; de Almeida *et al.*, 2019; de Melo Pereira *et al.*, 2015a; Djossou *et al.*, 2015; Durand *et al.*, 2013)

México carece de una norma que regule la presencia de la OTA en el café que se produce y se desconoce la prevalencia de OTA en el café que se comercializa y, no hay estudios relativos a la diversidad microbiana y la presencia de OTA en el café procesado por los métodos húmedo y seco, considerando la variedad y el tipo de cultivo. Por lo anterior y sumado a la importancia del cultivo, en el presente trabajo se estudió la prevalencia de la OTA en el café producido y comercializado en Chiapas, México y la diversidad microbiana que coexiste en el café durante las diferentes etapas desde la cosecha y su procesamiento postcosecha en diferentes tiempos de secado y su relación con la incidencia de la OTA.

2. ANTECEDENTES

2.1 Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos, principalmente de los géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*, que causan riesgos considerables a la salud humana cuando son ingeridas por la vía oral, nasal o absorbidos por vía cutánea. Presentan efectos carcinogénicos, nefrotóxicos, teratogénicos, embriotóxicos, genotóxicos, mutagénicos, neurotóxicos e inmunotóxicos (IARC, 2002; Rai & Verma, 2010; Paterson *et al.*, 2014). Algunas de las micotoxinas de interés en la agricultura y alimentación, por su grado de toxicidad, son las aflatoxinas, las fumonisinas, la ocratoxina A, las zearalenonas y tricotecenos específicos, como el deoxinivalenol y el nivalenol (FAO- ONU, 2004).

2.2 La Ocratoxina A

La Ocratoxina A (C₂₀H₁₈O₆NCL) descrita por primera vez en 1965 (van der Merwe *et al.*, 1965), está formada por un anillo de 3,4- dihidro metil-isocumarina unido por medio de su grupo carboxilo y mediante un enlace tipo amida a una molécula de L-β-fenilalanina (Figura 1) (Kőszegi & Poór, 2016). Es una sustancia sólida cristalina de color blanco, inodora, estable al calor (punto de fusión: 168–173 °C) con escasa solubilidad acuosa. La OTA no desaparece por completo durante el horneado o tostado (Castellanos-Onorio *et al.*, 2011; Suárez-Quiroz *et al.*, 2005; Vidal *et al.*, 2015); además, se ha estudiado que resiste tres horas de esterilización con vapor a alta presión a 121 °C, e incluso a 250 °C solo se degrada parcialmente (Kőszegi & Poór, 2016). Debido a la estructura de la OTA, esta micotoxina exhibe una fuerte propiedad de fluorescencia (Poór *et al.*, 2013). Es una micotoxina producida por hongos filamentosos principalmente del género *Penicillium* y de las especies *Penicillium verrucosum* y *Penicillium nordicum*, así como hongos del género *Aspergillus* como *A. ochraceus*, *A. sulphureus*, *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. steyni*, *A. westerdijkiae*, *A. sclerotiorum*, *A. alliaceus* y *A. melleus* (Batista *et al.*, 2009). La OTA entre sus efectos tóxicos es capaz de atravesar la placenta y causar daños a nivel embrionario (FAO, 2006b; IARC, 2002; Ringot *et al.*, 2006).

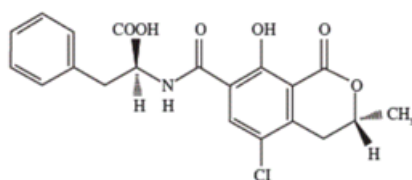


Figura 1. Estructura química de la Ocratoxina A

2.3 Incidencia de Ocratoxina A en café no tostado (verde) y tostado.

La OTA está presente en una gran variedad de productos alimenticios como frutos secos, quesos, vinos, especias, cacao, chocolate entre ellos el café (Amézqueta *et al.*, 2012; Bui-Klimke & Wu, 2015; Gil-Serna *et al.*, 2015). Diversos estudios han demostrado que el café es frecuentemente infectado con hongos ocratoxigénicos y las condiciones del procesamiento postcosecha y condiciones climatológicas inherentes a las zonas de cultivo afectan significativamente el desarrollo y crecimiento de estos hongos y la producción de esta toxina. Es decir que la contaminación de la OTA dependerá entre otros factores del manejo adecuado de toda la cadena de producción hasta el tostado (Khaneghah *et al.*, 2019; Schrenk *et al.*, 2020).

La OTA es termorresistente y durante el proceso de tostado de café sus niveles pueden disminuir. No obstante, un porcentaje remanente de la OTA no es eliminado de la bebida, lo que ocasiona que la exposición de los consumidores de café a la OTA genere un riesgo considerable para la salud (Benites *et al.*, 2017; Castellanos-Onorio, 2011; Comisión Europea, 2006; Schrenk *et al.*, 2020). Ante estos efectos, organismos internacionales como la FAO y la Unión Europea han emitido los límites permitidos para la ingesta de OTA en café: 5ppb para tostado y molido y 10ppb en café soluble también llamado café instantáneo (European-Commission, 2006). Cabe señalar que para fines de este documento se mencionará de manera indistinta el café instantáneo o soluble.

Por otra parte, se ha estudiado la incidencia de OTA en café no tostado (verde) y tostado de origen africano, asiático y latinoamericano, principalmente de países como Costa de Marfil, Indonesia, Filipinas, India, Brasil, Colombia, Perú, entre otros, lo que ha demostrado que el café de origen sudamericano y centroamericano tiene una menor frecuencia de contaminación y concentraciones más bajas de OTA (Benites *et al.*, 2017; Romani *et al.*, 2000).

Los primeros estudios de OTA en café verde se realizaron en 1974 (Levi, Trenk & Mohr, 1974) y a la fecha, se han publicado diversos trabajos que demuestran la contaminación de OTA utilizando diferentes metodologías y condiciones de trabajo (Tabla 1) en muestras de café de diferentes variedades, tipos y orígenes.

Como se observa en la Tabla 1, la mayor concentración de OTA se encuentra en la variedad robusta, no obstante, se ha estudiado que la concentración de OTA depende de muchos factores como son las condiciones ambientales y geográficas (Khaneghah *et al.*, 2019), las condiciones de cosecha, postcosecha, tipo procesamiento (húmedo o seco) (Batista *et al.*, 2009; Duris *et al.*, 2010; Urbano *et al.*, 2001), así como también, del almacenamiento, el transporte (Bucheli *et al.*, 1998), el tipo de tostado (Suárez-Quiroz *et al.*, 2005) y el tipo o práctica de cultivo (orgánico y convencional) (Fabiana *et al.*, 2014).

2.4 Ocratoxina A en café soluble

El café soluble en los últimos años ha tenido un incremento en su aceptación y consumo, no obstante, esta situación puede representar un riesgo en la salud debido a la contaminación por OTA (Casal *et al.*, 2014). Es sabido que la preparación de café soluble inicia con la selección del grano, tostado, granulación, concentración y secado por liofilización (Corso *et al.*, 2016). Se ha sugerido que los niveles de OTA en este tipo de café se incrementa por la concentración que ocurre durante el último estado del procesamiento del café soluble (Galarce-Bustos *et al.*, 2014) o bien, que los granos que se emplean son mezclas de cafés procesados por la vía seca, principalmente robusta que puede contener una mayor incidencia de OTA (Corso *et al.*, 2016; Culliao & Barcelo, 2015; Khaneghah *et al.*, 2019). Además, se ha reportado que la presencia de OTA en este tipo de café, en algunos casos se debe a la adulteración con cáscara de café de la cereza seca (Gopinandhan *et al.*, 2007).

En la Tabla 2 se muestra la concentración de OTA promedio en café soluble comercializado en diferentes países. Se observa que el contenido de OTA varía desde 0.1 hasta 25.50 µg/kg y es evidente que, aunque la concentración de OTA sea baja, la frecuencia en el número de muestras positivas es alta.

Tabla 1. Presencia de OTA en muestras de café de diferentes tipos y origen.

Variedad	Tipo de Café	Concentración media OTA (µg/Kg)	Rango de concentración. OTA (µg/kg)	Desviación estándar (µg/kg)	Muestras positivas vs. Total muestras	País	Método de detección	Referencia
Arábica	Verde (no tostado)	0.4	NM	0.07	05 de 21	Japón	HPLC	(Aoyama <i>et al.</i> , 2010)
Arábica	Tostado	0.55	NM	0.1	18 de 49	Japón	HPLC	
Arábica	Tostado	4.5	NM	0.81	05 de 21	Brasil	LC/ESI- MS/MS	(Bandeira <i>et al.</i> , 2012)
Arábica	Verde (no tostado)	46.65	3.04-358.85	16.33	09 de 43	Filipinas	HPLC	(Barcelo and Barcelo, 2018)
Arábica	Tostado	5.47	4.58 – 6.37	0.55	02 de 08	Filipinas	HPLC	
Robusta	Verde (no tostado)	257	3.71 – 514.46	97.66	17 de 51	Filipinas	HPLC	
Robusta	Tostado	4.82	3.03-7.57	0.87	09 de 20	Filipinas	HPLC	
Arábica	Tostado	1.84	NM	0.03	02 de 06	Portugal	HPLC-FLD	(Benites <i>et al.</i> , 2017)
Arábica	Tostado y molido	1.45	NM	0.02	01 de 05	Portugal	HPLC-FLD	
Arábica	Tostado y molido	0.42	ND - 0.086	0.09	05 de 06	Portugal	HPLC-FLD	
Arábica	Tostado y molido	0.78	0.79 - 1.56	0.17	03 de 03	Portugal	HPLC-FLD	
Arábica	Tostado y molido	1.47	0.8- 2.1	0.24	03 de 32	Taiwán	HPLC-FLD	(Chen <i>et al.</i> , 2016a)
Arábica	Café no especificado	3.9	0.8-7.2	0.62	28 de 59	Chipre	HPLC-FLD	(Christofidou <i>et al.</i> , 2015)
Arábica	Tostado y molido	2.17	1.21-4.21	0.79	35 de 72	España	HPLC-FLD	
Arábica	Tostado	1.96	1.21-4.21	0.79	35 de 72	España	HPLC-FLD	(Coronel <i>et al.</i> , 2012)
Robusta	Cereza Madura	51.25	15.8-87.8	2.2	08 de 08	Filipinas	HPLC- UV	(Culliao and Barcelo, 2015)
Robusta	cereza seca de café	97.3	NM	2.2	02 de 02	Filipinas	HPLC- UV	
Robusta	Verde (no tostado)	12.5	9.8-16.4	0.45	02 de 02	Filipinas	HPLC- UV	
Arábica	Café no especificado	21.33	4.90 - 37.73	3.41	04 de 21	Panamá	ELISA	(Franco <i>et al.</i> , 2014)
Arábica	Tostado	0.47	0.30-0.84	0.2	24 de 24	Chile	HPLC-FLD	(Galarce-Bustos <i>et al.</i> , 2014)
Arábica	Tostado	0.67	0.67-4.70	0.11	61 de 169	España	LC-MS/MS- IT	(García-Moraleja <i>et al.</i> , 2015a)
Arábica	Tostado	16.45	1.56-32.40	3.95	36 de 103	España	LC-MS/MS	(García-Moraleja <i>et al.</i> , 2016)
Arábica	Verde (no tostado)	3.92	3.14-4.23	0.94	07 de 23	España	LC-MS/MS	

Continuación Tabla 1

Variedad	Tipo de Café	Concentración media OTA (µg/Kg)	Rango de concentración. OTA (µg/kg)	Desviación estándar (µg/kg)	Muestras positivas vs. Total muestras	País	Método de detección	Referencia
Arábica	Tostado y molido	1.84	NM	0.44	01 de 03	España	LC-MS/MS-QQ	(García-Moraleja <i>et al.</i> , 2015b)
Arábica	Tostado	1.53	0.03-22.9	0.37	48 de 75	Etiopía	ELISA	(Geremew <i>et al.</i> , 2016)
Arábica	Verde (no tostado)	23.7	NM	5.69	01 de 09	Italia	HPLC-FLD	(Imperato <i>et al.</i> , 2011)
Arábica	Tostado	2.56	0.71-4.43	0.61	03 de 08	Malasia	HPLC-FLD	(Lee <i>et al.</i> , 2012a)
Arábica	Tostado	0.88	0.3 - 1.47	0.17	04 de 11	Malasia	HPLC-FLD	(Lee <i>et al.</i> , 2012b)
Arábica	Tostado	0.63	0.35-0.92	0.12	31 de 48	República Checa	HPLC-FLD	(Malir <i>et al.</i> , 2014)
Arábica	Tostado	2.3	NM	0.44	26 de 57	Alemania	UHPLC- MS/MS	(Nielsen <i>et al.</i> , 2015)
Arábica	Verde (no tostado)	1.7	NM	0.32	07 de 18	Alemania	UHPLC- MS/MS	
Arábica	Tostado	1.03	NM	0.17	08 de 30	Italia	HPLC/MS	(Prelle <i>et al.</i> , 2013)
Arábica	Tostado	5.95	LOQ-11.9	1.13	30 de 30	Francia	HPLC-FLD	(Tozlovanu & Pfohl- Leszkowicz 2010)
Arábica	Verde (no tostado)	68	1.0-136.9	12.92	18 de 50	Estados Unidos	UHPLC-MS	(Vaclavik <i>et al.</i> , 2013)
Arábica	Verde (no tostado)	10	1.0-20.2	1.9	16 de 30	Estados Unidos	UHPLC-MS	
Arábica	Verde (no tostado)	5.77	0.2-20.30	8.2	05 de 05	Argentina	HPLC-FLD	(Dundray and Pacin, 2013)
Arábica	Tostado	1	0.11-5.78	1.54	13 de 24	Argentina	HPLC-FLD	
Arábica	Tostado	0.44	0.33-0.52	0.08	06 de 06	Italia	HPLC-FLD	(Vecchio <i>et al.</i> , 2012)
Arábica	Verde (no tostado)	2.3	0.7-4.6	0.46	02 de 23	Corea del Sur	HPLC-FLD	(Park <i>et al.</i> , 2010)
Arábica	Tostado y molido	2.4	0.30-4.8	0.48	04 de 64	Corea del Sur	HPLC-FLD	
Arábica	Tostado	79	3.98-158.90	15.8	05 de 05	Turquía	ELISA	(Gazioglu and Kolak, 2018)
Arábica	Verde (no tostado)	1.3	0.2-12.2	0.26	52 de 71	Suiza	LC-MS/MS	(Bessaire <i>et al.</i> , 2019)

Tabla 2. Contaminación de OTA en café soluble comercializado en diferentes países.

País	Concentración de OTA (µg/kg)	Rango de concentración OTA (µg/kg)	Desviación estándar (µg/kg)	No. Muestras totales	No. muestras positivas	Método de Detección	Referencia
Chile	1.8	0.28-5.58	1.81	39	39	HPLC-FLD	(Galarce-Bustos <i>et al.</i> , 2014)
Malasia	5.71	1.58-9.82	1.08	5	5	HPLC-FLD	(Lee <i>et al.</i> , 2012a)
Malasia	4.91	0.51- 9.33	0.93	9	7	HPLC-FLD	(Lee <i>et al.</i> , 2012b)
República Checa	1.04	0.1-4.91	0.2	92	NM	HPLC-FLD	(Skarkova <i>et al.</i> , 2013)
Argentina	1.99	0.22-13.66	3.74	22	17	HPLC-FLD	(Dundray and Pacin, 2013)
Italia	1.27	0.32 - 6.40	1.03	44	42	HPLC-FLD	(Vecchio <i>et al.</i> , 2012)
Corea del Sur	0.5	0.4-0.6	0.1	51	0	HPLC-FLD	(Park <i>et al.</i> , 2010)
Corea del Sur	25.5	NM	2.04	39	NM	ELISA	(Lindenmeier <i>et al.</i> , 2011)

2.5 Café y su origen

El origen del café se remonta al año 858 en la provincia de Kaffa, Abisinia en el sudoeste de Etiopía, aunque hay controversia sobre su origen, ya que se dice que fue en Yemen donde se originaron los primeros cultivos y otros mencionan, que su origen fue en Arabia Saudita. Lo que si se reconoce es que el café se esparció por Asia y Europa mediante los sistemas de comercialización de los árabes. Las primeras plantas que llegaron a América fueron plantas adaptadas al clima de París y Ámsterdam y fueron plantadas en Martinica, Guayana Francesa y Surinam, de donde el cultivo fue llevado a Brasil y de ahí a otros lugares como Colombia, Panamá, Nicaragua, Honduras y México (Batista *et al.*, 2016). Hoy en día Brasil ocupa el primer lugar de la producción mundial de café. Este *comodity* durante el 2019/20 generó ganancias en el mercado mundial de USD\$ 200 billones de dólares, brindando importantes oportunidades para todos los que intervienen en su cadena de producción desde el cultivo hasta la comercialización (ICO, 2020).

El café es una planta que pertenece a la tribu *Coffeae* de la familia *Rubiaceae*. Existen más de 100 especies asociadas con el género *Coffea*, no obstante, las especies con mayor

importancia comercial son: *Coffea arabica* (arábica) y *Coffea canephora* (robusta) con una producción del 63% y 37% respectivamente (Batista *et al.*, 2016).

2.5.1 *Coffea arabica* (arábica)

Las variedades mayormente cultivadas son Bourbon, Typica, Caturra, Mundo Novo, Tico, San Ramón, y Jamaica azul de montaña. En México los principales cultivares son Typica, Bourbon, Caturra Rojo, Mundo Novo, Garnica y Caturra amarillo (López-García *et al.*, 2016). El árbol produce un café fino, suave y aromático. Los granos son planos y alargados y con un bajo contenido de cafeína. Sus hojas son verde oscuro y ovaladas. Las cerezas contienen dos semillas planas, que presentan un periodo de maduración de entre 7 y 9 meses. Comparado con robusta, sus árboles son menos vigorosos y son más susceptibles a plagas y enfermedades. Se desarrolla entre 600-1800 metros sobre el nivel del mar. Se cultiva principalmente en América Latina, en el Centro y Este de África, en la India y se extiende también a Indonesia (Batista *et al.*, 2016; Sakayima & Gava, 2014)

2.5.2 *Coffea canephora* (robusta)

El árbol de *Coffea canephora* (robusta) puede crecer hasta 10 metros de altura, con raíces superficiales, se caracteriza por ser más vigoroso y resistente a plagas y enfermedades, por lo que su cultivo es más económico y se realiza con mayor facilidad. El grano de café es ligeramente redondo y más pequeño que el grano de café arábica. El periodo de maduración de la fruta es de aproximadamente once meses. Se utiliza principalmente para cafés solubles y mezclas de café. Crece a 600 metros sobre el nivel del mar, en climas cálidos preferentemente entre 23-26 °C. Este café tiene un sabor más fuerte y también puede ser mezclado con arábicas. Es cultivado principalmente en el Centro y occidente de África, partes del sudoeste asiático y Brasil (Batista, 2016, Sakayima & Gava, 2014).

2.6 Procesamiento del café

Una vez que se inicia la plantación pueden transcurrir entre 3 y 4 años para iniciar la cosecha que puede ser realizada de manera manual, lo que permite seleccionar la fruta de

acuerdo con su grado de madurez y favorecer la calidad en el grano de café. También, se realiza la cosecha del grano de manera mecánica, con una cosecha de la cereza de madurez indiscriminada. En ambos casos toda la fruta es retirada de las ramas. El procesamiento que sigue a la cosecha puede ser por dos métodos: procesamiento húmedo o procesamiento seco, también llamado natural.

2.6.1 Procesamiento húmedo

En este proceso, la cereza madura se somete a tres etapas principales. Primeramente, el despulpado, para eliminar la cáscara y la pulpa; posteriormente, el grano se somete a fermentación para eliminar el mucilago y por último el secado hasta obtener el café pergamino con una humedad entre el 10-12%.

En la primera etapa, la cáscara se puede eliminar de manera manual, mecánica o con equipo especializado para extraer la semilla del fruto. En la segunda etapa, el grano ya liberado de la cascara se lleva a fermentación en tanques con agua durante 12 a 48 horas, para degradar el mucílago adherido al endocarpio, usando las enzimas producidas por microorganismos provenientes de la microbiota natural del café (Avallone *et al.*, 2001; Masoud & Kaltoft, 2006). La siguiente etapa, consiste en secar los granos de café en secadores eléctricos o de gas, en invernaderos o bien, exponiéndolos al sol directamente en el suelo ya sea de cemento, tabique o tablas durante 7 a 10 días, para alcanzar la humedad del 10 al 12% y obtener el café pergamino, que es la semilla cubierta del endocarpio. Una vez que se elimina el endocarpio se obtiene el café verde.

2.6.2 Procesamiento seco o natural

Este procesamiento es más simple y requiere menos equipo que el procesamiento húmedo, además, genera menos residuos líquidos y sólidos, sin la producción de efluentes con residuos de alto contenido de materia orgánica. Consiste en secar la cereza completa sin quitarle la cáscara y pulpa, desde una humedad inicial de aproximadamente el 70% hasta una final de entre 10 y el 12%. Generalmente no hay una selección de la fruta, sino que se incluyen tanto las cerezas que flotan como las que se sumergen y con diferentes grados de maduración. Las cerezas enteras se secan directamente al sol sobre superficies como el suelo de tierra, cemento, tabique, bambú, madera o una manta de lona. El café que se produce por este método se conoce como café cereza o café bola y su calidad dependerá del adecuado proceso de secado. La bebida de este tipo de café es de menor acidez y con mayor cuerpo (Batista *et al.*, 2016; FAO, 2006a).

2.7 Producción e importancia del café

El cultivo de café es una actividad económica importante que se realiza en más de 50 países alrededor del mundo en el que intervienen alrededor de 25 millones de agricultores entre hombres y mujeres, así como su familia en el medio rural. El aumento en su producción y comercialización favorece a los países exportadores e importadores y a todos los que participan en la cadena de valor del café: comerciantes, productores, tostadores, minoristas y distintas partes interesadas (ICO, 2019).

2.7.1 Producción de café en México

La producción de café en México reviste gran importancia económica y social, en su cultivo participan alrededor de 500 mil productores, hombres y mujeres, del medio rural, en 14 estados del país y 485 municipios de alta marginación. Representa el 0.7% del producto interno bruto (PIB) agrícola nacional y el 1.3% de la producción de bienes agroindustriales (FIRA, 2017).

Se cultivan principalmente dos variedades: la arábica y la robusta de manera convencional y en los últimos años ha tenido un impulso importante la agricultura orgánica.

En el ciclo 2019/20, México ocupó el décimo primer lugar en producción de café verde y ocupa el segundo lugar en la producción de café orgánico en el mundo. La producción nacional se concentra en los estados de: Chiapas, Veracruz, Puebla y Oaxaca, representando el 85% de la superficie cosechada. En este contexto Chiapas ocupa el primer lugar en la producción de café a nivel nacional tanto convencional como orgánico. Durante ese mismo ciclo 2019/20 produjo un volumen de 367,874 toneladas de café cereza, del cual el 85% es de la variedad *Coffea arabica* (SADER-SIAP, 2020).

2.8 Diversidad microbiana del café

La diversidad microbiana o microbiota del café juega un rol importante en cada etapa de su procesamiento, desde la cosecha hasta su comercialización. La microbiota presente está condicionada al buen manejo durante todos los pasos implicados para evitar en gran medida, el desarrollo de microorganismos indeseables, que contaminen el café y en consecuencia modifiquen su calidad como es el caso de los hongos ocratoxigénicos (Batista *et al.*, 2009; de Melo Pereira *et al.*, 2017).

Además, la microbiota nativa constituye un elemento importante para conferir los atributos de calidad del café verde y de una taza de excelencia, sumado con factores como la variedad genética de la planta de café, el clima, la zona geográfica, la microbiota del suelo, el tipo de cultivo, el tipo de procesamiento (húmedo o seco), la competencia por el sustrato entre la microbiota presente, la capacidad enzimática de las especies y su actividad antimicrobiana (Batista *et al.*, 2016; Huch & Franz, 2014; Silva, Batista, Abreu, Dias, & Schwan, 2008a; Silva *et al.*, 2011; Vilela, Pereira, Silva, Batista, & Schwan, 2010; Zhang *et al.*, 2019).

Se ha estudiado la microbiota asociada a la cadena de producción del café en países como Brasil, Colombia, Ecuador, Tailandia, entre otros, en función de la variedad, del tipo de procesamiento postcosecha y del cultivo, empleando métodos dependientes e independientes de cultivo. En la Tabla 3, se presentan los resultados reportados por diferentes grupos de trabajo (De Bruyn *et al.*, 2017; Evangelista *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2016; Silva, Batista, & Schwan, 2008b; Vilela *et al.*, 2010; Waters, Arendt, & Moroni, 2017). Muchos de los estudios están enfocados a la identificación y selección de microorganismos durante la fermentación del café durante el procesamiento húmedo, mejoramiento de la fermentación para favorecer las propiedades sensoriales y organolépticas, como el aroma y sabor (de Melo Pereira *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019). También se han enfocado al estudio de la contaminación de hongos filamentosos productores de micotoxinas entre ellas la OTA y su control biológico mediante la utilización de bacterias ácido lácticas y levaduras principalmente (Batista *et al.*, 2009; Djossou *et al.*, 2011; Evangelista *et al.*, 2015; Fabiana *et al.*, 2014; Masoud & Kaltoft, 2006; Pereira *et al.*, 2016; Rezende *et al.*, 2013; Vilela *et al.*, 2010).

Durante los procesamientos húmedo y seco del café, las interacciones de las bacterias, levaduras y las diferentes especies de hongos ocurren de manera natural en la medida en que las condiciones de humedad y nutrientes van cambiando durante el tiempo de secado. Estas interacciones pueden afectar positiva o negativamente al desarrollo de hongos filamentosos ya que en la interacción entre hongos micotoxigénicos y otros hongos, pueden competir por nutrientes durante su desarrollo y crecimiento, incluso la degradación e inhibición de las micotoxinas que producen (Fabiana *et al.*, 2014; Pitt *et al.*, 2013).

Tabla 3. Bacterias, levaduras y hongos en café procesado en diferentes países

Variedad/ Procesamiento/ Cultivo/ Método identificación	Bacterias	Levaduras	Hongos	Referencia / País
Arabica/Seco /C/D	Gram negativos (<i>Aeromonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i>), Gram positivos (<i>Bacillus</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Broxhathrix</i> , <i>Dermabacter</i> y <i>Lactobacillus</i>)	<i>Arxula adenivorans</i> , <i>Pichia ofunaensis</i> , <i>P. acaciae</i> , <i>P. anomala</i> , <i>P. ciferii</i> , <i>P. jadinii</i> , <i>P. lynferdii</i> , <i>P. sydowiorum</i> , <i>Blastobotrys proliferans</i> , <i>Candida aurangiensis</i> , <i>C. glucosiphila</i> , <i>C. incommunis</i> , <i>C. paludigena</i> , <i>C. schatarii</i> , <i>C. vartiovaarae</i> , <i>Citeromyces matritensis</i> , <i>Geotrichum fermentans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomycopsis fermentans</i> , <i>S. fibuligera</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Sporopachydermia cereana</i> , <i>oedocephales</i> , <i>Williopsis saturnus var. sargentensis</i> , <i>Trichosporonoides oedocephales</i> , <i>Williopsis saturnus var. sargentensis</i> .	<i>Cladosporium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Bauvaria</i> , <i>Monilia</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Arthrobotrys</i>	Silva et al. (2000) / Brasil
Arabica/Húmedo/C/D	Gram-negative bacilli. <i>Klebsiella</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Pseudomonas capaciae</i> , <i>Chrysomonas luteola</i> , <i>Ln. mesenteroides dextranicum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. herbicola</i> y <i>E. dissolvens</i> .	<i>Kloeckera apis apiculata</i> , <i>Cryptococcus laurentii</i> , <i>C. albidus</i> , <i>Candida guilliermondii</i> .	N.E	Avallone et al. (2001) / México
Arabica/Húmedo/C/D	N. E	N.E	Sección <i>Versicolors</i> (<i>A. caespitosus</i> , <i>A. granulatus</i> , <i>A. sydowii</i> , <i>A. versicolor</i>), De la sección <i>Flavi</i> (<i>A. flavus</i> , <i>A. tamarii</i>), Sección <i>Nigri</i> (<i>A. niger</i> var. <i>awamor</i> , <i>A. niger</i> var. <i>niger</i> , <i>A. foetidus</i>), Sección <i>Circumdati</i> (<i>A. auricomus</i> , <i>A. elegans</i> , <i>A. insulicola</i> , <i>A. lanosus</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. ostianus</i> , <i>A. petrakii</i> , <i>A. sclerotiorum</i> , <i>A. sulphureus</i> , Sección <i>Aspergillus</i> <i>Teleomorfos</i> (<i>Eurotium amstelodami</i> , <i>Eurotium chevalieri</i>), Sección <i>Penicillium</i> (<i>P. aurantiogriseum</i> , <i>P. brevicompactum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. corylophilum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. glabrum</i> , <i>P. solitum</i>)	Batista et al. (2003) /Brasil
Arabica/Húmedo/C/D & Ind	N.E	<i>Pichia kluyveri</i> , <i>Pichia anomala</i> y <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Candida pseudointermedia</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Pichia ohmeri</i> and <i>Torulasporea delbrueckii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Candida xestobii were</i>	N.E	Masoud et al. (2004) / Tanzania
Arabica/Seco/C/D	N.E	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>D. polymorphus</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> , <i>P. burtonii</i> , <i>P. anomala</i> , <i>S. smithiae</i> , <i>P. sydowiorum</i> , <i>P. subpelliculosa</i> , <i>Candida saitoana</i> , <i>C. fermentati</i> , <i>C.membranifaciens</i> , <i>Stephanosascus smithiae</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Arxula adenivorans</i> , <i>Pichia kluyveri</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Candida pseudointermedia</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Torulasporea delbrueckii</i> , <i>Eremothecium coryli</i> .	<i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Fusarium lateritium</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. illudens</i> , <i>F. moniliforme</i> (sin. <i>verticillioides</i>), <i>F. nivale</i> , <i>Pestalotia sp.</i> , <i>Paecilomyces sp.</i> , <i>Penicillium minioluteum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>P. solitum</i> , <i>P. funiculosum</i> , <i>P. brevicompactum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>C. cladosporioides</i> , <i>Paecilomyces sp.</i> , <i>P. minioluteum</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. purpurogenum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Pestalotia sp.</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>P. fellutanum</i> , <i>P. corylophilum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. janthinelum</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. waksmanii</i> , <i>A. dimorphicus</i> , <i>F. xylarioides</i> , <i>F. stilboides</i> , <i>F. concolor</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>F. xylarioides</i> , <i>F. trinctum</i> , <i>P. aurantiogriseum</i> , <i>P. waksmanii</i> , <i>P. minioluteum</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. tamari</i> , <i>A. sydowii</i> , <i>F. lateritium</i>	Silva et al. (2008a)/Brasil

2. Antecedentes

Arabica/Seco/C/D	N.E	N.E	<i>Aspergillus</i> of section <i>Circumdati</i> , <i>Aspergillus westerdijkiae</i> y <i>A. melleus</i> , <i>A. steynii</i> , <i>A. sclerotiorum</i> . <i>Aspergillus</i> spp. of section <i>Nigri</i> , <i>A. tubingensis</i> , <i>A. foetidus</i> , <i>A. aculeatinus</i>	Noonim et al. (2008) / Tailandia
Robusta/seco/C/D	N.E	N.E	<i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. westerdijkiae</i> , <i>A. tubingensis</i> , <i>A. aculeatinus</i> , <i>A. sclerotiorum</i>	
Arabica/Seco/C/D	<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. macerans</i> , <i>Acinetobacter</i> sp., <i>B. cereus</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>B. polymyxa</i> , <i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>Yersinia</i> sp., <i>B. megaterium</i> , <i>Lh. Brevis</i> , <i>Yersinia herbicola</i> , <i>Kurthia</i> sp., <i>Tatumella ptyseos</i> , <i>Serratia rubidea</i> , <i>S. plymutica</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Providencia mirabilis</i> .	<i>Candida saitoana</i> , <i>Candida fermentati</i> , <i>Stephanoascus smithiae</i> , <i>Debaryomyces polymorphus</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> , <i>C. membranifaciens</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>P. burtonii</i> , <i>P. anomala</i> , <i>S. smithiae</i> , <i>P. guilliermondii</i> , <i>D. polymorphus</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>P. Burtonii</i> , <i>P. anomala</i> , <i>Arxula adenivorans</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>P. sydowiorum</i> , <i>P. subpelliculosa</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Arxula adenivorans</i> , <i>D. polymorphus</i> .	<i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Penicillium corylophilum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. brevicompactum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>P. solitum</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. sydowii</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>F. concolor</i> , <i>A. foetidus</i> , <i>A. dimorphicus</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>F. lateritium</i> ,	Silva et al. (2008b)/Brasil
Arabica/húmedo y seco /C/D	N.E	N.E	Genero <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> y <i>Circumdati</i> . <i>A. ochraceus</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>A. auricomus</i> , <i>A. sclerotiorum</i> , <i>A. dimorphicus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. ustus</i> , <i>A. sydowii</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. nidulans</i>	Batista et al. (2009) /Brasil
Arabica /Semihúmedo/C/Ind	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .	<i>Pichia anomala</i> , <i>P. caribbica</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Saccharomyces</i> sp., <i>S. bayanus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Torulasporea delbrueckii</i> , <i>Arxula</i> sp., <i>Candida ernobii</i> , <i>C. fukuyamaensis</i> , <i>C. membranifaciens</i> , <i>C. carpophila</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Kloeckera</i> sp., <i>Kluyveromyces</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp., <i>A. chevalieri</i> , <i>A. foetidus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. tubingensis</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Cladosporium macrocarpum</i> , <i>Cylindrocarpum</i> sp., <i>Eurotium chevalieri</i> , <i>Fusariella</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Fusarium chlamydosporum</i> , <i>Fusarium lateritium</i> , <i>Fusarium nivale</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>Geotrichum</i> sp., <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>P. brevicompactum</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. decumbens</i> , <i>P. fellutanum</i> , <i>P. implicatum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>Phoma</i> sp., <i>Ulocladium</i> sp.	Vilela et al. (2010)/Brasil
Arabica/NM/C/Ind	<i>Weissella confusa</i> , <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis subs lactis</i> , <i>Leuconostoc citreum</i> , <i>Weissella thailandensis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus</i> sp., <i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Enterococcus pallens</i> .	N.E	N.E	Leong et al. 2014/Taiwán
Arabica/Húmedo y seco/C y O/ D	N.E	N.E	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Epicoccum</i> , <i>Phoma</i> , <i>Bipolaris</i> , <i>Glomerella</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Cliocladium</i>	Fabiana et al. (2014) / Brasil
Arabica/NM/C/Ind	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , and <i>Lactobacillus paracasei</i> .	<i>Pichia anomala</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Candida</i> sp., <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida zeylanoides</i> , <i>Candida maris</i> , <i>Candida inconspicua</i> , <i>Candida magnolia</i> , <i>Clavispora lusitanae</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>S. roseus</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> y <i>Torulasporea delbrueckii</i>	N.E	de Melo Pereira et al. (2014)/Brasil
Arabica/Húmedo/C/Ind	<i>Staphylococcus warneri</i> , <i>Erwinia persicina</i> , <i>Enterobacter asburiae</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Enterococcus</i> sp., <i>O. pseudogrignonense</i> , <i>C. taichungense</i> , <i>C. bovis</i> , <i>E. persicina</i> , <i>S. warneri</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. amylolyticus</i> , <i>Curtobacterium</i> sp., <i>K. oxytoca</i> , <i>B. amyloliquefacien</i> , <i>E. hermannii</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>E. ludwigii</i> , <i>C. pallidum</i> , <i>P. agglomerans</i> , <i>P. dispersa</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Microbacterium</i> sp., <i>M. laevaniformans</i> , <i>W. cibari</i> , <i>Kocuria</i> sp., <i>L. mesenteroides</i>	<i>Meyerozyma caribbica</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Torulasporea delbrueckii</i> , <i>P. fermentans</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>C. railiensis</i> , <i>C. quercitrusa</i> , <i>W. ciferrii</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>W. anomalus</i>	N.E	Evangelista et al. 2015 / Brasil
Robusta/seco/C/D	N.E	N.E	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> , <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i> and <i>Mucor</i>	Djossou et al. (2015)/Costa de Marfil

2. Antecedentes

Arabica /Húmedo /C/Ind	<i>Weissella, Lactobacillus, Leuconostoc mesenteroides, Ralstonia sp, Acidovorax sp, Lactococcus lactis subsp. Lactis, Enterobacter, Pantoea ananatis or Pantoea sp, Enterobacteriaceae, Lactobacillus fermentum.</i>	<i>Hanseniaspora uvarum, Cladosporium sphaerospermum, Candida quercitrusa, Meyerozyma (Pichia) caribbica o M. Guilliermondii</i>	N.E	Hamdouche <i>et al.</i> (2016)/Camerún
Arabica/Seco/C/Ind	<i>Enterobacter, Pantoea ananatis or Pantoea sp, Enterobacteriaceae, Chryseobacterium, Citrobacter</i>	<i>Cladosporium sphaerospermum, Candida quercitrusa, Meyerozyma (Pichia) caribbica o M. Guilliermondii</i>	<i>Sordariomycetes sp, Aspergillus, Penicillium, Saccharomycetes</i>	
Robusta/seco/C/Ind	<i>Enterobacter, Pantoea ananatis or Pantoea sp, Enterobacteriaceae, Chryseobacterium, Citrobacter, Microbacterium sp.</i>	<i>Wallemia, Cladosporium sphaerospermum, Candida quercitrusa, Meyerozyma (Pichia) caribbica o M. Guilliermondii,</i>	<i>Sordariomycetes sp, Aspergillus, Penicillium, Saccharomycetes</i>	
Arabica/Húmedo/C/Ind	<i>Leuconostoc, Lactococcus, and Lactobacillus, Enterobacterium, Enterobacteriaceae (Klebsiella pneumoniae), Gluconobacter spp., Dyella kyungheensis, Leuconostoc mesenteroides/pseudomesenteroides, Weissella</i>	<i>Pichia, Starmerella, Candida</i>	NE	De Bruyn <i>et al.</i> (2017)/Ecuador
Arabica/Seco/C/Ind	<i>Acetobacteraceae, Leuconostoc, Lactobacillus, Enterobacteriaceae, Gluconobacter</i>	<i>Pichia, Candida, Starmerella y Sacharomycopsis,</i>	N.E	
Arabica/húmedo y seco/C/D & Ind	<i>Lactobacillus coryniformis, Lactobacillus plantarum, Lactococcus hircilactis, Lactococcus lactis, Leuconostoc citreum, Leuconostoc holzapfelii, Leuconostoc mesenteroides, Leuconostoc pseudomesenteroides, Weissella soli</i>	<i>Candida humilis, Candida quercitrusa, Candida solani, Cordyceps bronngiartii, Hanseniaspora uvarum, Hanseniaspora vineae, Lachancea lanzarotensis, Papiliotrema terrestris, Pichia kluyveri, Saccharomyces cerevisiae, Starmerella bacillaris, Torulaspora delbrueckii, Wickerhamomyces anomalus</i>	N.E	Zhang <i>et al.</i> (2019)/Ecuador
Arabica/Húmedo/C/ D & Ind	<i>Enterobacter cowanii, Pantoea agglomerans, Enterobacteriaceae bacterium, Rahnella aquatilis, Bacillus cereus</i>	<i>Pichia kluyveri, Hanseniaspora uvarum, Pichia fermentans, Wickerhamomyces anomalus, Debaryomyces hansenii, Geotrichum silvicola</i>	<i>Gibberella stilboides, Cladosporium</i>	Feng <i>et al.</i> (2016)/China
Arabica /Húmedo/C/Ind	<i>Leuconostoc, Leuconostocaceae, Lactococcus, Lactobacillus, Pediococcus, Enterobacteriaceae, Acetobacteraceae, Pseudomonas, Methylobacteriaceae, Rhizobiaceae, Sphingomonadaceae, Cytophagaceae, Moraxellaceae, Sphingobacteriaceae, Weeksellaceae, Hypomicrobiaceae</i>	<i>Schwanniomyces sp., Candida vanderwaltii, Physciceae, Lobulomycetales, Tremellaceae, Bensingtonia sp., Martiniozyma asiatica, Saccharomycopsidaceae, Malassezia sp., Classiculaceae, Dipodascus tetrasporeus, Candida sp., Pichia nakasei</i>	N.E	Oliveira <i>et al.</i> (2019)/Colombia
<p>N.E.= No estudiado D = Métodos dependientes de cultivo (asilamiento e identificación macroscópica, microscópica, API, etc.). Ind= Método Independiente de cultivo (Técnicas moleculares de identificación, NGS, DGEE, etc.) C = Cultivo convencional O = Cultivo orgánico</p>				

2.8.1 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL son bacterias de diferentes géneros cuyas características morfológicas y fisiológicas son similares. Han sido estudiadas desde hace varias décadas por su capacidad de producir metabolitos como el ácido láctico, de importancia para la industria alimentaria que permiten inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos (Balkacem-Hanfi *et al.* 2014; Dalié *et al.* 2010). Las BAL pueden ser cocos o bacilos, Gram positivas, no esporuladas, no móviles, anaeróbicas, aerotolerantes, oxidasa y catalasa negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen principalmente ácido láctico como producto de la fermentación de azúcares. La mayor parte de las especies crecen, en medios con un pH entre 4 y 4.5 Algunas también son capaces de crecer en medios con pH bajo (3.2) y otras, en medios con pH alcalino (9.6). Los géneros representativos de las BAL, que pertenecen al Filo Firmicutes son *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Weissella*, *Pediococcus* y *Lactococcus* y del Filo Actinobacteria se encuentra el género *Bifidobacterium*. Estos géneros, mencionados previamente, estaban considerados hasta marzo del año 2020, ya que el género *Lactobacillus* fue reclasificado en 25 nuevos géneros incluyendo *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* y *Lentilactobacillus* (Zheng *et al.*, 2020). Cabe señalar que en este trabajo se considerarán ambas clasificaciones, no obstante, en la parte de resultados y discusión se considerará la nueva reclasificación.

Ante la importancia del café desde el punto de vista económico y el creciente consumo de esta bebida en el mercado, existe una permanente inquietud por la seguridad e inocuidad alimentaria para la salud humana debido a la presencia de la OTA. Se han realizado recientes investigaciones para aprovechar la actividad antifúngicas de las BAL para inhibir el crecimiento de los hongos ocratoxigénicos y la reducción y/o eliminación de la toxina (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2019; de Melo Pereira *et al.*, 2015a; Belkacem-Hanfi *et al.*, 2014; Leong *et al.*, 2014; Djossou *et al.*, 2011; Dalié *et al.*, 2010).

Leong *et al.* (2014) estudiaron la diversidad de BAL y su actividad contra *Aspergillus flavus* en cerezas frescas de café. Las especies encontradas más comunes fueron *Lactococcus lactis* subs. *Lactis*, *Leuconostoc* y *Weissella* en granjas ubicadas a 800 metros sobre el nivel del mar (msnm). Cuando se estudió el café de otra localidad ubicada a 1,200 msnm, se encontró una cepa de *Enterococcus faecalis* productora de una bacteriocina con capacidad para inhibir el crecimiento de *Aspergillus flavus*. Djossou *et al.* (2011) evaluaron la actividad antagonica de BAL aisladas de un ensilado de pulpa de café y encontraron que la bacteria *Lactobacillus plantarum* sp. presentó una actividad antifúngica mayor contra *Aspergillus carbonarius*, microorganismo productor de OTA. Estudios similares de aislamiento y selección de BAL con características antifúngicas de hongos micotoxigénicos, se han realizado en cereales como el trigo (Belkacem-Hanfi *et al.*, 2014, Gupta & Srivastava, 2014), en maíz (Dogi *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014; Tatsadjieu *et al.* 2016), en pan de trigo (Cizeikiene *et al.* 2013), en quesos (Cheong *et al.* 2014). En la Tabla 4 se presenta un resumen de estudios realizados con BAL su identificación y su efecto antagónico sobre algunos microorganismos incluyendo hongos filamentosos como *Aspergillus* y *Fusarium*.

2.8.2 Levaduras

Las levaduras juegan un papel importante en el procesamiento postcosecha durante la fermentación del café durante el procesamiento húmedo, pues las enzimas que producen estos microorganismos permiten la degradación del mucílago. Además, las levaduras favorecen al igual que las BAL, la producción de compuestos que confieren aromas y sabores que contribuyen a la calidad del grano. Hoy en día se estudian para su utilización como iniciadores de la fermentación en conjunto con las BAL (de Melo Pereira *et al.*, 2019). Sumado a lo anterior se han reportado los efectos inhibitorios y antagónicos sobre algunos hongos filamentosos productores de toxinas como la OTA, así como las interacciones entre las diferentes BAL y entre las mismas levaduras de diferentes géneros y especies, que permiten reducir el riesgo de la presencia de toxinas en el café (Pereira *et al.*, 2015a).

Tabla 4. Bacterias lácticas y su actividad antifúngica.

Bacteria Ácido Láctica	Espectro de Actividad	Referencia
Género Lactococcus		
<i>Lc. lactis</i>	<i>A. parasiticus</i>	Wiseman and Marth, 1981; Luchese & Harrigan, 1990
<i>Lc. lactis</i>	<i>A. flavus</i>	Coallier-Ascah & Idziac, 1985
<i>Lc. lactis subs diacetylactis DRCI</i>	<i>A. fumigatus, A. parasiticus</i>	Batish <i>et al.</i> , 1989
<i>Lc. lactis subsp. Lactis CHD 28.3</i>	<i>A. flavus, A. parasiticus, Fusarium sp</i>	Roy <i>et al.</i> 1996
<i>Lc. lactis subsp. cremoris</i>	<i>P. expansum</i>	Florianowicz, 2001
<i>Lactococcus sp</i>	<i>A. niger, F. oxysporu, P. chrysogenum</i>	Varsha, <i>et al.</i> , 2015
Género Lactobacillus		
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp., Alternaria alternata, Penicillium sp.</i>	De Muynck <i>et al.</i> , 2004 ; Garcha & Natm 2012; Gerez <i>et al.</i> , 2012; Magnusson <i>et al.</i> 2003
<i>Lb. acidophilus R</i>	<i>A. fumigatus, A. parasiticus</i>	Batish <i>et al.</i> , 1990
<i>Lb. casei subsp. rhamnosus</i>	<i>Penicillium spp. Aspergillus niger. Fusarium spp.</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 1991; Mayrá-Mäkinen <i>et al.</i> , 1994
<i>Lb. casei subsp. pseudopantarum</i>	<i>A. flavus</i>	Gourama & Bullerman (1995, 1997)
<i>Lb. casei</i>	<i>Penicillium sp., Trichophyton tonsarans, A. niger, Fusarium graminearum.</i>	Gourama, 1997; Florianowicz, 2001; Gerez <i>et al.</i> , 2012; Guo <i>et al.</i> 2011
<i>Lb. coryniformis subsp. coryniformis Si3</i>	<i>Amplio espectro</i>	Magnusson and Schnürer, 2001
<i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>P. expansum</i>	Florianowicz, 2001
<i>Lb. plantarum</i>	<i>Penicillium spp., Aspergillus spp.</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 1991
<i>Lb. plantarum VTT E-780676</i>	<i>F. avenaceum</i>	Niku-Paavola <i>et al.</i> , 1999
<i>Lb. plantarum</i>	<i>P. corylophilum, P. roqueforti, P. expansum, A. niger, A. flavus, F. graminearum, F. sporotrichioides, A. fumigatus, A. nidulans</i>	Lavermicocca <i>et al.</i> , 2000; Ström <i>et al.</i> , (2002,2005)
<i>Lb. plantarum Mi LAB 14</i>	<i>P. roqueforti, P. cominune, A. nidulans, A. fumigatus</i>	Sjögren <i>et al.</i> 2003
<i>Lb. plantarum</i>	<i>A. flavus, F. graminearum</i>	Sathe <i>et al.</i> 2007
<i>Lb. plantarumYML007</i>	<i>Amplio espectro</i>	Rather, <i>et al.</i> , 2013
<i>Lb. plantarum</i>	<i>A. carbonarius</i>	Djossou, <i>et al.</i> , 2011
<i>Lb. plantarum</i>	<i>Penicillium solitum, A. versicolor y Cladosporium herbarum</i>	Cheong, <i>et al.</i> 2014
<i>Lb. plantarum</i>	<i>Amplio espectro</i>	Belkacem-Hanfi, <i>et al.</i> 2014
<i>Lb. plantarum LR/14</i>	<i>A. niger, Rhizopus stolonifer, Mucor rceomos y P. chrysogenum</i>	Gupta & Srivasta, 2014
<i>Lb. reuteri</i>	<i>F. graminearum</i>	Gerez <i>et al.</i> , 2009; Gerez <i>et al.</i> , 2012

Fuente: Elaboración propia con datos de: Oliveira *et al.*, 2014; Dalié *et al.*, 2010

Continuación Tabla 4 Bacterias lácticas y su actividad antifúngica.

Bacteria Ácido Láctica	Espectro de Actividad	Referencia
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Penicillium spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i>	Stiles <i>et al.</i> , 2002
<i>Lb. rhamnosus RC007</i>	<i>F. graminearum</i>	Dogi, <i>et al.</i> , 2013
<i>Lb. sanfranciscensis CBI</i>	<i>Fusarium spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i>	Corsetti <i>et al.</i> , 1998
<i>Lb. brevis</i>	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Fusarium culmonarum</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Eurotium repens</i> , <i>Trichophyton tonsarans</i>	De Muynck <i>et al.</i> , 2004 ; Gerez <i>et al.</i> , 2012; Guo <i>et al.</i> , 2011; Mauch <i>et al.</i> , 2010; Tatsadjieu <i>et al.</i> , 2016
<i>Lb. fermentum</i>	<i>A. niger</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>F. solani</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>A. versicolor</i>	Tatsadjieu <i>et al.</i> 2016
<i>Lb. sakei KTU05-6</i>	<i>F. culmorum L-2</i> , <i>A. niger MD-029</i>	Cizeikiene, <i>et al.</i> , 2013
Género <i>Leuconostoc</i>		
<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>Penicillium spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 1991
Género <i>Pediococcus</i>		
<i>Pc. acidilactici LAB 5</i>	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Penicillium spp.</i>	Mandal <i>et al.</i> , 2007
<i>Pc. acidilactici KTU05-7</i>	<i>F. culmorum L-2</i>	Cizeikiene, <i>et al.</i> , 2013
<i>Pc. pentosaceus</i>	<i>P. expansum</i>	Rouse <i>et al.</i> , 2008
<i>Pc. pentosaceusKTU05-8</i>	<i>F. culmorum L-2</i>	Cizeikiene, <i>et al.</i> , 2013
Género <i>Enterococcus</i>		
<i>E. durans</i>	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> and <i>Debaryomyces hansenii</i>	Belguesmia, <i>et al.</i> 2012
<i>E. durans</i>	<i>P. crysigebyn</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>A. parasiticus</i>	Kivanc <i>et al.</i> , 2014
Género <i>Weissella</i>		
<i>Weissella cibaria</i>	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Rhodotorula sp.</i> , <i>Endomyces fibuliger</i>	Lan <i>et al.</i> , 2012; Mauch <i>et al.</i> , 2010, Rouse <i>et al.</i> , 2008; Trias <i>et al.</i> , 2008; Valerio <i>et al.</i> , 2009
<i>Weissella confusa</i>	<i>Penicillium sp.</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>Rhodotorula sp.</i> , <i>Endomyces fibuliger</i>	Rouse <i>et al.</i> , 2008; Valerio <i>et al.</i> , 2009
<i>Weissella paramesenteroides</i>	<i>Penicillium sp.</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Sclerotium oryzae</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Borytis cinerea</i> , <i>Sclerotinia minor</i>	Lan <i>et al.</i> , 2012; Sathe <i>et al.</i> , 2007

Fuente: Elaboración propia con datos de: Oliveira *et al.*, 2014; Dalié *et al.*, 2010

2.9 Análisis de la diversidad microbiana

2.9.1 Métodos dependientes e independientes de cultivo

La diversidad microbiana en el café o cualquier otra matriz alimentaria puede estudiarse mediante métodos convencionales, denominados “dependientes de cultivo” o bien por métodos “independientes de cultivo”.

Los métodos dependientes de cultivo son aquellos que emplean medios de cultivo específicos para el desarrollo e identificación de los microorganismos de interés, en donde únicamente los microorganismos cultivables serán los que se identifiquen. Estos métodos no permiten conocer la población microbiana en su totalidad ya que se estima que más del 90% de los microorganismos que existen en ambientes naturales no pueden ser crecidos con los medios de cultivo actualmente disponibles (Castelán, 2019). Aunque los métodos dependientes de cultivo presentan limitaciones respecto al estudio completo de la diversidad microbiana asociada con las muestras, hoy en día, se continúan utilizando, siendo de gran importancia para la industria alimentaria y biotecnológica, para el aislamiento y selección de microorganismos con características y capacidades de interés.

Los métodos independientes de cultivo permiten observar de manera más amplia las poblaciones microbianas presentes en ecosistemas naturales, sin tener un cultivo previo, considerando que el crecimiento, la sobrevivencia y la actividad de cualquier especie puede estar condicionada por diferentes factores como los nutrientes, los cambios de pH, la humedad, las interacciones entre otras especies o por los metabolitos que se producen. Además, estos métodos permiten reconocer la evolución de las poblaciones microbianas en el transcurso del tiempo (Handelsman, 2005; Waters, *et al.*, 2017).

Los métodos independientes de cultivo utilizan los ácidos nucleicos (ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN)) de la muestra y su posterior análisis sin que se involucre cultivo alguno (Ghosh & Bhadury, 2019). Con la aplicación de la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es posible obtener una mejor observación de las comunidades microbianas cultivables y no cultivables sin ser

distorsionada por el sesgo de un cultivo. Los microorganismos no cultivables contienen miembros que divergen profundamente de la minoría fácilmente cultivable (Handelsman, 2005).

La biología molecular representa una herramienta fundamental en la aplicación de los métodos independientes de cultivo, cuya aplicación desde los años 80's ha sido invaluable para el estudio de la ecología microbiana. Mediante el uso de marcadores moleculares genéticos provenientes de los ácidos nucleicos de los distintos microorganismos, se han construido bases de datos que permiten identificar las especies presentes en una muestra.

2.9.2 Marcadores genéticos

Son fragmentos de ADN, cuya composición (secuencias) debe contener una variabilidad y divergencia genética a nivel de especie, debe poseer sitios conservados adyacentes que permitan el diseño de iniciadores universales para su amplificación por PCR y debe tener una longitud que facilite su secuenciación para que sea reproducible y precisa.

El más utilizado en la identificación de procariotas es el fragmento del gen rARN 16S. Su secuencia comprende alrededor de 1.5 kb y está compuesta por regiones conservadas y variables como se muestra en la Figura 2.

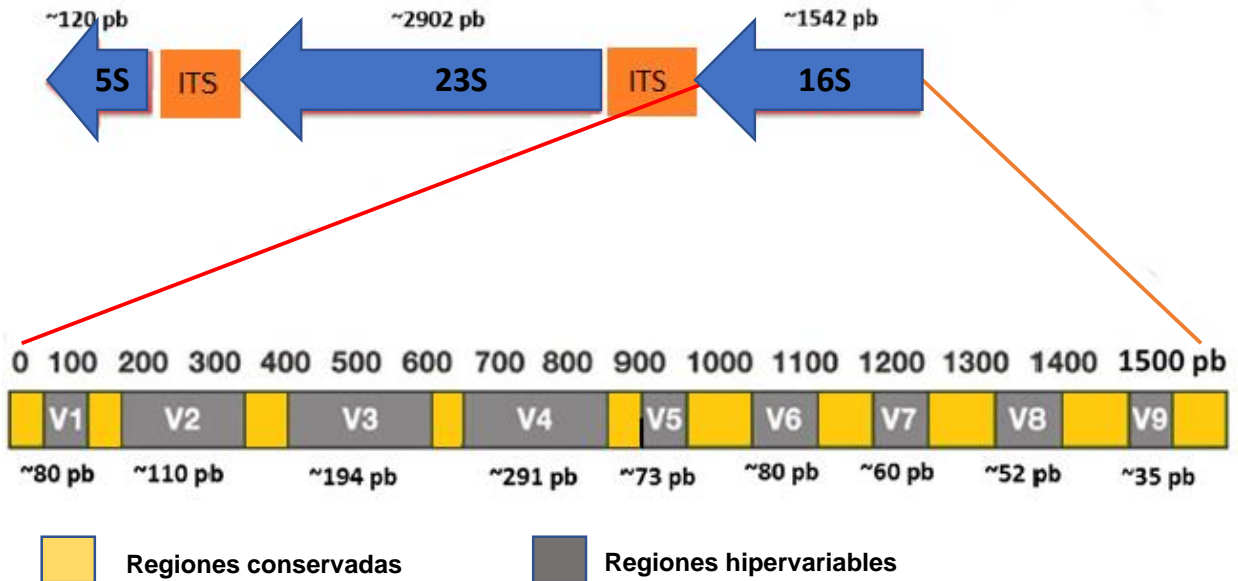


Figura 2. Gen 16S rRNA. Las nueve regiones hipervariables y conservadas (Fuente: Gürtler et al., 2014).

Las regiones conservadas son similares en todas las bacterias. Las regiones hipervariables son similares para una misma especie y son diferentes entre especies.

Para la identificación de eucariotas se utilizan marcadores genéticos derivados del rARN/rADN, se presenta en repeticiones tándem y está formado por tres subunidades altamente conservadas (18 rADN, 5.8 rADN y 28 rADN), separadas por dos espaciadores con elevadas tasas de sustitución (ITS1 e ITS2) (Figura 3). Estas repeticiones en tándem se encuentran conservadas a lo largo de todo un genoma y evolucionan concertadamente, lo que se atribuye a eventos recombinatorios como entrecruzamiento desigual y conversión génica.

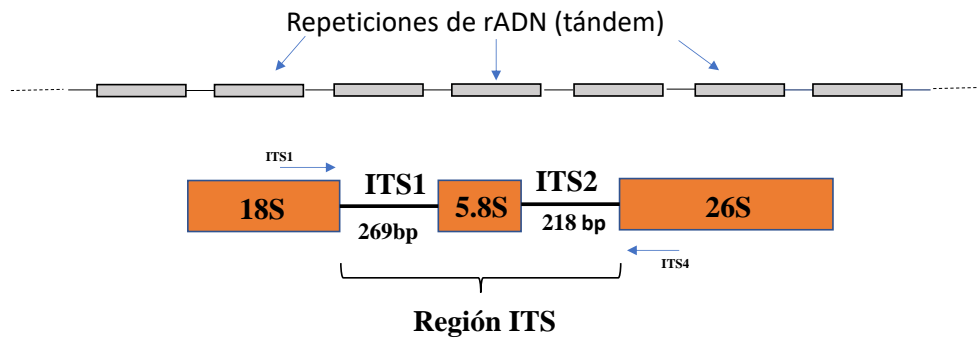


Figura 3. Genes rARN (rADN) de hongos encontrados como secuencias tándem (ITS) (Fuente: Alhawatemala *et al.*, 2019)

Generalmente para la identificación se utilizan la región 18S, 26S e ITS, donde el espaciador interno transcrito es el que mayormente se utiliza para la identificación de hongos (Porrás-Alfaro *et al.*, 2014).

2.9.3 Métodos independientes de cultivo

Hoy en día se utilizan diferentes métodos para analizar la ecología microbiana y su diversidad. La secuenciación masiva de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés) también conocida como de alto rendimiento (HTS), se ha venido utilizando ampliamente en la última década para los estudios en diferentes ecosistemas tanto alimentarios como del medio ambiente. Esta metodología es rápida, económica, de alto rendimiento y confiable en el análisis de las secuencias más largas (Ghosh & Bhadury, 2019).

La NGS permite la construcción *in vitro* de la biblioteca de secuenciación, la amplificación clonal *in vitro* de fragmentos de ADN, la secuenciación basada en matrices

que permite la multiplexación de fragmentos de ADN y la inmovilización de ADN en fase sólida en un sustrato de vidrio (Cao *et al.*, 2017; Kergourlay *et al.*, 2015).

Se han desarrollado diferentes plataformas comerciales de NGS; en el 2005 la compañía 454, desarrolló la pirosecuenciación, también conocida como 454. Otro ejemplo es el de Solexa, quien desarrolló una plataforma que fue adquirida posteriormente por Illumina (Barba *et al.*, 2013). En la Tabla 5 se presenta un resumen de las diferentes tecnologías.

Tabla 5. Plataforma de secuenciación de segunda y tercera generación (Modificada de Glenn, 2011).

Tipo	Plataforma	Compañía	Compañía fundadora	Método de		Bases por lectura**
				secuenciación	amplificación	
NGS (Segunda generación)	454	Roche	454	Síntesis (Pirosecuenciación)	PCR	400-700
	Illumina	Illumina	Solexa	Síntesis	PCR-puente	300
	Solid	Life Technologies	Applied Biosystems	Ligación	PCR	120
	Ion Torrent	Life Technologies	Ion Torrent	Síntesis (detección de iones de Hidrógeno)	PCR	100
TGS (Tercera generación)	HeliScope	Helicos		Síntesis	Ninguno	35
	PacBio	Pacific Biosciences		Síntesis	Ninguno	860-1100
	Starlight	Life Technologies		Síntesis	Ninguno	> 1000

** Longitud promedio de bases leídas por cada lectura (alta calidad)

La metodología de NGS de Illumina incluye 4 etapas básicas que se describen a continuación (Illumina, 2010, Macrogen, 2020):

a) Preparación de la muestra.

Extracción de ADN/ARN de la muestra. Realización del control de calidad (QC), si las muestras pasan el control de calidad se procede al siguiente paso.

b) Construcción de la librería.

La librería de secuenciación se prepara mediante la fragmentación aleatoria de la muestra de ADN o ADNc, seguida por ligación de la cadena 5' y 3'. Alternativamente, se lleva a cabo la tagmentación, mediante la combinación de la fragmentación de ADN y las reacciones de ligación en un solo paso que aumenta enormemente la eficiencia del proceso de preparación de la biblioteca.

A continuación, los fragmentos ligados al adaptador se amplifican por PCR y se purifican en gel.

c) Secuenciación.

Para la generación de clústeres, las librerías son cargadas en celdas de flujo aleatorias, donde los fragmentos son capturados en una superficie con oligonucleótidos unidos (*forward* y *reverse*), complementarios a los adaptadores de la librería. En seguida, cada fragmento se amplifica en clústeres distintos, a través de la amplificación del puente. Cuando se completa la generación de clústeres, las plantillas están listas para secuenciar.

La tecnología Illumina SBS utiliza un método patentado basado en un terminador reversible que detecta bases simples a medida que se incorporan en las cadenas de la plantilla de ADN. En cada ciclo de la secuenciación se agregan cuatro terminadores reversibles. Los dNTP ligados al terminador son constantes durante cada ciclo de secuenciación, la competencia natural minimiza el sesgo de la incorporación y reduce en gran medida las tasas de error en bruto en comparación con otras tecnologías. El resultado es una secuenciación

base por base de alta precisión que prácticamente elimina los errores de la secuencia específica del contexto, incluso dentro de regiones de secuencia repetitiva y homopolímeros (Illumina, 2010).

d) Datos crudos

Los datos secuenciados se convierten en datos crudos para el análisis.

2.9.4 Análisis de datos mediante bioinformática

La bioinformática se ha convertido en una herramienta fundamental para el análisis de datos obtenidos de la NGS del ADN extraído de las muestras para identificar la biodiversidad microbiana presente. Cada plataforma genera datos crudos distintos, sin embargo, se convierten a un formato de texto plano llamado “fastq” que contiene la información de cada secuencia para su análisis e identificación.

Cada archivo fastq, requiere de un procesamiento previo para obtener lecturas de calidad, para eso se realiza un recorte “*trimming*” de secuencias, que facilitará eliminar las lecturas de mala calidad y que podrían interferir con la interpretación de los resultados. Se continúa con un ensamble de lecturas pareadas “*merged*”; una agrupación “*clustering*” en unidades taxonómicas operacionales “*Operational Taxonomic Units: OTUs*” que son obtenidas por agrupación de secuencias con el 97% de identidad, o secuencias variantes de amplicones “*Amplicon Sequence Variants: ASVs*” que se obtienen por agrupación de secuencias exactas (100% de identidad) (Marizzoni *et al.*, 2020). Por último, se realiza la asignación taxonómica a cada OTU o ASV identificados, usando programas de alineamiento de secuencias como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) o clasificadores “*Classifier*”, algoritmo que emplea el método Bayesiano (Wang *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que el uso de ASVs es el método más apropiado para asignaciones a nivel de especies en datos obtenidos por secuenciación masiva del gen ribosomal 16S, dado que este método resuelve diferencias de hasta un nucleótido, lo que permite mejorar la asignación de especies (Callahan *et al.*, 2017). De manera general la clasificación taxonómica

consiste en asignar un taxón a cada secuencia. Esta clasificación se usa para buscar diferencias taxonómicas entre muestras. Existen bases de datos para la comparación de las lecturas obtenidas, de libre acceso, como GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), SILVA (High quality ribosomal RNA databases), Greengenes data base, UNITE y alguna privadas como MicroSeq de Applied Biosystems.

2.9.5 Medidas de diversidad

La diversidad biológica se refiere al rango de variación o variedad dentro de los seres vivos o entre organismos vivos en un determinado nicho en un ecosistema y sus interacciones (Swingland, 2013). La diversidad de microorganismos en un ecosistema depende de factores diversos como la disponibilidad de nutrientes, pH, humedad, temperatura, zona geográfica, entre otros. La diversidad (variación genética) inicia a nivel molecular y se relaciona directamente con los cambios en la estructura del ADN o indirectamente en las proteínas que codifican genes específicos. Cualquier cambio en una especie mediante alguna mutación del ADN, se reflejará en la población, aunque por selección natural es posible que no sean detectadas. La diversidad genética de una especie es producto de su historia evolutiva y no puede ser reemplazada (Moreno, 2001). La comprensión de la diversidad biológica se facilita con las medidas de diferentes componentes como es la riqueza, la equitatividad y la diversidad alfa, beta y gamma, entre otras.

- **Diversidad Alfa**

Es la riqueza de especies de una comunidad particular que se considera homogénea y que en función del tamaño se determina el número de especies por la relación área-especies, siendo proporcional el área a la cantidad de especies (Moreno, 2001; Whittaker, 1972).

- **Diversidad beta**

Es el grado de cambio o reemplazo en la composición de especies entre diferentes comunidades en un paisaje (Balsega & Gómez-Rodríguez, 2019; Whittaker, 1972).

- **Diversidad gamma**

Es la riqueza de especies del conjunto de comunidades que integran un paisaje, resultante tanto de las diversidades alfa como de las diversidades beta (Whittaker, 1972).

En general la diversidad alfa es la que se utiliza en la mayoría de los métodos propuestos para evaluar la diversidad de especies y para ello se emplean los métodos que se dividen en dos grandes grupos (Figura 4): los de riqueza específica (índices, rarefacción, funciones de acumulación, métodos no paramétricos) y los basados en dominancia o equidad, también llamados de estructura (modelos paramétricos, modelos no paramétricos e índices de abundancia proporcional).

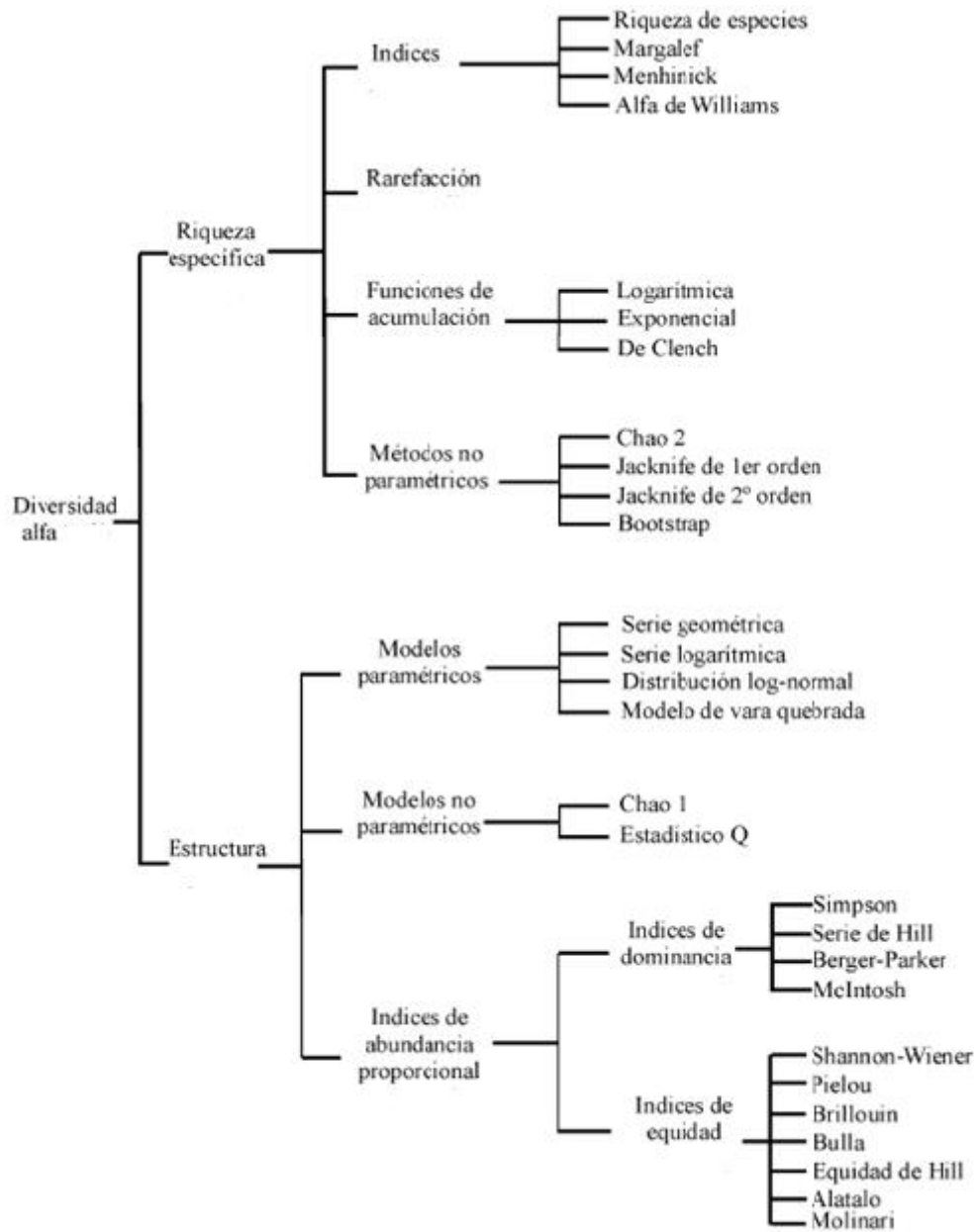


Figura 4. Clasificación de métodos para medir la diversidad alfa. (Fuente: Moreno, 2001).

- **Riqueza específica**

La riqueza específica es un término que se refiere al número de las distintas especies y es la forma más sencilla de medir la diversidad biológica ya que es el número de especies presentes en la muestra sin tomar en cuenta la abundancia. Tal y como se observa en la Figura 4, los índices más comunes para medir la riqueza específica son los siguientes:

- **Índice de riqueza específica (S)**

Es el número total de especies en la muestra, obtenido por conteo.

- **Índice de diversidad de Margalef (DMg) o índice de la diversidad específica de Margalef**

Permite estimar la diversidad de una muestra tomando como base la distribución numérica de los individuos de las diferentes especies en función del número total de individuos presentes en la muestra analizada.

$$D_{Mg} = (S-1) / \ln N$$

donde D_{Mg} = Índice de Margalef

donde S = Especie específica y N = Número total de individuos

Esta relación permite obtener el valor de $D_{Mg} = 0$ cuando hay solamente un individuo.

Índice de Menhinick (DMn)

Se basa en la relación entre el número de especies y el número total de individuos observados, que aumenta al aumentar el tamaño de la muestra.

$$D_{Mn} = S/N^{1/2}$$

Dónde S= Número total de especies presentes y N= Número total de individuos.

- **Rarefacción**

La rarefacción es otra forma de medir la riqueza específica. Es una técnica que permite comparar los números de especies entre comunidades (muestras) cuando el tamaño de las muestras es diferente. Calcula el número esperado de especies de cada muestra si todas las muestras fueran reducidas a un tamaño estándar. Es decir, mediante la rarefacción se calcula el número esperado de especies de cada muestra, se reduce el número de individuos de la muestra más grande, pero se conserva la proporción entre las especies. El límite máximo de extrapolación por rarefacción lo determina la muestra de tamaño más grande (Moreno, 2001).

$$E(S) = [\sum 1 - ((N - N_i) / n)] / (N/n)$$

Donde $E(S)$ = número esperado de especies; N = número total de individuos en la muestra; N_i = número de individuos de la i ésima especie; n = tamaño estandarizado de la muestra.

Los métodos basados en dominancia o equidad conocidos como de estructura para determinar la diversidad alfa (Figura 4), se describen a continuación:

- a) Los modelos paramétricos entre los que se encuentran las serie geométrica, serie logarítmica, distribución log-normal y modelo de vara quebrada;
- b) Los modelos no paramétricos que incluyen los índices de Chao 1 y Estadístico Q
- c) Los índices de abundancia proporcional que incluye los índices de dominancia (Simpson, serie de Hill, Berger-Parker y Macintosh) y los índices de equidad (Shannon-Wiener, Pielou, Brillouin, Bulla, Equidad de Hill, Alatalo, Molinari) (Kim *et al.*, 2017; Moreno, 2001).

Los índices de Shannon-Weaver y Simpson, que corresponden a los índices de dominancia y de equidad respectivamente, así como el de Chao 1 (modelo no paramétrico)

permiten correlacionar y tener una aproximación sobre la robustez de la diversidad microbiana en una muestra (Haegeman *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2017).

- **Índice de Chao 1**

Pertenece a los modelos no paramétricos de estimadores hablando estadísticamente. Este estimador está basado en el concepto que las especies raras infieren la mayor cantidad de información sobre el número de especies que faltan (Kim *et al.*, 2017). Este índice no considera una distribución normal de los datos y no lo ajustan a ningún modelo y se calcula con la siguiente expresión (Moreno, 2001):

$$\text{Chao 1} = (S + a^2)/2b$$

Donde S= Número de especies en la muestra; a = número de especies representadas únicamente por un único individuo; b = número de especies representadas por únicamente dos individuos.

- **Índice de Shannon-Wiener**

Es un índice de equidad que expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra. El índice refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa (Pla, 2006 en Moreno,2001). Se calcula utilizando la siguiente expresión matemática:

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

$$E = \frac{H'}{\ln S}$$

$$p_i = \frac{n_i}{N}$$

Donde:

H' = Índice de Shannon-Wiener

S = número de especies (riqueza de especies)

p_i = Proporción de individuos de la especie i respecto al total de individuos

i = Número de individuos de la especie i

N = Número de todos los individuos de todas las especies

E = índice de equitatividad

\ln = logaritmo natural

n_i = intensidad de la banda en el carril y

N = suma de intensidad de las bandas de un carril

- **Índice de Simpson**

Manifiesta la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra sean de la misma especie. Se expresa de la siguiente manera

$$\lambda = \sum p_i^2$$

Donde:

λ = Índice de Simpson y, p_i = Abundancia proporcional de la especie i (número de individuos de la especie i dividido entre el número total de individuos de la muestra).

El análisis de las comunidades microbianas utilizando los diferentes índices permitirá tener una mejor inferencia sobre la composición de la comunidad, que si solamente se contemplara la riqueza o uniformidad de las especies simples, tal es el caso de los índices de Shannon-Wiener y de Simpson, en el que ambos también contemplan la abundancia relativa entre especies (Kim *et al.*, 2017).

3. JUSTIFICACIÓN

La presencia de Ocratoxina A en el café constituye una amenaza para la salud (IARC, 2002; Schrenk *et al.*, 2020). Además, puede afectar de manera importante la actividad comercial, específicamente en la disminución de las exportaciones e impactar sustancialmente toda la cadena de producción, con especial atención en los ingresos de las familias rurales (FAO - ONU, 2004). La OTA es producida por hongos filamentosos y pueden contaminar el café en diferentes etapas del procesamiento a partir de la cosecha, incluso, permanecer después del tostado y durante la elaboración de café soluble debido a que es un compuesto termorresistente. El grado de contaminación depende de diversos factores como la temperatura, la humedad, el pH, la localización geográfica, el tipo de procesamiento postcosecha, el tipo de cultivo, la variedad y la diversidad microbiana (Khaneghah *et al.*, 2019).

No hay estudios referentes a la presencia de ocratoxina A en el café producido y comercializado en Chiapas, México. Tampoco se ha estudiado la diversidad microbiana en el café durante su procesamiento postcosecha de las variedades *Coffea arabica* y *Coffea canephora*, por lo que es necesario evaluar la presencia de OTA en café tostado y no tostado de ambas variedades y cultivado orgánica y convencionalmente en Chiapas, México. Y, es importante estudiar la diversidad microbiana del café de ambas variedades, procesados por los métodos húmedo y seco, en diferentes tiempos de secado y determinar su relación con la presencia de OTA.

4. HIPÓTESIS

El estudio de la diversidad microbiana considerando los métodos de cultivo, tipo de procesamiento postcosecha y la cuantificación de OTA en las distintas etapas del procesamiento del café que se produce y comercializa en Chiapas, México, permitirá analizar la relación entre la contaminación por hongos ocratoxigénicos y los factores mencionados.

5. OBJETIVO GENERAL

Identificar la diversidad microbiana de hongos y bacterias con características antifúngicas en *Coffea arabica* (café arábica) y *Coffea canephora* (café robusta) considerando el tipo de cultivo y en los diferentes métodos de procesamiento postcosecha y la prevalencia de ocratoxina A en café producido y comercializado en Chiapas.

5.1 Objetivos particulares

- Evaluar la prevalencia de ocratoxina A en los diferentes cafés tostados y no tostados que se producen y comercializan en Chiapas.
- Aislar e identificar la diversidad microbiana (hongos y bacterias) presente en *Coffea arabica* (café arábica) cultivada orgánica y convencionalmente, desde su cosecha, durante diferentes tiempos de secado de los procesamientos húmedo y seco, hasta la obtención de café pergamino, en la zona de la meseta tojolabal y del Soconusco en el estado de Chiapas, mediante NGS y su relación con la prevalencia de OTA.
- Aislar e identificar diversidad microbiana (hongos y bacterias) presente en *Coffea canephora* (café robusta) cultivada convencionalmente, desde la cosecha, durante diferentes tiempos de secado en el beneficio seco y hasta la obtención de café bola (cereza seca) en la zona del Soconusco en el estado de Chiapas, mediante NGS y su relación con la prevalencia de OTA.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Recolección de muestras

6.1.1 Café tostado y no tostado comercializado en Chiapas-México.

Durante el ciclo cafetalero 2017/18 se adquirieron cien muestras de café arábica y robusta tostado y no tostado (verde) de aproximadamente 1 kg en mercados y expendios de diferentes poblaciones en zonas cafetaleras del estado de Chiapas, México (coordenadas: 17°59'08"N a 14°31'55"N y 90°22'13"W a 94° 08'21"W) (Figura 5). Una vez adquiridas las muestras se almacenaron en bolsas de plástico selladas durante 2 semanas a temperatura ambiente (20-25 °C) y humedad relativa entre 50 y 60% hasta la cuantificación de OTA. Cabe señalar que todas las muestras de café arábica recolectadas fueron procesadas por el método húmedo (H) y cultivadas de manera orgánica o convencional. En tanto, las de robusta se obtuvieron de un cultivo convencional y se procesaron por el método seco (S).

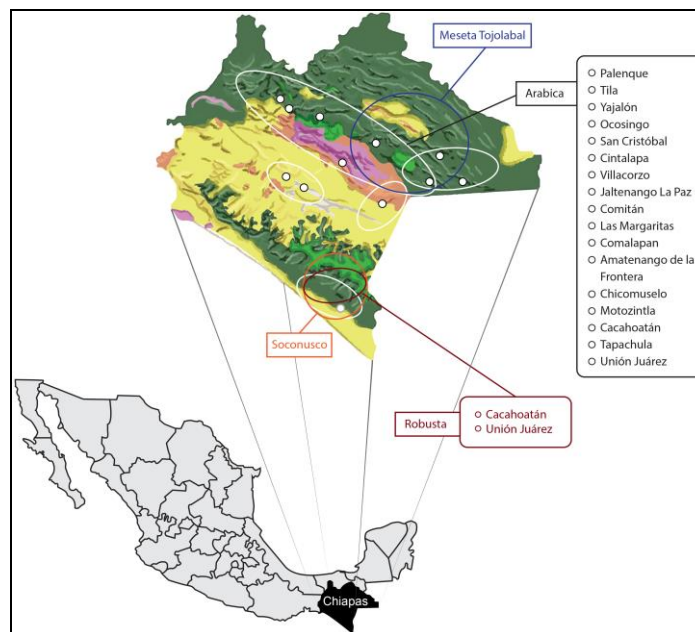


Figura 5. Zona de muestreo de café durante ciclo 2017/18 para cuantificación de OTA. (Fuente: Aguilar-Alvarez *et al.*, 2021).

6.1.2 Café soluble

Se recolectaron catorce muestras de café soluble de diferentes marcas comerciales de distribución nacional en los supermercados locales de Chiapas, ya que, en este estado, se tiene un número limitado de plantas procesadoras de café soluble. Cabe señalar que se desconoce el origen y las variedades de café utilizadas para la producción de este tipo de café.

6.1.3 Café para el análisis de diversidad microbiana y aislamiento de bacterias ácido-lácticas BAL y hongos filamentosos.

La recolección de muestras de 1 kg de café se realizó durante el ciclo cafetalero 2018/19, de café de las variedades *Coffea arabica* (arábica) cultivadas orgánica y convencionalmente, procesadas por el método húmedo y seco, en tanto que y *Coffea canephora* (robusta) se obtuvo de un cultivo convencional, procesado por el método seco. De cada variedad se recolectaron cerezas maduras frescas (tiempo 0) y granos de café o cereza seca, a diferentes días de secado, hasta aquellas que presentaron una humedad final del 10-12% (Figura 6).

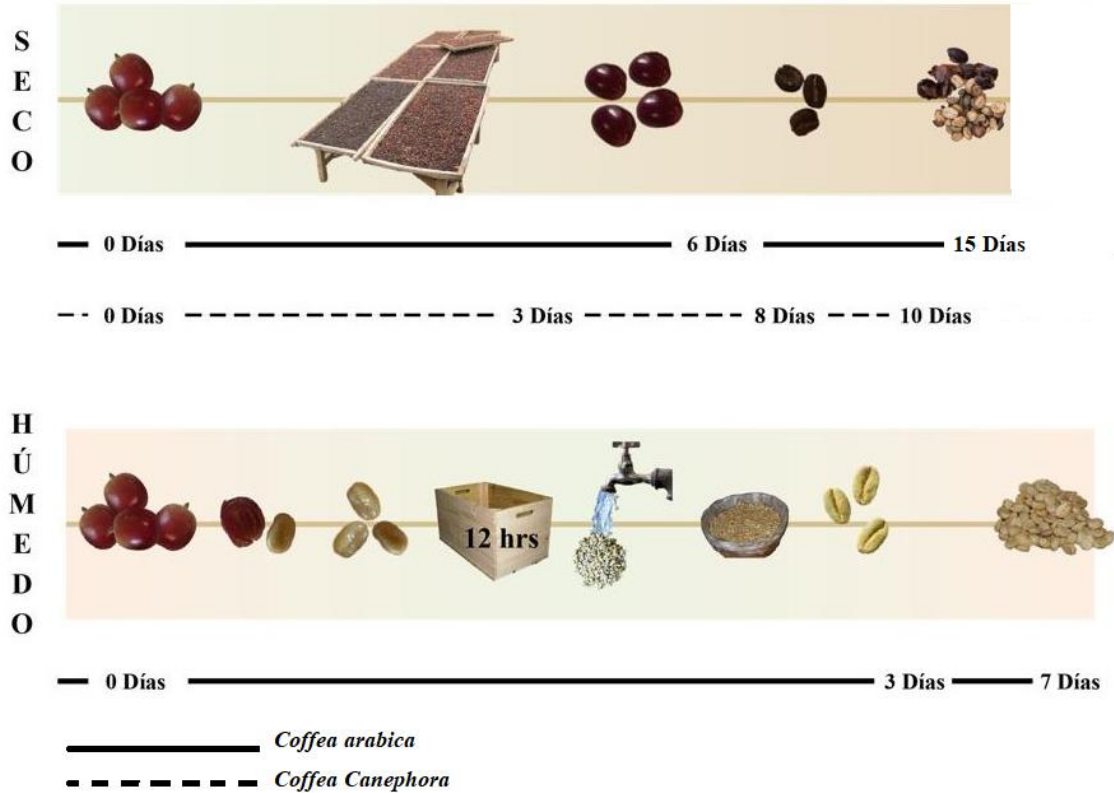


Figura 6. Muestras de café (2018/19). (A) Método seco variedades *Coffea arabica* (arábica) y *Coffea canephora* (robusta), cultivo convencional. (B). Método húmedo variedad *Coffea arabica* (arábica) y cultivos orgánico y convencional.

Se colectó el café en diferentes zonas según la variedad, cultivo y el método de procesamiento, tal y como se describe a continuación (Figura 7):

- Cruz del Rosario, Municipio de Las Margaritas, Chiapas ($16^{\circ}21'17.2''N$ $91^{\circ}42'40.3''W$) y 1360 metros sobre el nivel del mar (msnm) (INEGI, 2020). *Coffea arabica* (arábica) cultivado orgánicamente y procesado por el método húmedo con diferentes tiempos de secado.
- Nuevo Anexo Ojo de Agua, Municipio de la Independencia, Chiapas ($16^{\circ}11'29.5''N$ $91^{\circ}41'27.8''W$) a 1140 msnm (<http://www.nuestro-mexico.com/Chiapas/La-Independencia/Areas-de-menos-de-500-habitantes/Badenia/>). Se muestreó arábica cultivado convencionalmente, procesado por el método húmedo, con diferentes tiempos de secado.
- Santo Domingo Municipio de Unión Juárez, Chiapas ($15^{\circ}01'55.5''N$ $92^{\circ}06'13.1''W$)

a 850 msnm (<http://www.nuestro-mexico.com/Chiapas/Union-Juarez/Santo-Domingo/>). El café obtenido en esta localidad fue de *Coffea canephora* (robusta) y *Coffea arabica* (arábica) cultivados convencionalmente y procesados por el método seco, con diferentes tiempos de secado.

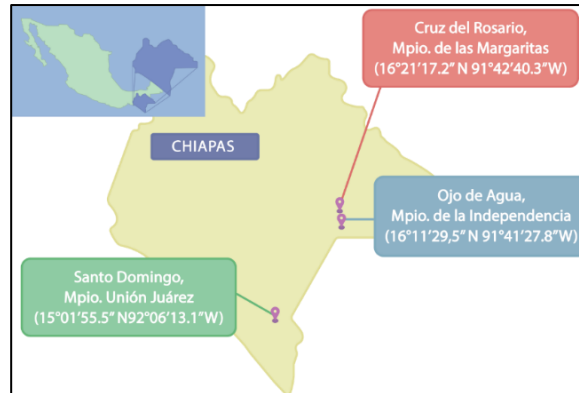


Figura 7. Zona de muestreo del café del ciclo 2018/19.

6.2 Extracción y cuantificación de OTA

La OTA se extrajo del café verde mediante una mezcla de metanol y bicarbonato de sodio. El extracto fue purificado en una columna de inmunoafinidad. La OTA así separada fue identificada por HPLC y cuantificada por espectro fluorescencia. Tomando en consideración que la OTA es nefrotóxica, tóxica para el hígado y tiene propiedades inmunodepresoras se aplicaron las medidas de seguridad necesarias para su manipulación.

La OTA de las muestras de café, se cuantificó de acuerdo con la metodología reportada por Aguilar-Alvarez *et al.*, (2021). A partir de 10 g de café se realizó la extracción de la OTA utilizando una solución alcalina compuesta de metanol (Sigma Aldrich® grado HPLC Ref. 34860-4L-R) y bicarbonato de sodio al 3% (50:50). La mezcla se agitó durante 30 min a 150 rpm a 30 °C y posteriormente se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm y 5°C. Una alícuota de 10 mL del sobrenadante se diluyó con 30 mL de solución buffer de fosfatos PBS (solución tampón salina de bisulfato) a pH 7.3.

Esta mezcla se añadió a una columna de inmunoafinidad (Puri-Fast® OTA HCS IAC, Fr) previamente acondicionada con 10 mL de solución buffer PBS y se ajustó el flujo de la columna en 2 mL / min. Cuando se terminó de agregar toda la mezcla de la muestra a la columna, se lavó dos veces con 10 mL de PBS para eliminar las impurezas, y posteriormente se eluyó la OTA de la columna de inmunoafinidad con 3 mL de metanol grado HPLC, recolectándose esta última fracción en tubos de ensaye limpios. La fracción recuperada se evaporó completamente bajo una corriente de nitrógeno a 70 °C y se reconstituyó el extracto seco con 1 mL de la mezcla de agua destilada / metanol / ácido acético glacial (30: 69: 1 v / v / v).

La OTA extraída se cuantificó en un equipo HPLC Shimadzu Prominence UFCL-XR (Shimadzu Corp., Japón) equipado con un detector de fluorescencia (Shimadzu RF-20A / XS) con una columna de fase reversa Hypersil ODS-2 (C-18, 250 × 4.6 mm, 5 µm, Thermo Fisher Scientific®) y una pre-columna con las mismas características. El análisis se llevó a cabo en un volumen de inyección de 50 µL, temperatura de la columna de 30° C, la longitud de onda de excitación (λ_{ab}) de 333 nm y la de emisión (λ_{em}) de 460 nm. La fase móvil utilizada fue una mezcla de metanol, agua y ácido acético glacial (69:30:1 v/v/v) en flujo isocrático de 1mL/min, con un tiempo de retención entre 6.6- 7.68 min. Se utilizó Ocratoxina A (Sigma-Aldrich 34037, pureza $\geq 98\%$) como control.

6.2.1 Preparación de la curva de calibración

La curva de calibración se preparó a partir de una solución madre estándar de OTA (200 ng / ml: Sigma-Aldrich®); las alícuotas se diluyeron usando una solución metanol: agua (3: 7; v: v) para alcanzar nueve niveles de concentración de OTA (0.25 a 80 ng / mL). Se realizaron inyecciones por triplicado de cada muestra. Los datos de calibración se ajustaron a un modelo de regresión lineal con un coeficiente de determinación R^2 de 0.999. Las concentraciones finales de OTA en las muestras de café se expresaron como µg / kg (Anexo 1). El límite de detección (LOD) fue 0.05 y el límite de cuantificación (LOQ) 0.15 µg / kg. Ambos parámetros se calcularon en función de la relación señal / ruido. Para determinar la eficiencia de recuperación de OTA en la muestras de café, se añadió una cantidad conocida de OTA a una muestra de café. El cálculo se realizó de acuerdo con la siguiente expresión:

Tasa de recuperación = ([OTA] experimental / [OTA] teórico) * 100. La Desviación Estándar Relativa (RSD) y la tasa de recuperación de OTA se determinaron por triplicado mostrando una RSD de 4.8% y una recuperación experimental de 85.3%

La estabilidad de la OTA se determinó con la misma solución estándar utilizada para la curva de calibración con diferentes niveles de concentración (0.25 a 80 ng / mL), y se analizó en muestras de café. Tanto la OTA estándar como la OTA contenida en muestras de café, se almacenaron a temperatura ambiente y temperatura de refrigeración (4 °C) durante dos meses. Pasado este tiempo, se determinó una diferencia del 2% con la concentración inicial. Por lo tanto, las soluciones de OTA se consideraron estables durante dos meses (Durand, 2012).

Se prepararon análisis por duplicado a partir de aquellas muestras que presentaron un alto nivel de OTA (> 5 µg / kg). Las diluciones pertinentes se realizaron durante el análisis.

Tratamiento de las muestras de café para la cuantificación de OTA

Los granos de café tostados o no tostados se molieron finamente con un molinillo de café (Moulinex® MC300132) de 180 W para obtener partículas de aproximadamente 0.5 mm

6.3 Aislamiento de BAL y hongos filamentosos (epífitos y endófitos)

6.3.1 BAL epífitas

En condiciones asépticas se pesaron 10 g de cada muestra de café recolectada. Cada muestra se depositó en un matraz Erlenmeyer previamente esterilizado con 90 mL de agua peptonada; la mezcla se agitó por 10 s. De esta dilución (1:10) se tomó 0.1 mL, para realizar diluciones consecutivas hasta 10^{-6} (por duplicado).

De cada una de las diluciones anteriores se sembraron 0.1 mL por extensión superficial en placa de agar de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (Difco™) suplementado con natamicina (Miconacina suspensión oftálmica Grin®) a una concentración de 50 mg / L (Todorov & Dicks, 2004, 2005). Las placas obtenidas se incubaron bajo condiciones

anaeróbicas a 30°C durante 24-72 h días. Este procedimiento se realizó para cada una de las muestras recolectadas.

6.3.2 BAL endófitas

Las muestras de cerezas recién cosechadas se enjuagaron primeramente con etanol al 70%, para eliminar la microbiota superficial seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril y un lavado con hipoclorito de sodio al 15% con una duración de 60 s. Al final se hicieron tres enjuagues con agua destilada estéril. En cada lavado se eliminó el líquido por decantación.

Para corroborar la ausencia de microorganismos superficiales se procedió a inocular 0.1 mL del líquido del último lavado en una placa con MRS, se incubó a 30°C durante 72 horas con observación cada 24 horas. La ausencia de crecimiento fue resultado de una eliminación de los microorganismos endófitos.

Una vez que la muestra fue tratada para eliminar los microorganismos superficiales, los 10 g se molieron en un mortero en condiciones estériles. Con la muestra molida, se realizaron diluciones hasta 10^{-6} , como se describe en el apartado 6.3.1. Se utilizaron placas de agar MRS con natamicina (Miconacina suspensión oftálmica Grin®) y se incubaron a 30 °C durante 72 horas hasta el crecimiento de las BAL endófitas.

6.3.3 Hongos filamentosos epífitos

Las cerezas se colocaron de manera directa en placas con Agar Papa Dextrosa (PDA) (Bioxon®) con estreptomycin (PISA®), a una concentración de 500 ppm y se incubaron a 30 °C durante 7 días.

6.3.4 Hongos filamentosos endófitos

Las cerezas lavadas como se describió en la sección 6.3.2, se seccionaron utilizando una navaja estéril y cada sección fue colocada sobre la superficie de placas de Agar PDA con estreptomycin (PISA®), a una concentración de 500 ppm. En cada placa se depositaron tres cerezas en puntos equidistantes y se incubaron a 30 °C durante 7 días.

6.4 Purificación y caracterización de los microorganismos aislados

6.4.1 Colonias de bacterias ácido lácticas (BAL)

Las colonias de BAL desarrolladas en placas de agar MRS con natamicina (Miconacina suspensión oftálmica Grin®), se seleccionaron de acuerdo con su morfología colonial y se aislaron mediante resiembra en el mismo medio de cultivo. Posteriormente, se realizó una nueva selección mediante tinción de Gram y la prueba de la catalasa. Solamente las cepas Gram-positivas y catalasa- negativas fueron seleccionadas y almacenadas a -18 °C utilizando glicerol como crioprotector en una concentración de 50% en caldo MRS.

6.4.2 Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos aislados en las placas de agar PDA se resembraron hasta obtenerlos puros, para proceder a su caracterización macro y microscópica. Se conservaron en congelación a -18 °C utilizando como sustancia crioprotectora glicerol al 50% en caldo dextrosa papa a doble concentración.

6.5 Cuantificación del potencial ocratoxigénico de los hongos filamentosos aislados de las muestras de café

Los hongos aislados, se resembraron por duplicado en cajas con medio PDA y se incubaron por 7 días a 30 °C. Posteriormente se tomaron de la caja Petri, cuatro discos de aproximadamente 10 mm, alrededor de la colonia desarrollada y se pesaron. Se les adicionó 2.5 mL solvente (metanol/acido fórmico 25:1 v/v), se sonicaron durante 20 min y se procedió de acuerdo con la técnica de Bragulat *et al.* (2001). La ocratoxina A se cuantificó

en un HPLC con detector de fluorescencia bajo las mismas condiciones de operación descritas en la sección 6.2.

6.6 Identificación molecular de bacterias aisladas del café mediante análisis de secuencias de ARNr 16S

Se realizó la extracción de ADN con el kit de DNeasy UltraClean Microbial (Qiagen), acorde con el protocolo descrito por el proveedor (Figura 8), se cuantificó el ADN (ng / μ L) con un NanoDrop™ de Thermo Scientific.

6.6.1 Integridad ADN

La integridad del ADN obtenido se corroboró realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1%, 85 V, empleando una solución buffer Tris-Ácido Acético-EDTA (TAE 1X). Se cargaron 5 μ L de la muestra con 2 μ L del buffer de carga con azul de bromofenol y se utilizó el marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (SIGMA-ALDRICH®). El gel fue visualizado bajo luz ultravioleta en el equipo DNI Bio-Imagine-Systems, MiniLumi™, usando como revelador rojo Texas (GelRed™ Biotium).

6.6.2 Amplificación por PCR

La amplificación se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen ARNr 16S con los primers 8f (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492r (5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Sigma-Aldrich®). Se utilizó la enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase de Promega, la mezcla y concentración de la reacción utilizada se muestra en la Tabla 6. La reacción se realizó utilizando un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad), bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 7.

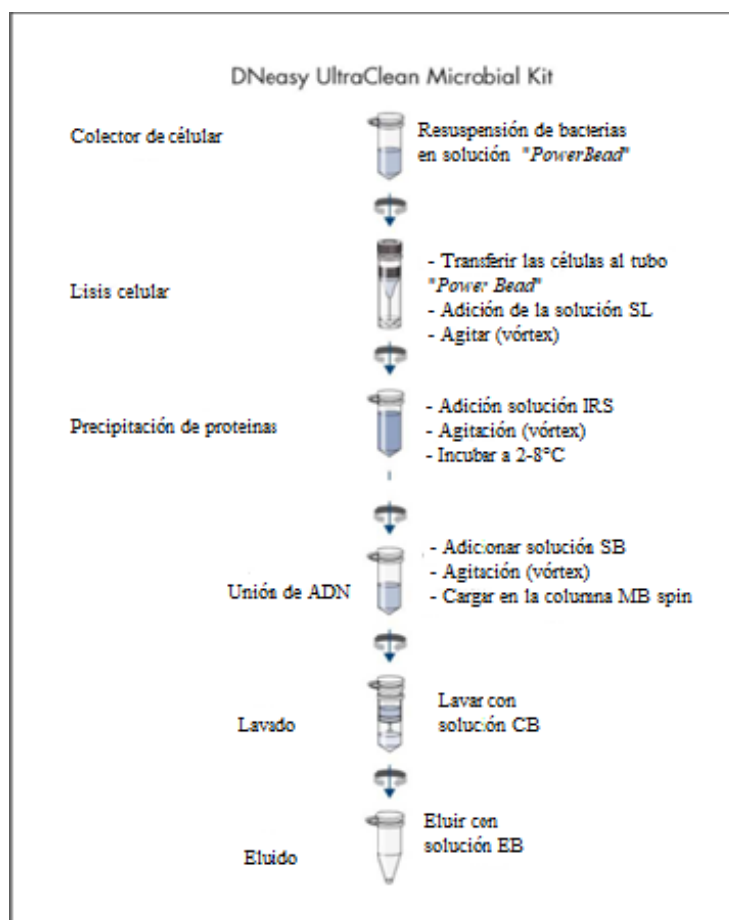


Figura 8. Procedimiento de extracción de ADN kit DNeasy UltraClean Microbial.

Tabla 6. Mezcla de reacción amplificación PCR del ARNr 16S

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

Tabla 7. Condiciones utilizadas para la reacción de amplificación del ARNr 16S

Paso	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	3	1
Desnaturalización	95	0.5	35 x
Alineamiento	55	0.5	
Extensión	72	0.5	
Extensión final	72	10	1

Mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (bajo las mismas condiciones arriba mencionadas), se corroboró la amplificación. Los amplicones se enviaron secuenciar a la Universidad Nacional Autónoma de México en el Laboratorio Nacional de Biodiversidad y de Secuenciación genómica de la Biodiversidad y de la Salud, del Instituto de Biología. Los archivos obtenidos de este análisis fueron preprocesados usando el módulo abifpy v0.9 compatible con Python v3.7. El preprocesamiento de los archivos se desarrolló en un entorno interactivo en donde se utilizó Jupyter Notebook junto con módulos adicionales como Biopython. La identificación de bacterias se realizó con el algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) para nucleótidos a un E-value de $1E^{-6}$, para lo cual se utilizaron cuatro bases de datos de secuencias 16S con algunas modificaciones personalizadas para eliminar bacterias "*uncultured*": 1) 16S de NCBI (National Center for Biotechnological Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 2) SILVA (High quality of ribosomal RNA database, <https://www.arb-silva.de/>), 3) RDP (The Ribosomal Database Project, <http://rdp.cme.msu.edu/>) y 4) Greengenes (<http://greengenes.secondgenome.com/>). Las diferentes bases de datos se utilizaron con la finalidad de tener una mayor confiabilidad en la identificación de los géneros y de especies de las bacterias presentes en las muestras de café.

6.7 Análisis de las comunidades microbianas por secuenciación masiva (NGS)

6.7.1 Extracción de ADN total para identificación 16S e ITS

A cada muestra de café (Tabla 8) se le extrajo el ADN total como se describe a continuación: se pesaron asépticamente 40 gramos de las cerezas y se colocaron en matraces con 10 mL de agua peptonada estéril en agitación durante dos horas a 150 rpm a 30 °C; transcurrido ese tiempo, se dejaron 24 horas en reposo a la misma temperatura y se procedió a decantar el sobrenadante, el cual fue centrifugado a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. A partir del pellet obtenido, se llevó a cabo la extracción de ADN por separado con los siguientes kits: DNeasy® UltraClean® Microbial y DNeasy® PowerSoil® ambos kits de la marca Qiagen. La metodología de extracción se realizó de acuerdo con las indicaciones del proveedor (Figuras 8 y 9). Se verificó la integridad del ADN genómico obtenido por electroforesis en gel de agarosa tal y como se describió en el apartado 6.6.1. Posteriormente,

se cuantificó la concentración y pureza del ADN obtenido con un equipo NanoDrop™ de Thermo Scientific.

Para confirmar la presencia de regiones 16S e ITS a cada muestra de ADN total obtenido se le realizó la amplificación por PCR de las regiones 16S utilizando los primers 8f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Sigma-Aldrich®) tal como se describió en la sección 6.6.2 mientras que para la región ITS, se utilizaron los primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGTCTATTGATATGC-3'). Para llevar a cabo la amplificación se utilizó la GoTaq® Green Master Mix de Promega. La mezcla de reacción utilizada y las condiciones de amplificación se muestran en las Tablas 9 y 10. La reacción se llevó a cabo en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad).

Tabla 8. Extracción de DNA total. Características de las muestras de café y kit utilizado para extracción.

Clave	Tipo muestra	Característica de muestra de café				Kit extracción DNA		Amplicón	
		Variedad	16S	Tipo cultivo	Tiempo (días)	Soil ¹	Microbial ²	16_S	ITS
Coffee_01	1-R0	robusta	secado sol	Convencional	0	●		●	●
Coffee_02	2-R3	robusta	secado sol	Convencional	3	●		●	●
Coffee_03	3-R8	robusta	secado sol	Convencional	8	●		●	●
Coffee_04	4-R10	robusta	secado sol	Convencional	10	●		●	●
Coffee_05	5-A0	arábica	secado sol	Convencional	0	●		●	●
Coffee_06	6-A6	arábica	secado sol	Convencional	6	●		●	●
Coffee_07	7-A15	arábica	secado sol	Convencional	15	●		●	●
Coffee_08	8-A0G	arábica	b. húmedo	Orgánica	0	●		●	●
Coffee_09	9-A3G	arábica	b. húmedo	Orgánica	3	●		●	●
Coffee_10	10-A7G	arábica	b. húmedo	Orgánica	7	●		●	●
Coffee_11	11-C0	arábica	b. húmedo	Convencional	0	●		●	●
Coffee_12	12-C3	arábica	b. húmedo	Convencional	3	●		●	●
Coffee_13	13-C7	arábica	b. húmedo	Convencional	7	●		●	●
Coffee_14	14-0G	arábica	b. húmedo	Orgánica	0		●	●	●
Coffee_15	15-3G	arábica	b. húmedo	Orgánica	3		●	●	●
Coffee_16	16-7G	arábica	b. húmedo	Orgánica	7		●	●	●
Coffee_17	17-R0	robusta	secado sol	Convencional	0		●	●	●
Coffee_18	18-R3	robusta	secado sol	Convencional	3		●	●	●
Coffee_19	19-R8	robusta	secado sol	Convencional	8		●	●	●
Coffee_20	20-R10	robusta	secado sol	Convencional	10		●	●	●
Coffee_21	21-A0	arábica	secado sol	Convencional	0		●	●	●
Coffee_22	22-A6	arábica	secado sol	Convencional	6		●	●	●
Coffee_23	23-A15	arábica	secado sol	Convencional	15		●	●	●
Coffee_24	24-0C	arábica	b. húmedo	Convencional	0		●	●	●
Coffee_25	25-3C	arábica	b. húmedo	Convencional	3		●	●	●
Coffee_26	26-7C	arábica	b. húmedo	Convencional	7		●	●	●

Soil¹= kit DNeasy® PowerSoil®(Qiagen); Microbial²= DNeasy® UltraClean® Microbial (Qiagen)

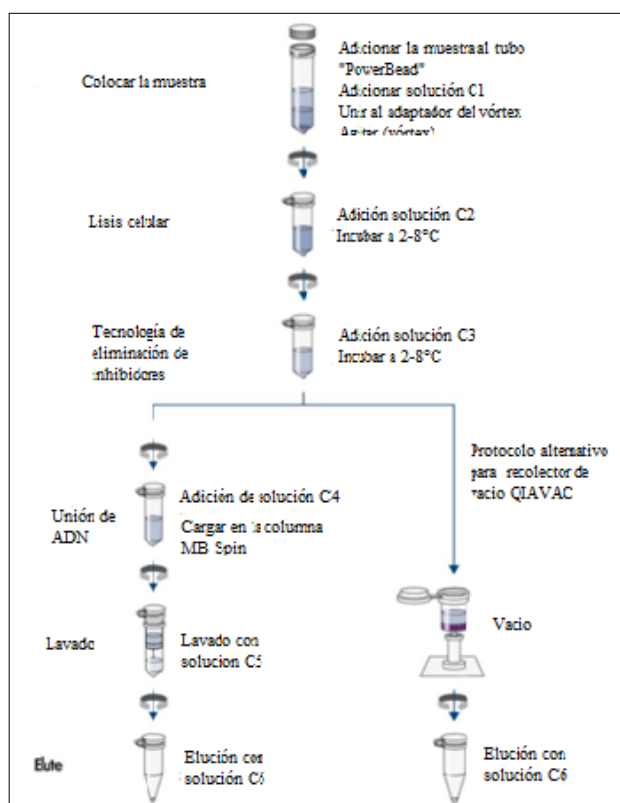


Figura 9. Protocolo de extracción de ADN utilizando el kit DNeasy Power Soil

Tabla 9. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación por PCR de la región ITS

Reactivo	Volumen (μL) (Reacción: 50 μL)	Concentración final
Gotaq® Green Master Mix, 2X	25	1 X
Primer ITS1 (10 μM)	1	0.2 μM
Primer 1492 r (10 μM)	1	0.2 μM
Templado	1-10	-
Agua	Aforo a 50 μL	-

Tabla 10. Condiciones utilizadas para la reacción de amplificación de la región ITS

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

6.8 Preparación de librerías Illumina NGS

Las 52 muestras de ADN genómico extraído de las muestras de café (26 con el kit DNeasy UltraClean Microbial y 26 con el kit DNeasy® PowerSoil®) fueron enviadas a MACROGEN® Corea para su secuenciación masiva en una plataforma Illumina high-throughput. Cada muestra pasó el control de calidad requerido y se construyeron librerías para 16S y para ITS tal y como se describe a continuación:

El ADN extraído y analizado de las diferentes muestras de café tal y como se explica en la sección 6.8.1 fue analizado y la preparación de bibliotecas de ADN para cada muestra se realizó según las pautas de Illumina (Figura 10). Las regiones hipervariables V3-V4 del gen de ARNr 16S bacteriano se amplificaron con el par de cebadores Bakt_341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') y Bakt_805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'). Las regiones ITS2 del espaciador transcrito interno de hongos (ITS) se amplificaron con el par de cebadores, ITS3F (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') e ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). La biblioteca de regiones 16S V3-V4 e ITS2 generada se secuenciaron comercialmente en pares de extremos (Macrogen, Seúl, Corea del Sur) utilizando una plataforma Illumina MiSeq (2 × 300 pb).



Figura 10. Esquema del procedimiento de NGS. (Fuente: Macrogen©)

6.8.1 Preparación de la muestra

El ADN extraído de cada muestra es verificado para cumplir con el control de calidad para proceder a la construcción de las librerías.

6.8.2 Construcción de la librería

La biblioteca de secuenciación o librería se prepara mediante la fragmentación aleatoria de la muestra de ADN o ADNc, seguida de la ligación del adaptador 5' y 3'. Alternativamente, la "tagmentación" combina las reacciones de fragmentación y ligación en un solo paso que aumenta en gran medida la eficiencia del proceso de preparación de la biblioteca. A continuación, los fragmentos ligados al adaptador se amplifican por PCR y se purifican en gel.

6.8.3 Secuenciación

Para la generación de clústeres, la librería es cargada en una celda donde los fragmentos son capturados en una superficie de unión de oligos complementarios a la librería de adaptadores.

Cada fragmento se amplifica en grupos clonales distintos a través del puente de amplificación. Cuando se completa la generación del clúster, las plantillas están listas para la secuenciación.

La tecnología Illumina SBS utiliza un método patentado, basado en terminadores reversibles que detecta bases individuales a medida que se incorporan en las hebras de la

plantilla de ADN. Los dNTP ligados al terminador son constantes durante cada ciclo de secuenciación, la competencia natural minimiza el sesgo de incorporación y reduce en gran medida las tasas de error en bruto en comparación con otras tecnologías. El resultado es una secuenciación base por base de alta precisión que prácticamente elimina los errores específicos del contexto de secuencia, incluso dentro de regiones de secuencia repetitiva y homopolímeros.

6.8.4 Datos crudos

Los datos secuenciados son convertidos en datos crudos para el análisis bioinformático.

6.9 Análisis Bioinformático

6.9.1 Preparación de la base de datos (data-base)

Las secuencias del 16S rADN fueron obtenidas de las bases de datos del Centro Nacional de información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés, última modificación 2020), del Proyecto de base de datos Ribosomal (RDP por sus siglas en inglés, versión 11.5) y SILVA (versión 138). Las secuencias ITS fueron obtenidas de la base de datos UNITE (versión 6). Subsecuentemente, cada árbol jerárquico fue generado con programación a la medida en Python, que se usa para generar conjuntos de entrenamiento utilizando la funcionalidad del generador de conjuntos de entrenamiento del clasificador RDP (versión 2.13). Los conjuntos de entrenamiento se probaron mediante una validación cruzada de submuestreo aleatorio de la clasificación de la taxonomía con una longitud de 400 pb (calcula los valores de especificidad y sensibilidad para cada rango en cada corte de arranque). El desempeño de la validación se puede revisar en el anexo 6.

6.9.2 Procesamiento, agrupación y clasificación de lecturas secuenciadas

Los datos de secuenciación recopilados en formato FASTQ se procesaron y analizaron con *scripts* desarrollados en Python (archivos ejecutables disponibles en <https://github.com/eduardo1011/METAGENOME>). Los cebadores se eliminaron con

Cutadapt (versión 2.10). Las lecturas de MiSeq V3 – V4 e ITS2 se ensamblaron con el software FLASH (versión v1.2.11). Las secuencias se desreplicaron y las quimeras detectadas se eliminaron mediante el complemento VSEARCH (versión 2.14.2). La generación de OTU y ASV se realizó mediante la programación (pipeline) basada en USEARCH (versión 11.0.667). La agrupación de novo se llevó a cabo con VSEARCH al 97% y 99% de identidad para generar unidades taxonómicas operativas (OTU) y variantes de secuencia de amplicones (ASV), respectivamente. Durante este paso, se generaron tablas OTU y ASV, que se utilizaron para el análisis posterior. La clasificación taxonómica se unificó a partir de las tres bases de datos 16S considerando las puntuaciones obtenidas con el clasificador Classifier. La asignación de taxonomía de OTU y ASV se realizó mediante el clasificador RDP y todas las bases de datos de forma independiente. Los resultados del clasificador RDP se procesaron en un entorno interactivo utilizando widgets de Python (versión 3.6.7) (versión 7.5.1) (archivos ejecutables disponibles en <https://github.com/eduardo1011/METAGENOME>). La asignación taxonómica se realizó con una puntuación umbral de 0.8 a nivel de género, para garantizar una clasificación taxonómica segura.

6.9.3 Análisis de diversidad

Las métricas de diversidad alfa (intragrupo) (Taxa_S, Individuos, Dominance_D, Simpson_1-D, Shannon_H, Evenness_e^H/S, Brillouin, Menhinick, Margalef, Equibility_J, Berger-Parker y Chao-1) se adaptaron del programa PAST (versión 4.03). La métrica de diversidad filogenética de Faith se obtuvo alineando secuencias OTU / ASV usando Clustal-o (versión 1.2.2). La diversidad beta (entre grupos) se realizó con métricas de distancia cuantitativas (distancias UniFrac y Bray Curtis no ponderadas). El análisis de componentes principales (PCA) se realizó utilizando scikit-learn, una biblioteca de aprendizaje automático de software gratuito para el lenguaje de programación Python. Todos los análisis de diversidad alfa y beta se calcularon utilizando *scripts* de Python (archivos ejecutables disponibles en <https://github.com/eduardo1011/METAGENOME>). La agrupación de datos y el análisis estadístico y las visualizaciones se realizaron utilizando los módulos Scipy (versión 1.4.1) y matplotlib (versión 3.0.3), respectivamente. Los gráficos se construyeron

en Python utilizando los siguientes módulos: mapa de color v1.0.2, matplotlib v3.0.3, seaborn v0.10.1, json v2.0.9 y plotly v4.5.0.

6.9.4 Número de acceso a la secuencia de nucleótidos

Las lecturas del análisis 16S y los datos de las secuencias ITS2 se enviaron al Sequence Read Archive (SRA) y fueron registradas con el número de bioproyecto PRJNA728639.

Y están disponibles en (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA728639>). Y en ENA/EBI (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJNA728639>).

6.9.5 Análisis estadístico del contenido de OTA en café tostado y no tostado, y café soluble, comercializado en Chiapas-México

Para facilitar el análisis estadístico, cada muestra de café se clasificó según la variedad (arábica (A) o robusta (R)), tipo de café (tostado (T) o sin tostar (NT)), tipo de cultivo (orgánico (O) o convencional (C)) y procesamiento (húmedo (H) o seco (S)). Además, las muestras se agruparon de la siguiente manera: ATC (arábica tostado convencional), ANTC (arábica convencional sin tostar), ATO (arábica tostado orgánico), ANTO (arábica orgánico sin tostar), TR (tostado robusta), RNT (robusta sin tostar), CHIAPAS (todas las muestras de café), INSTANT (café instantáneo o soluble).

Los datos se analizaron con herramientas de estadística descriptiva. Se utilizaron tablas de contingencia de dos x dos para estimar la proporción de muestras en las que la OTA estaba presente o ausente. También se utilizaron las pruebas, exacta de Fisher y chi-cuadrado (χ^2), para confirmar que la distribución de estas proporciones difería entre las categorías de cada variable (variedad, tipo, proceso y cultivo). También se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para contrastar las medianas de las concentraciones en cada categoría o grupo. Se utilizaron los paquetes estadísticos NCSS® y SPSS®. Los valores con $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

6.9.6 Análisis estadístico aplicado en los datos de biodiversidad microbiana del café obtenido mediante NGS.

La comparación de la diversidad microbiana en las distintas muestras de café se realizó mediante un análisis de varianza multivariada (PERMANOVA), tomando en consideración la prueba de Bray- Curtis, con un nivel de significancia $P \leq 0.05$

También se realizó una prueba de suma de rangos de Wilcoxon (Mann-Whitney-Wilcoxon) para la comparación de las métricas de alfa diversidad con el mismo nivel de significancia ($P \leq 0.05$).

La significación estadística entre los diferentes grupos se evaluó mediante la prueba ANOVA basada en permutación (PerMANOVA) con 999 permutaciones. Para la agrupación de datos, el análisis estadístico y las visualizaciones se utilizaron diferentes módulos de Python tal y como se describe con más detalle en la sección 6.9.3.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 OTA en café comercializado en Chiapas

El contenido de OTA de las muestras de café analizado se presenta en la Figura 11. De las 100 muestras analizadas, 52 no presentaron OTA, 45 tuvieron una concentración entre 0.01 y 3.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y solo en 3 muestras la concentración de OTA estuvo por arriba de la legislación europea ($\geq 5 \mu\text{g}/\text{kg}$ de OTA) con valores de 12.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 148.62 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ambas del grupo arábica-tostada-convencional (ATC) y una con 10.28 $\mu\text{g}/\text{kg}$ que pertenece al grupo de arábica- no tostada y orgánica (ANTO). El promedio de OTA en el 97% de las muestras analizadas fue de $0.42 \pm 0.62 \mu\text{g}/\text{kg}$. Esta amplia distribución de muestras sin OTA y con OTA por debajo de los límites máximos de la regulación europea (OTA DLNE), resalta la calidad del café en el comercio local, a pesar de la falta de regulación de la OTA en el café mexicano.

Las muestras que presentaron un contenido mayor a 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de OTA (límite máximo de la regulación europea), corresponden al café arábica-tostado-convencional (ATC) y fueron adquiridas en los mercados de Ocosingo y Amatenango de la Frontera, en Chiapas, zonas donde se practica el cultivo convencional principalmente de la variedad arábica. Por otra parte, la tercera muestra de arábica-no tostada-orgánica (ANTO), proviene del municipio de Las Margaritas, zona que produce café arábica convencional y orgánico. Todos los lugares mencionados están ubicados en zonas con lluvias abundantes.

Con respecto al café soluble, en el 21.4% ($n=3$) de las muestras no se detectó OTA y en el 78.6% ($n=11$) presentaron OTA dentro de los límites máximos por la normatividad europea para este tipo de café ($\leq 10 \mu\text{g}/\text{kg}$) (Fig.11).

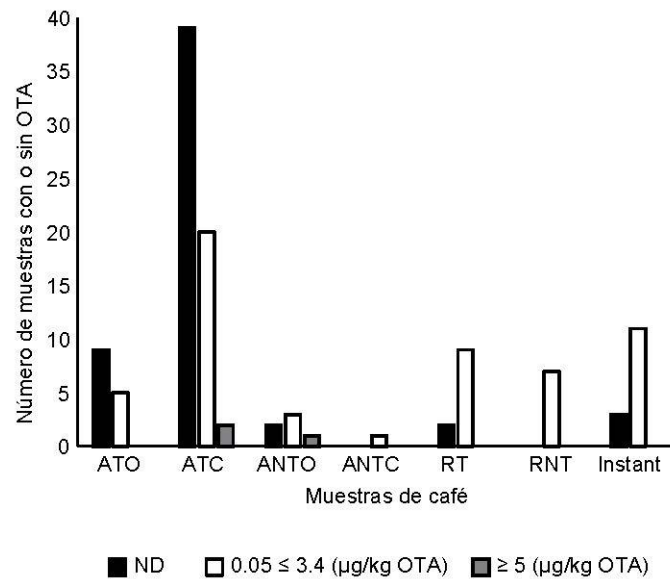


Figura 11. Número de muestras de café con y sin OTA agrupadas por sus características. ATO: arábica tostada orgánica; ATC: arábica tostada convencional; ANTO: arábica no tostada orgánica; ANTC: arábica no tostada convencional; RT: robusta tostada; RNT: robusta no tostada; Instant: Instantáneo/soluble. (Fuente: Aguilar-Alvarez, *et al.*, 2021)

El análisis estadístico de la ausencia o presencia de OTA en el café según las variables: variedad (arábica o robusta), tipo (tostado o no tostado), procesamiento (húmedo o seco) y cultivo (orgánico o convencional), se obtuvo considerando los 97 datos con una concentración de OTA que cumple con los niveles establecidos por la Unión Europea. De estas muestras analizadas, 52 (53.6% del total) no presentaron OTA y en el resto de las muestras, las concentraciones de OTA cumplen con los límites de la norma europea (OTA DLNE). Es decir, el café analizado es de excelente calidad cuando la OTA está ausente y de calidad aceptable cuando contienen concentraciones de OTA por debajo de la regulación europea (OTA DLNE). En la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos con la prueba χ^2 ($p < 0.05$) y agrupados por variedad, tipo de café, características de cultivo y procesamiento de las muestras.

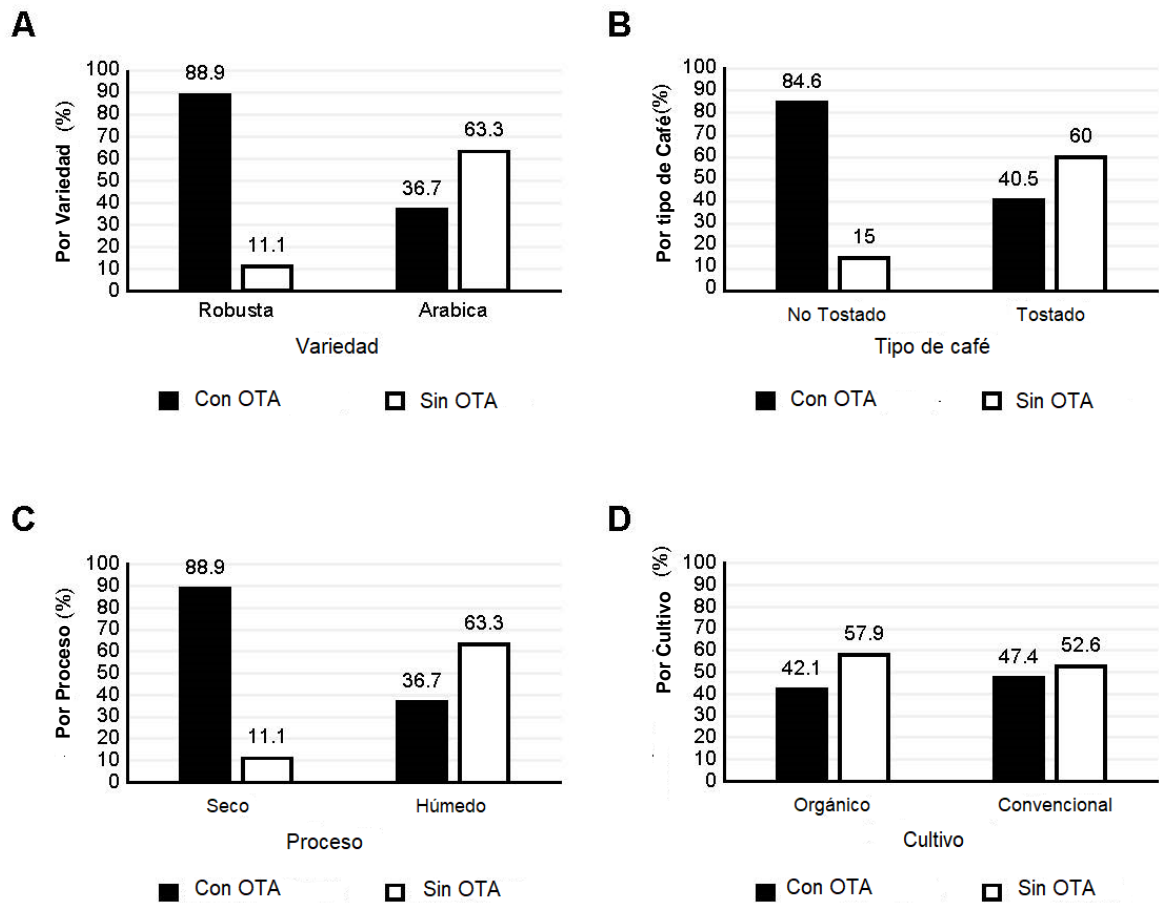


Figura 12. Porcentaje de muestras de café con y sin OTA. Las muestra con OTA de la figura presentan concentraciones por debajo de la regulación europea ($<5 \mu\text{g}/\text{kg}$). (A) Variedad ($P < 0.05$). (B) Tipo de café ($p < 0.05$). (C) Proceso ($p < 0.05$). (D) Tipo de cultivo ($p < 0.05$). (Fuente: Aguilar-Alvarez, *et al.*, 2021)

Al comparar entre las muestras de café sin OTA y con OTA DLNE, clasificadas por variedad, por tipo de presentación (tostado o no tostado), por procesamiento y por cultivo, se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$) excepto cuando se analizó considerando el tipo de cultivo. Se obtuvo que el 11.1% de las muestras de café de la variedad robusta no mostraron presencia de OTA en tanto, en las muestras de variedad arábica de café esta proporción fue mayor (63.3%). Es decir, en café robusta es más probable que haya presencia de OTA DLNE (88.9%) que en café arábica (36.7%) (Figura 12A).

Respecto a las muestras de café clasificadas por el tipo de presentación (tostado y no tostado), el porcentaje de muestras sin OTA en el café no tostado fue del 15.4%, en el café tostado la proporción es casi cuatro veces mayor (59.5%), no obstante, aun cuando hay una probabilidad más alta de encontrar OTA en el café sin tostar, la OTA se encuentra por debajo del límite establecido por la normatividad europea (Figura 12B). Es decir, que en este estudio la variedad robusta y el café no tostado presentaron el más alto porcentaje de muestras contaminadas con OTA, 89.9% y 84.6% respectivamente.

Se realizó el análisis de medianas con la finalidad de comparar la concentración de OTA entre los distintos grupos de muestras de café (Tabla 11). Se encontró que, entre las variedades de café, la robusta tiene una mediana de 0.74 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de OTA con un intervalo de variación entre 0.05 y 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, valores que son significativamente mayores a los encontrados para la variedad arábica. Este mismo comportamiento se obtuvo al comparar el procesamiento (húmedo o seco), dado que, todas las muestras de robusta fueron procesadas por la vía seca y las de arábica por la vía húmeda. En cuanto al tipo de café, la concentración mediana de OTA del café tostado fue menor que la del café no tostado, que presentó un valor de 0.98 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de OTA con un intervalo entre 0.05 y 1.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de OTA. No se encontraron diferencias significativas entre las medianas de la concentración de OTA del cultivo convencional y el orgánico de café arábica ($p=0.514$). Es importante señalar que las medianas de concentración de OTA para las muestras de la variedad robusta y el café no tostado fueron las más altas (Tabla 11), lo que sugiere que, existe mayor probabilidad de encontrar OTA en este tipo de café.

Ha sido reportado que el café robusta tiene mayor incidencia de OTA (Benites *et al.*, 2017) y que existe mayor concentración de OTA en café no tostado que aquel que es tostado y molido, ya que, durante el proceso de tostado, es posible reducir la cantidad de la micotoxina (Castellanos-Onorio *et al.*, 2011; Suárez-Quiroz *et al.*, 2005). En café robusta, tostado y molido comercializado en Portugal se encontraron niveles de OTA entre 0.79-1.56 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mayores a los encontrados en el café de Chiapas para esta variedad (de trazas hasta 1.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$). En café originario de la India, las muestras de café robusta cereza seca (no tostada), presentaron niveles máximos de contaminación de OTA de 11.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$

(Gopinandhan *et al.*, 2007). En café orgánico verde (no tostado) de Chiapas, las concentraciones de OTA presentes en las muestras estuvieron en un intervalo de 0.1 y 0.59 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras que en el café tostado del mismo tipo (Chiapas) no fue detectada la presencia de OTA. En café robusta, tostado y molido de Filipinas, reportaron concentraciones de OTA de $4.82 \pm 0.87 \mu\text{g}/\text{kg}$, en café verde (no tostado) de las variedades arábica y robusta, el promedio de OTA fue de $46.65 \pm 16.33 \mu\text{g}/\text{kg}$ y de $257 \pm 97.66 \mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente (Barcelo & Barcelo, 2018), valores que rebasan el límite establecido por la normatividad europea (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Como puede notarse, en este estudio, la prevalencia de OTA en el café de Chiapas es baja y los valores encontrados son similares a lo reportado por Benites *et al.*, (2017), quienes encontraron que las muestras de café de origen americano presentaron una frecuencia significativamente una menor contaminación de OTA, con concentraciones más bajas que el café de origen africano y asiático, como consecuencia de las condiciones climáticas y de procesamiento (Benites *et al.*, 2017; Bucheli *et al.*, 1998).

Al analizar las muestras de café por tipo de proceso (seco o húmedo) (Figura 12C), se encontró que el comportamiento es similar al mostrado para la comparación de variedades de café (Figura 12A), esto se explica debido a que el café muestreado, de la variedad arábica, fue procesado por vía húmeda, mientras que el café robusta por vía seca. El 89% de las muestras presentaron OTA DLNE con un promedio de 0.60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y una mediana de 0.74 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de OTA. Estos valores fueron significativamente más altos que las muestras procesadas por el método húmedo, cuya concentración promedio de OTA fue de 0.37 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Taniwaki *et al.*, (2003) estudiaron la contaminación de OTA en muestras de café procesadas por diferentes métodos, reportaron que las muestras procesadas por el método seco tuvieron una concentración más alta (hasta de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) que las muestras de café procesada por el método húmedo.

Respecto al café cultivado en forma orgánica o convencional, no se encontraron diferencias significativas en la prevalencia de OTA ($p=0.72$) (Figura 12D). Las proporciones estimadas de las muestras sin OTA en ambos tipos de cultivo solo difirieron en cinco puntos porcentuales (57.9% para orgánico y 52.6% para convencional) y en consecuencia, también fueron similares las proporciones de los datos con OTA (42.1% en orgánico y 47.4% en convencional). Estos resultados son similares a los encontrados por Fabiana *et al.*, (2014) y Rezende *et al.*, (2013), ya que no encontraron diferencias entre estos sistema de cultivo con respecto al riesgo de contaminación de OTA producida por hongos ocratoxigénicos. Este resultado sugiere que el tipo de cultivo no es un factor determinante para establecer la presencia de OTA en el café, pero si son determinantes la variedad de café, el procesamiento y si el café es tostado o no.

Tabla 11. Análisis de las medianas de la concentración de OTA de acuerdo con: variedad (arábica o robusta), tipo de café (No tostado o tostado), proceso (húmedo o Seco) y Cultivo (orgánico o convencional) (prueba Mann-Whitney) **

VARIABLE	MUESTRAS	MEDIA±SD (µg/kg de OTA)	MEDIANA (µg/kg de OTA)	95% LCL de Mediana	95% UCL de Mediana
Arábica/Húmedo	79	0.37 ± 0.63	0	0	0
Robusta/Seco	18	0.60 ± 0.55	0.74	0.05	1.00
No tostado	13	0.70 ± 0.60	0.99	0.05	1.06
Tostado	84	0.36 ± 0.62	0	0	0.02
Convencional	78	0.39 ± 0.62	0	0	0.05
Orgánico	19	0.48 ± 0.65	0	0	0.92

**Los datos no tienen distribución normal ($p \leq 0.05$). SD= Desviación Estándar (Fuente: Aguilar-Alvarez, *et al.*, 2021)

7.2 OTA en café soluble versus café de Chiapas

Al comparar la proporción de la presencia de OTA en las muestras de Chiapas, denominadas para esta comparación como “café no soluble”, con las muestras de café soluble, se observaron diferencias significativas ($p=0.023$), entre ambos tipos de café. Este resultado indica que es más probable encontrar muestras sin OTA en el café no soluble con 53.6% respecto al soluble, cuya proporción estimada de casos sin OTA fue del 21.4%.

Este mismo comportamiento se observó cuando se comparó el porcentaje de distribución de las muestras con y sin OTA de café soluble respecto a la variedad arábica y respecto al café tostado, ya que la proporción de las muestras sin OTA en el café arábica fue del 63.3% y en el café tostado de 59.5%, en tanto en el café soluble el valor se redujo al 21.4%. Por otra parte, la comparación de los datos entre el café variedad robusta y el café soluble, así como en el café no tostado y soluble, no mostraron diferencias significativas, lo que se traduce en que la probabilidad de encontrar OTA en estos tipos de café es similar.

En la comparación de las medianas (concentración de OTA) entre el café soluble y no soluble (Chiapas) (Tabla 12), así como también con el café de la variedad arábica y el café tostado, la mediana del soluble fue mayor con 0.99 µg/kg de OTA, en un intervalo de 0 y 1.37 µg/kg de OTA ($p < 0.05$), corroborando nuevamente que en el tipo de café soluble la

concentración de OTA es mayor. No obstante, se observó que, entre las medianas del café soluble, la de café variedad robusta y la del no tostado, no hubo diferencias significativas. La concentración promedio de OTA de las muestras de café soluble fue de 0.93 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Comparativamente, se ha reportado en diferentes estudios que la concentración de OTA en este tipo de café puede variar desde 0.1 hasta 25.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Khaneghah *et al.*, 2019).

En un estudio de café soluble comercializado en Chile se reportó que el 100% de las muestras presentaron contaminación de OTA con un promedio de 1.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en un rango entre 0.28 a 5.58 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Galarce-Bustos *et al.*, 2014). En 22 muestras de café soluble comercializado en Argentina, la OTA estuvo presente en el 77.3% de las muestras con un promedio de 1.99 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en un rango entre 0.22-13.66 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Dundray & Pacin, 2013). En café soluble comercializado en Italia, el promedio de OTA fue de 1.27 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y un rango entre 0.32-6.40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y la OTA estuvo presente en el 95.5% de las muestras. Es notable en los resultados obtenidos en este estudio, que la concentración promedio de OTA del café soluble mexicano y la prevalencia en las muestras analizadas, es menor que los reportados en los países antes mencionados, y que, la concentración de OTA encontrada en el 78.1% (n=11) de las muestras de café soluble mexicano no rebasa los límites europeos (>10 $\mu\text{g}/\text{kg}$), y solamente en el 21.4% (n=3) no se detectó OTA.

Por otra parte, se ha reportado que los niveles de OTA se incrementan en el café soluble por la concentración que ocurre durante el último estado del procesamiento (Galarce-Bustos *et al.*, 2014). Además que los niveles altos de OTA en este tipo de café podría ser consecuencia de la adulteración con cáscara de café, que se desprende de la cereza seca, que de manera fraudulenta se practica en algunas fábricas en la elaboración de café soluble o instantáneo (Gopinandhan *et al.*, 2007). Además, es sabido que en la elaboración del café instantáneo se emplean mezclas de cafés, procesados por la vía seca, principalmente de robusta, con niveles altos de OTA (Culliao & Barcelo, 2015; Duris *et al.*, 2010; Khaneghah *et al.*, 2019), lo que puede incidir directamente en los niveles elevados de esta micotoxina en el café soluble. En el caso de las muestras de los cafés solubles analizados en este trabajo, la concentración de OTA fue baja, lo que sugiere la posibilidad de que los cafés utilizados para su elaboración contenían bajas concentraciones de OTA, tal y como se demostró en el café

no soluble (café de Chiapas). Es factible que la baja prevalencia de OTA, sea el resultado del buen manejo durante el procesamiento del café y de las condiciones climáticas y geográficas de la zonas cafetaleras, lo que disminuye la posibilidad del desarrollo de hongos filamentosos y la baja producción de OTA.

Los resultados obtenidos, bajo las condiciones de este estudio, sugieren que el café de Chiapas presenta, una baja prevalencia de OTA, aun cuando gran parte del café que se comercializa localmente en mercados es procesado por los propios productores. Con frecuencia, el café no tiene marca o registro ante el sistema de salud, y no cuenta con controles de calidad rigurosos, como a los que se somete el grano de café de exportación. Además, la calidad del café depende directamente de las buenas prácticas de los productores durante el procesamiento, almacenamiento y tostado, ya que las características climáticas y geográficas de las distintas zonas cafetaleras muestreadas podrían ser favorables para el desarrollo de comunidades microbianas diversas que ejerzan un papel antagónico sobre el desarrollo de hongos ocratoxigénicos (Batista *et al.*, 2009; Benites *et al.*, 2017; Khaneghah *et al.*, 2019).

Tabla 12. Análisis de las medianas de la concentración de OTA entre café no soluble (Chiapas) vs soluble, No tostado vs soluble, Tostado vs Soluble, Arábica vs soluble y Robusta vs soluble (prueba Mann-Whitney U) **

VARIABLE	MUESTRAS	MEDIA±SD (µg/kg de OTA)	MEDIANA (µg/kg de OTA)	95% LCL de Mediana	95% UCL de Mediana
Soluble	14	0.93 ± 0.71	0.99	0	1.37
No Soluble	97	0.41 ± 0.62	0	0	0.05

**Los datos no tienen distribución normal ($p \leq 0.05$). SD= Desviación Estándar (Fuente: Aguilar-Alvarez, *et al.*, 2021)

7.3 Identificación de la diversidad microbiana en café utilizando NGS (Iluminación basada en secuencia de amplicón).

Se extrajo el ADN de las 13 muestras de café, empleando dos tipos de *kit* de extracción, el DNeasy® PowerSoil® (Soil) y el DNeasy® UltraClean® Microbial (Microbial), con lo que se obtuvo un total de 26 extracciones, para el análisis por NGS de bacterias (16S) y para hongos (ITS), lo que hizo un total de 52 archivos de resultados. La finalidad de usar dos tipos de *kit* fue comparar la concentración y calidad del ADN. Cabe señalar que, aunque el ADN se extrajo bajo las mismas condiciones de trabajo para las muestras de acuerdo con las indicaciones de cada *kit*, solamente con el *kit* Soil se logró extraer el ADN para las 13 muestras de café, tanto para el análisis 16S como para el de ITS. Con el *kit* Microbial no se extrajo la concentración suficiente del ADN para el análisis ITS de las muestras de cereza fresca, arábica, cultivadas orgánica y convencionalmente (muestra 14 y 24). El análisis de los resultados obtenidos del ADN de las muestras de café extraídas con los dos *kit* no mostraron diferencias significativas en cuanto a la población microbiana. Por ello, en esta sección se presentan los resultados de las muestras de café cuyo ADN se extrajo con el *kit* Soil. El resto de los resultados se presentan en el anexo 2.

Para la agrupación de secuencias se utilizaron las variantes de secuencia de amplicón (ASV) ya que permite tener un 100% de identidad. Además, se ha demostrado que el uso de ASVs es la metodología más adecuada para asignaciones a nivel de especies en datos obtenidos por secuenciación masiva del gen ribosomal 16S. Este método resuelve diferencias hasta de un nucleótido lo que mejora la asignación de especies (Callahan *et al.*, 2017).

El número promedio de lecturas sin procesar obtenidas para las secuencias de 16S e ITS fueron 236,084 con una cobertura de secuenciación estimada que fluctuó entre el 94.04 y 93.1%, después del trimming. La puntuación de calidad de Phred o Q “score” fue para la mayoría de las muestras ≥ 30 . Comúnmente con un $Q \geq 20$ se considera que una base fue asignada correctamente (Ewing *et al.*, 1998).

Las curvas de rarefacción (Figura 13), confirmaron que la profundidad de la secuenciación fue buena para todas las muestras de café, para el análisis de bacterias y de hongos ya que alcanza una asíntota en las curvas.

Después del procesamiento de las muestras, se obtuvieron un total de 4307 ASVs, 279 géneros y 983 especies, para el gen ribosomal 16S (bacterias) y su clasificación taxonómica se unificó mediante la utilización de tres bases de datos entrenadas (SILVA, RDP y NCBI), lo que nos permitió la asignación a nivel de género y especie. Estos resultados demuestran una gran diversidad en las muestras del café aquí estudiado, mayor a la de los estudios reportados que han utilizado NGS realizados con café de Brasil, de Colombia y de Ecuador (De Bruyn *et al.*, 2017; de Carvalho Neto *et al.*, 2018; de Oliveira Junqueira *et al.*, 2019).

Con relación a la población fúngica (ITS) se obtuvieron, 1576 ASVs, 130 géneros y 314 especies, al realizar el análisis mediante la base de datos UNITE. En ambos casos el umbral fue de 0.8. Esta diversidad fúngica nos permite identificar las especies presentes en las diferentes etapas de procesamiento del café en las muestras analizadas.

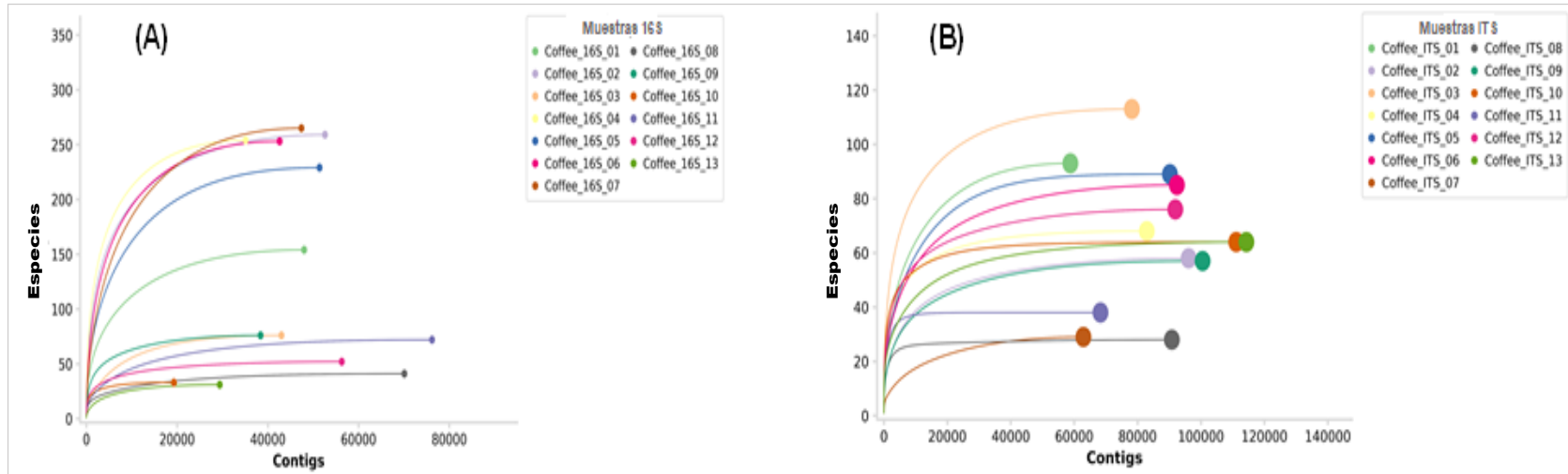


Figura 13. Curvas de rarefacción (A) para bacterias (16S) y (B) para hongos (ITS).

7.4 Análisis de diversidad alfa (α)

7.4.1 Índices Chao, Shannon y Simpson para la población bacteriana

Los índices Chao, Shannon y Simpson, para bacterias y hongos, se muestran en la Tabla 13. Para la población bacteriana (16S), el índice Chao, que mide la riqueza en las muestras, fue más alto en las muestras coffee_01 a la coffee_07 que corresponden a las variedades robusta y arábica cultivadas convencionalmente y procesadas por el método seco.

Al analizar estadísticamente este índice Chao para bacterias, según las características de las muestras de café (tipo procesamiento, cultivo, variedad, localización geográfica y tiempo de secado), se observó una diferencia estadísticamente significativa mayor en las muestras procesadas por el método seco respecto a las muestras procesadas por el método húmedo (coffee_08 a coffee_13) ($P < 0.05$). Esta diferencia en la diversidad bacteriana puede estar determinada porque el grano de café (endospermo) permanece metabólicamente activo, principalmente durante el procesamiento seco donde la cereza completa con la pulpa, mucilago y grano, participa en la fermentación espontánea, por lo que prevalece una gran diversidad y abundancia microbiana (De Bruyn *et al.*, 2017; Silva, *et al.*, 2008b), lo que se refleja en una mayor riqueza de la población bacteriana.

De acuerdo con el análisis estadístico se encontró también que el índice Chao fue significativamente diferente entre las muestras cultivadas orgánicamente y las cultivadas convencionalmente ($P < 0.05$). Este resultado coincide con diversos estudios que han reportado que la agricultura orgánica promueve una mayor riqueza de especies que la agricultura convencional (Bengtsson *et al.*, 2005; Tuck *et al.*, 2014).

Tabla 13. Índices de diversidad y riqueza de comunidades microbianas de la secuencias de genes de rARN 16S e ITS para la agrupación de ASVs, obtenidas de granos de café de Chiapas de las variables robusta (R) y arábica (A), cultivadas convencional (C) y orgánicamente (GO), procesadas por los métodos seco (muestras coffee_01 hasta coffee_07) y húmedo (muestras coffee_08 hasta coffee_13).

CLAVE	CARACTERISTICAS MUESTRA	BACTERIAS (16S)			HONGOS (ITS)		
		CHAO	SHANNON	SIMPSON	CHAO	SHANNON	SIMPSON
Coffee_01	1-R0	154	2.44	0.83	93	1.22	0.49
Coffee_02	2-R3	259	2.41	0.73	58	1.10	0.49
Coffee_03	3-R8	76	0.84	0.40	113	2.13	0.79
Coffee_04	4-R10	254	3.23	0.89	68	1.78	0.70
Coffee_05	5-A0	229	2.29	0.78	89	1.78	0.76
Coffee_06	6-A6	253	2.52	0.82	85	1.60	0.73
Coffee_07	7-A15	265	2.06	0.68	29	0.31	0.12
Coffee_08	8-A0G	41	1.67	0.77	28	1.30	0.59
Coffee_09	9-A3G	76	2.06	0.80	57	1.16	0.53
Coffee_10	10-A7G	33	1.61	0.70	64	2.48	0.87
Coffee_11	11-C0	72	1.25	0.60	38	1.45	0.64
Coffee_12	12-C3	52	1.93	0.77	76	1.96	0.75
Coffee_13	13-C7	31	0.48	0.21	64	1.83	0.75

Además, el índice Chao para bacterias varió significativamente ($p \leq 0.05$) conforme la zona geográfica de muestreo, lo que coincide con otros autores ya que la diversidad bacteriana se ve influenciada por la zona del cultivo de café y las características ambientales y climáticas de todo el entorno donde se cultiva (de Carvalho Neto *et al.*, 2018; de Oliveira Junqueira *et al.*, 2019; Khaneghah *et al.*, 2019).

Cabe señalar que las muestras de café orgánico y convencional procesadas por la vía húmeda se obtuvieron en las comunidades de Cruz del Rosario, Municipio De Las Margaritas y Anexo Ojo de Agua, Municipio. de la Independencia, lugares ubicados a 1360 y 1140 metros sobre el nivel del mar (msnm) respectivamente, con climas semi cálidos con lluvias abundantes durante el año. En tanto la robusta y arábica cultivadas convencionalmente y procesadas por la vía seca en Santo Domingo, Municipio. de Unión Juárez a 850 msnm con clima cálido y lluvias abundantes en el año (INEGI, 2020).

En cuanto a los índices de Shannon y Simpson (que nos permiten caracterizar la diversidad de especies en función de la riqueza de especies, así como de su abundancia relativa), no se observaron diferencias significativas entre las distintas muestras de café; excepto cuando se analizan las muestras según el tiempo de secado. En este caso se observa que las muestras de café coffee_03 y 13 presentan los valores más bajos del índice de Simpson (0.4 y 0.21 respectivamente). son muestras de arábica procesados por la vía seca y húmeda con un tiempo de secado de 8 y 7 días. Esta notable disminución de la diversidad de especies y riqueza bacteriana, puede ser producto de la reducción del sustrato y de la humedad, consecuencia del tiempo de secado de los granos de café y por ende la disminución de la actividad de agua (a_w), dado que después de 7 días de secado la pérdida de agua es considerable y es posible alcanzar una humedad $\leq 12\%$ y $a_w \leq 0.52$ (Silva, *et al.*, 2008b).

7.4.2 Índices de Chao, Shannon y Simpson para la población fúngica

En relación con la diversidad fúngica (ITS), no se encontraron diferencias significativas en los índices Chao, Shannon y Simpson entre las distintas muestras agrupadas según sus características, lo que puede sugerir que la población fúngica es homogénea en

cuanto a la riqueza, diversidad y abundancia en las diferentes muestras independientemente de la variedad, cultivo, procesamiento y tiempo de secado. Es decir, bajo las condiciones del experimento los índices observados en las distintas muestras indicaron un equilibrio en la riqueza y abundancia de las especies.

7.5 Identificación taxonómica a nivel de Fila

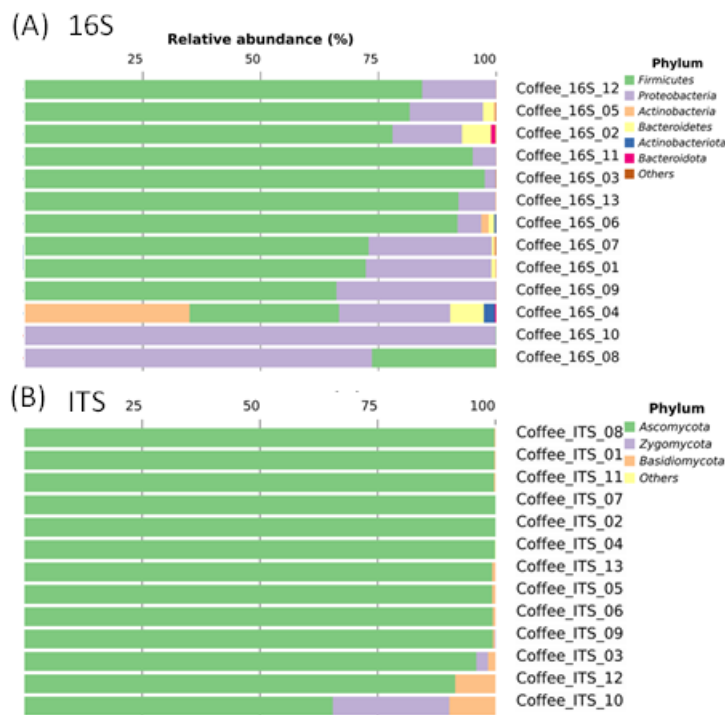


Figura 14. Abundancia relativa a nivel de Fila de las muestras de café. (A) 16S y (B) ITS, con un umbral $\geq 1.0\%$

7.5.1 Para bacterias (gen ribosomal rADN 16S)

Las abundancias relativas de cada nivel taxonómico desde Fila hasta especie se analizaron para los ASVs obtenidos en las diferentes muestras de café con un umbral $\geq 0.1\%$.

En la Figura 14 (Ay B) se muestran los Fila encontrados para (A) bacterias 16S y (B) hongos (ITS). Como puede observarse, para bacterias (16S), los Fila que predominaron en las muestras de café fueron: Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes/Bacteroidota y Actinobacteria/Actinobacteriota.

El Filo Firmicutes fue el de mayor abundancia y presente en las 13 muestras, con una abundancia relativa entre 0.1-97.6%, los principales géneros encontrados fueron *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Weissella*, *Lysinibacillus*, *Enterococcus* y *Rummeliibacillus*.

Proteobacteria fue otro de los Fila identificado con una abundancia considerable en todas las muestras, no obstante, las abundancias más altas se encontraron en las muestras coffee_16S_08 (73.7%) y en la muestra coffee_16S_10 (99.8%). De este Filo se encontraron 48 géneros distintos de los cuales *Acetobacter*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Gluconobacter*, *Franconibacter*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Kosakonia*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Kozakia*, *Komagataeibacter*, *Erwinia*, *Kerstersia* fueron los de mayor abundancia ($\geq 1\%$).

Bacteroidetes/Bacteroidota fue otro Filo encontrado en menor proporción en las muestras coffee_16S_01 (0.84%), 02 (7.05%), 04 (7.46%), 05 (2.30%), 06 (1.2%), 07 (0.48%), solo 4 géneros se identificaron (*Sphingobacterium*, *Flavobacterium*, *Chishuiella* e *Hymenobacter*). Estas muestras corresponden a las variedades de robusta y arábica convencionales tanto de cereza fresca como procesadas por la vía seca.

Actinobacteria/Actinobacteriota fue el último Filo identificado y también en las muestras coffee_16S_02 (0.14%), 04 (37.23%), 05 (0.35%), 06 (0.32%) y 07 (0.30). Fue notorio el aumento de este Filo en la muestra coffee_04. Los géneros identificados con una

abundancia $\geq 0.1\%$ fueron *Corynebacterium*, *Brachybacterium* y con una abundancia $\leq 0.5\%$ *Propionibacterium*, *Brevibacterium*, *Pseudoglutamicibacter*, *Curtobacterium*, *Cellulosimicrobium*, *Populibacterium*, *Leucobacter*.

Es posible que la presencia de los Fila Bacteroidetes y Actinobacteria en las muestras de café procesadas por el método seco principalmente en aquellas muestras con mayor tiempo de secado sea derivado de la larga exposición al sol y al medio ambiente, al suelo y al contacto humano y de animales domésticos como perros, gallinas, entre otros. También es posible que en estas diferencias influya la localización del muestreo (Santo Domingo, Municipio de Unión Juárez, Chiapas) (de Oliveira Junqueira *et al.*, 2019) tal y como se ve en los diferentes índices de diversidad los cuales variaron de manera estadística significativa respecto a lugar de muestreo (Anexos 3 y 4).

La proporción de los Fila presentes en la cereza fresca orgánica de la variedad arábica (coffee_08), coinciden con los resultados reportados para cereza fresca convencional de la misma variedad, del estado de Tabasco, México (Gutiérrez-Rodríguez, 2019), y en cereza fresca de la variedad arábica de origen Ecuatoriano (De Bruyn *et al.*, 2017) quienes reportaron que el Filo de mayor abundancia fue Proteobacteria y en menor proporción Firmicutes. No obstante, es importante señalar que, en este estudio, se observó que en las demás muestras de cerezas frescas de robusta (coffee_01) y arábica convencional (coffee_05 y 11) el Filo más abundante fue Firmicutes. Esta diferencia en las proporciones de los Fila puede estar determinada por el tiempo y características del muestreo y de la filosfera y rizosfera microbiana (Lindow & Brandl, 2003; Silva, *et al.*, 2008a).

7.5.2 Para hongos (ITS)

Respecto al análisis ITS (Figura 14(B)), el Filo encontrados en el 100% (n=13) de las muestras fue *Ascomycota* en un rango entre el 65.4 al 99.99%, los géneros más abundantes encontrados en las diferentes muestras de este Filo fueron *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Wickerhamomyces*, *Meyerozyma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Sordaria*, *Kluyveromyces*.

Los Fila Zigomicota y Basidiomicota se encontraron en el 23.1% (n=3) y el 15.4% (n=2) de las muestras. Los únicos géneros identificados del Filo Zigomicota fueron *Rhizopus* y *Mucor* y del Filo Basidiomicota los géneros *Rhodotorula*, *Kwoniella*, *Cryptococcus*, *Bandoniozyma*, *Schizophyllum*, *Trichosporon*, *Wallemia*, *Hannaella*, *Cystofilobasidium*, *Sporobolomyces*, *Sterigmatomyces*.

Interesante observar que en contraste con los Fila 16S, la diversidad fúngica fue menor y el número de Filo también. Situación que refleja un aspecto positivo en la disminución del riesgo a la salud por la presencia de hongos micotoxigénicos.

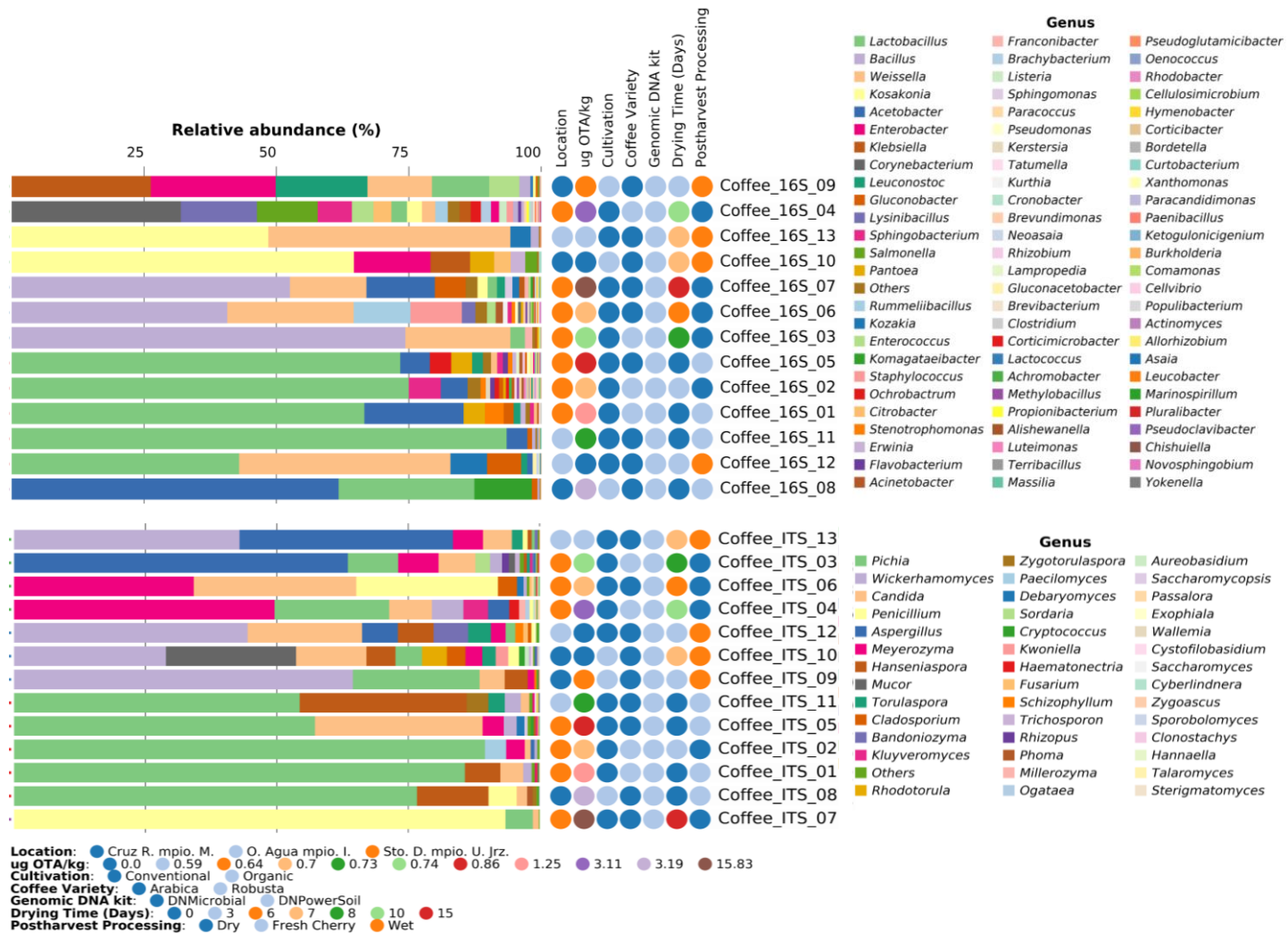


Figura 15. Abundancia relativa a nivel de género de las muestras de café. (A). 16S y (B) ITS, con un umbral $\geq 0.1\%$

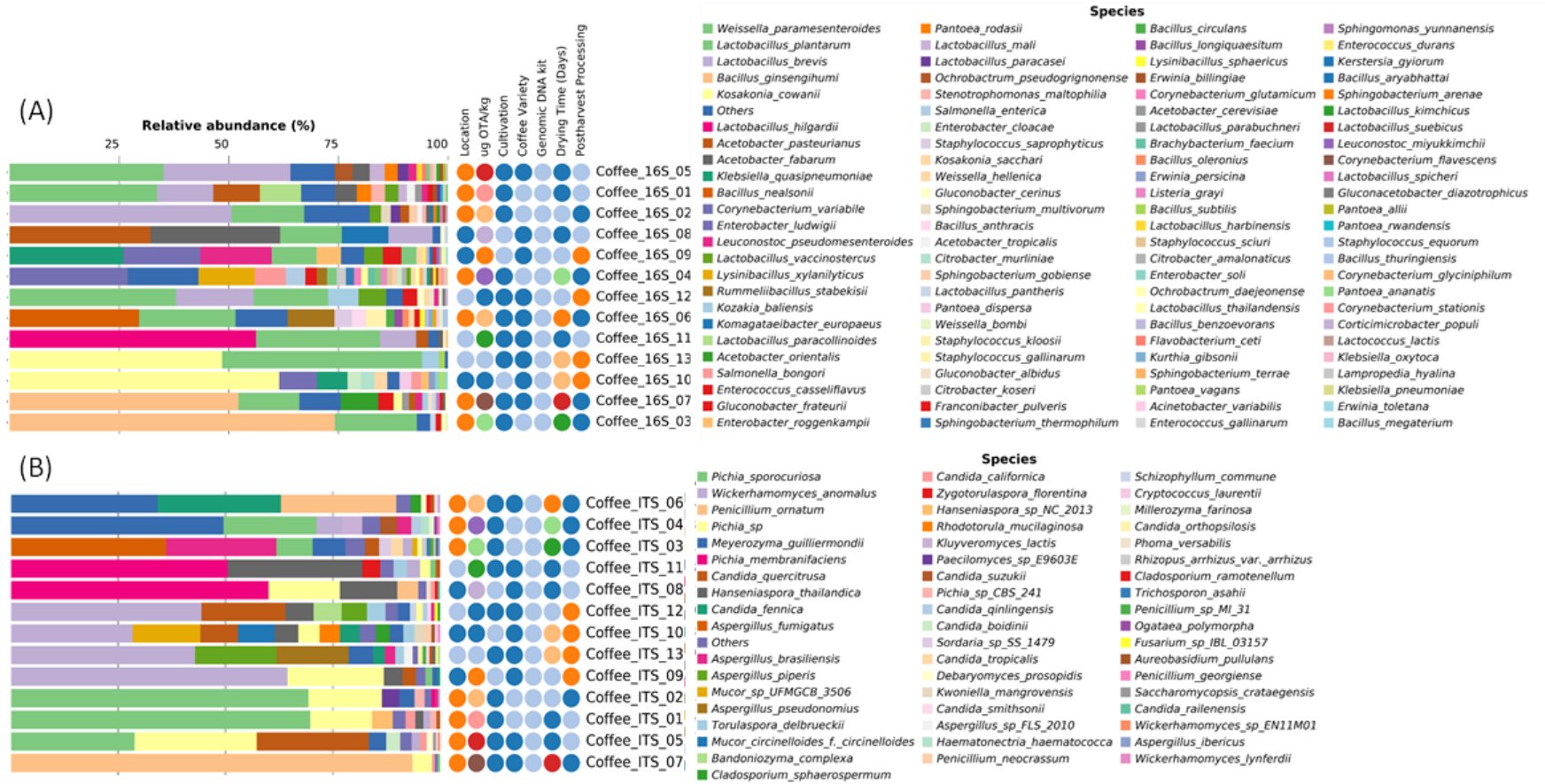


Figura 16. Abundancia relativa a nivel de especie de las muestras de café por género. (A) 16S y (B) ITS, con un umbral $\geq 0.5\%$

7.6 Identificación taxonómica a nivel de género y especie para bacterias (16S) y hongos (ITS)

La abundancia relativa a nivel de género para bacterias (16S) y hongos (ITS) con las características de cada muestra (variedad, tipo procesamiento, cultivo y tiempo de secado) y su contenido de OTA se muestra en las Figuras 15 (A, B) y a nivel de especie en la Figura 16 (A, B).

7.7 Cereza fresca

7.7.1 Diversidad bacteriana en cereza fresca

El género *Lactobacillus* fue el más abundante en las cerezas fresca de café, robusta y arábica convencional, coffee16S_01 (66.6%), coffee_16S_05 (73.4%) y coffee_16S_11 (93.5%), seguido por *Acetobacter* con el 18.7%, 5.6% y 3.9% respectivamente. En la (coffee_16S_08), *Acetobacter* fue el más abundante con el 61.7%. *Pantoea* fue otro género presente únicamente en las muestras coffee_16S_01 (4%) y coffee_16S_05 (3.9%).

Se identificaron las especies *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. parabuchneri*, *L. mali*, *L. paracasei* y microorganismos de la familia *Acetobacteraceae* productoras de ácido acético como *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter lovanienses*. Además, cabe señalar que *Pantoea* fue identificado solamente en las cereza frescas cosechadas en la zona de Unión Juárez.

Se han reportado en cereza fresca de la variedad arábica de origen brasileño, los géneros *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Tatumella*, *Hafnia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Chromobacterium*, *Pasteurella*, *Acinetobacter*, *Cedecea*, *Citrobacter* y *Shigella* (Silva, et al., 2008b Silva et al., 2000; Vilela et al., 2010). Gutiérrez-Rodríguez (2019) identificó en cereza fresca de café del estado de Tabasco-México los géneros *Weissella*, *Pantoea*, *Erwinia*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus* además de *Gluconobacter similar a lo reportado por Evangelista et al.* (2015) y de Carvalho et al., (2018). Y también en la superficie de la cereza fresca de arábica

de origen ecuatoriano las especies de la familia *Enterobacteriaceae* *Klebsiella pneumoniae*, *Gluconobacter spp.*, y *Dyella Kyungheensis*, y una pequeño porcentaje de bacterias lácticas como *Leuconostoc mesenteroides* y *L. pseudomesenteroides* (De Bruyn *et al.*, 2017).

Como puede observarse en este estudio, los resultados del análisis de las cerezas frescas del café de Chiapas, México, mostraron una mayor abundancia el género *Lactobacillus* y algunas levaduras. Situación que resulta ser favorecedora para la sucesión microbiana durante el procesamiento postcosecha del café, sumado también que algunos estudios han reportado que especies con *L. plantarum* presentan actividad antagónica contra hongos filamentosos ocratoxigénicos (Djossou *et al.*, 2011; Piotrowska & Zakowska, 2005).

7.7.2 Diversidad fúngica en cereza fresca

En cuanto a la población fúngica (ITS), se puede observar en la Figura 3B que *Pichia* fue la levadura más abundante en las muestras de cereza fresca coffee_ITS_01, 05, 08 y 11, con el 85.8%, 7.3% 76.7%, y 54.33% respectivamente, las especies identificadas fueron *Pichia sporocuriosa*, *Pichia sp.*, *Pichia membranifaciens*.

Otros géneros también identificados fueron *Hanseniaspora* y *Candida*. En el caso del primer género las especies más abundantes fueron *Hanseniaspora sp.*, *Hanseniaspora thailandica*, *Hanseniaspora vineae*. Y del género *Candida* las especies fueron *Candida californica*, *Candida quercitrusa*, *Candida boidinii*, principalmente. También *Wickerhamomyces* fue otro género presente en la cerezas frescas.

Lo géneros *Pichia* y *Candida* también fueron aislados de cereza fresca de café de origen brasileño de la zona de Minas Gerais además, conjuntamente con levaduras de los género *Arxula* y *Saccharomycopsis* (Silva *et al.*, 2000).

En cuanto a hongos filamentosos se identificó el género *Aspergillus* con abundancias <0.2% solo en las muestras coffee_01 y 11. La especie identificada fue *Aspergillus brasiliensis*; así como también hongos del género *Penicillium* en la cereza fresca

coffee_08(5,4%) y 11(0.13%), las especies fueron *Penicillium ornatum* y *Penicillium aurantiogriseum*. Cabe señalar que, aunque se identificaron estos géneros de hongos filamentosos, no se identificó ninguna de la especies productores de OTA y por otra parte, el porcentaje de abundancia de estos hongos es bajo comparado con lo reportado en cerezas frescas cortadas directamente de los árboles donde además de *Aspergillus* y *Penicillium*, se identificaron los géneros *Cladosporium*, *Fusarium*, *Pestalotia*, *Paecilomyces* (Silva, *et al.*, 2008b; Silva *et al.*, 2000).

Ha sido reportado que la diversidad microbiana en las plantas de manera general está relacionada con la filosfera y rizosfera; los microorganismos que habitan las partes externas de las hojas se denominan epifitos y su presencia depende del clima, medio ambiente, zona geográfica, agua, suelo, plantas que están alrededor de los cultivos de café además de las características propias del fruto y la variedad (Batista *et al.*, 2016; Lindow & Brandl, 2003).

Resulta importante conocer la diversidad bacteriana y fúngica en las cerezas frescas ya que la microbiota presente influye significativamente en la sucesión durante la fermentación espontanea en los procesamientos secos y húmedos.

7.8 Procesamiento seco

7.8.1 Diversidad bacteriana durante el procesamiento seco

La diversidad microbiana a nivel de género identificada en la muestra de robusta con 3 días de secado (coffee_16S_02) fue *Lactobacillus* (75.1%), las especies identificadas fueron *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum*, *L. vaccinostercus* y *L. spicheri*. Estos *Lactobacillus* han sido estudiados que tienen propiedades antagónicas en el desarrollo de hongos ocratoxigénicos y la producción de micotoxinas como la OTA (Djossou *et al.*, 2011; Lappa *et al.*, 2018).

En menor abundancia se identificó el género *Sphingobacterium* (6%), este género ha sido identificado previamente en hojas y en la cascarilla de café (Shemekite *et al.*, 2014; Y.

Mariño-Cárdenas, 2007), y algunas de sus especies habían sido previamente clasificadas en el género *Flavobacterium*, y han sido estudiadas como patógenas causando enfermedades diversas al ser humano como *Sphingobacterium multivorum* (Steinberg & Burd, 2014), por lo que su presencia en las muestras de café además del suelo y el aire, podría ser el resultado de la contaminación por contacto humano en el manejo de las muestras en las zonas de secado. Por otra parte este género conformado por grupo de bacterias gram negativas que tiene una amplia capacidad de degradación, además presenta un efecto antagónico contra hongos fitopatógenos y nemátodos en cultivos de papa (Krechel *et al.*, 2002). Las especies identificadas fueron *Sphingobacterium multivorum*, *Sphingobacterium chuzhouense*, *Sphingobacterium arenae*, *Sphingobacterium gobiense*, *Sphingobacterium wenxiniae*, *Sphingobacterium thalophilum*, *Sphingobacterium terrae*.

Se identificaron también los géneros *Acetobacter* (5%) y *Gluconobacter* (0.8%) estos géneros productores de ácido acético, han sido reportados también en el procesamiento seco del café y generalmente la fuente de contaminación está asociada con insectos (de Oliveira Junqueira *et al.*, 2019).

Otros géneros encontrados en menor abundancia fueron *Stenotrophomonas* (1%) que se puede encontrar en el aire que rodea los tanques de fermentación. Este género ha sido previamente identificado en café de origen colombiano de la variedad arábica durante la fermentación (de Oliveira Junqueira *et al.*, 2019).

En las muestras de robusta y arábica procesada por la vía seca con 6, 8 y 15 días de secado (coffee_16S_03, coffee_16S_06 y coffee_16S_07), el género *Bacillus* fue el más abundante con 74.4%, 40.7% y 52.5% respectivamente. Este género se encuentra en el suelo y la formación de esporas favorece su supervivencia en condiciones en dónde hay pérdida de humedad y actividad de agua como lo es en el tiempo de secado (fermentación) al sol. Tal y como se observa mientras más tiempo de secado la abundancia de la población bacteriana va disminuyendo, esto coincide con lo reportado por Silva *et al.* (2008a) quienes observaron que la población de bacterias fue decreciendo según los días de secado por la disminución de la a_w (Silva, *et al.*, 2008a). Por otra parte algunas especies de *Bacillus* puede producir enzimas

extracelulares que permiten la degradación de compuestos complejos como la celulosa y la pectina, estos polímeros se encuentran en la piel, pulpa y mucilago de las cerezas del café (Nasanit & Satyawut, 2015; Silva *et al.*, 2008a; Vilela *et al.*, 2010). Este género fue identificado también en café procesado por el método seco de origen brasileño (Silva, *et al.*, 2008a; Silva *et al.*, 2000). También fue identificado en cereza seca de café de Tabasco, Mexico (Gutiérrez-Rodríguez, 2019). Las especies identificada en las muestras coffee_16S_03 y 07 de este género fueron *Bacillus ginsengihumi* con el 74.2% y 52.2%, respectivamente y *Bacillus alkalinitrilicus* con el 0.1%, y 0.7%. Y en la muestra coffee_16S_06 *Bacillus nealsonii* (25.6%), *Bacillus anthracis* (3.2%), *Bacillus longiquaesitum* (1.8 %), *Bacillus circulans* (1.9%), *Bacillus oleronius* (1.5%), *Bacillus thuringiensis* (0.6%), *Bacillus benzoovorans* (0.9%). *Bacillus nealsonii* ha sido estudiado que contiene manasas y otras enzimas termorresistentes que permiten la degradación en la pulpa de café y otros componentes que producen viscosidad (Chauhan *et al.*, 2014b, 2014a).

Por otra parte, en estas muestras se identificó también el género *Weissella* con abundancias de coffee_16S_03 (19.8%), coffee_16S_06 (23.9%), coffee_16S_07 (14.4%), este género ha sido reportado en cerezas frescas (Leong *et al.*, 2014) y en café procesado por el método seco, semiseco y húmedo (Evangelista *et al.*, 2015; Gutiérrez-Rodríguez, 2019). Las especies identificadas fueron *Weissella bombi* (0.6% en la muestra coffee_16S_03, y 0.6% en la coffee_16S_04), *Weissella paramesenteroides* (18.7% en la coffee_16S_03, 21.9% en la coffee_16S_06, 13.9% en la coffee_16S_07), *Weissella hellenica* (1.3% en la coffee_16S_06). Algunas especies de *Weissella* como, *Weissella paramesenteroides*, *Weissella hellenica*, *Weissella bombi*, presentan la capacidad de inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos (Chen *et al.*, 2014; Ndagano *et al.*, 2011) y de algunos hongos como *Aspergillus Niger* (Varsha & Priya, 2014).

Pantoea, *Enterococcus*, *Kosakonia*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, fueron géneros también identificados en estas muestras.

Cabe señalar que el café cereza robusta con 10 días de secado (coffee_16S_04), presentó mayor diversidad de géneros. *Corynebacterium* (31.9%) fue el más abundante, este género está en el suelo o ambientes acuáticos, sus especies pueden ser patógenos de plantas y animales. Algunas especies son epifitas de hojas de café además presentan la propiedad de fijación de nitrógeno (Bastos, 2010; Nudrat & Debajit, 2020; Sellstedt & Richau, 2013). *Corynebacterium* se ha identificado en la fermentación de café arábica por el método húmedo (de Oliveira Junqueira *et al.*, 2019). Otro género identificado en esta muestra (coffee_16S_04) fue *Lysinibacillus* (14.4%), las especies de este género se han aislado de diferentes ambientes, es simbióticos con plantas y animales y también viven de manera libre en el suelo (Hashimi, Bindschedler & Junier, 2020), pueden producir endosporas y presentan un rol benéfico en agroecología ya que se han utilizado como agentes de biocontrol de insectos (Lozano & Dussán, 2013), algunas especies son excelentes promotores de crecimiento en plantas (Naureen *et al.*, 2017) y también se han utilizado en procesos de remediación (Ahsan & Shimizu, 2021). *Lysinibacillus* ha sido identificado en el procesamiento húmedo durante la fermentación espontánea del café (Evangelista *et al.*, 2015). *Enterococcus* (4.04%) fue otro de los géneros identificados al igual que *Sphingobacterium* (6.5%). El género *Enterococcus* ha sido reportado en la fermentación de café arábica durante el procesamiento húmedo (de Oliveira Junqueira *et al.*, 2019; Evangelista *et al.*, 2015) también se ha usado como iniciador en combinación con otras bacterias lácticas para inhibir el desarrollo de *A. ochraceus* (Huch & Franz, 2014).

Otros géneros identificados en esta muestra y que están relacionados con contaminación humana, animales, suelo y medio ambiente fueron *Listeria* (1.4%), *Clostridium* (0.37%), *Ochrobactrum* (1.9%). Y de la familia *Enterobacteriaceae* (*Salmonella* (11.5%), *Citrobacter* (3.4%), *Kosakonia* (2.8%), *Klebsiella* (2.1%), *Enterobacter* (1.5%), *Cronobacter* (0.41%)) (Jan-Roblero, Cruz-Maya, Guerrero-Barajas, 2020). Cabe mencionar que *Kosakonia* es un grupo de especies que son fijadoras de nitrógeno y promueven el crecimiento de plantas (Jan-Roblero *et al.*, 2020), además este género ha sido reportado en cerezas secas y frescas de café arábico de Tabasco México (Gutiérrez-Rodríguez, 2019).

Lactobacillus (2.9%), *Weissella* (2.5%), *Brachybacterium* (1.9%) también fueron identificados en esta muestra y en menor proporción ($\leq 0.5\%$) *Flavobacterium*, *Tatumella*, *Paracoccus*, *Propionibacterium*, *Brevibacterium*, *Pseudoglutamicibacter*, *Burkholderia*, *Actinomyces*, la diversidad en su mayoría fue ubicua y propia del suelo, plantas, agua y medio ambiente (Bolívar-Anillo *et al.*, 2016; Nudrat & Debajit, 2020).

Los géneros que se encontraron en común en las muestras coffee_16S_04 y 06 fueron *Rummeliibacillus*, *Staphylococcus*, *Lysinibacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Salmonella*, *Rhizobium*, *Brachybacterium* y *Erwinia*.

Por otra parte, en la muestra coffee_16S_06 a diferencia de las muestras coffee_16S_03 y 07, se identificaron con menor abundancia ($\leq 0.8\%$) los géneros *Kurthia*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Terribacillus*, *Cellulosimicrobium*, *Paenibacillus*, *Populibacterium* y *Leucobacter* generalmente ubicuos de suelo, agua y aire.

Respecto a la muestra coffee_16S_07 se identificaron los géneros *Sphingomonas* (1.40%), *Gluconacetobacter* (1.35%), *Kozakia* (1.28%), *Komagataeibacter* (0.37%), *Neoasaia* (0.29%), *Hymenobacter* (0.26%), *Massilia* (0.18%) y *Curtobacterium* (0.14%).

En las muestras coffee_16S_03 y 07 *Franconibacter*, este género fue anteriormente clasificado como *Enterobacter*, y su reclasificación taxonómica se realizó en 2014 (Stephan *et al.*, 2014).

7.8.2 Diversidad fúngica durante procesamiento seco.

Respecto a la población fúngica, *Pichia* fue la levadura que estuvo presente en todas las muestras procesadas por el método seco y en la muestra coffee_ITS_02 la abundancia relativa fue la más alta (89.6%). Se ha reportado que *Pichia* es un género muy abundante durante el procesamiento de café por el método seco (Silva *et al.*, 2000), además que esta levadura (*Pichia*) es favorable para evitar el desarrollo, esporulación de algunos hongos ocratoxigénicos y la producción de OTA (Durand *et al.*, 2013; Gil-Serna *et al.*, 2009, 2011). *Pichia sporocuriosa* fue la especie más abundante y presente en todas las muestras. En la

muestra coffee_ITS_02 también se identificaron los géneros *Candida* (1.1%) y *Aspergillus* (0.8%) este último representado por la especie *Aspergillus brasilienses*, especie que no produce OTA (Frisvad *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2009).

En cuanto a la diversidad fúngica en la muestra Coffe_ITS_03 de café robusta con 8 días de secado el género *Aspergillus* fue el más abundante (63.7%). Las especies identificadas fueron *Aspergillus brasilienses* (25.7%) y *A. fumigatus* (36.2%). En menor abundancia ($\leq 0.2\%$) se encontraron *A. piperis*, *A. ibericus*, *A. aculeatus*, *A. pseudonomius*. Estas especies han sido reportadas en café de origen africano y tailandés y ninguna de ellas es productora de OTA (Djossou *et al.*, 2015; Noonim *et al.*, 2008; Varga *et al.*, 1996).

Como se mencionó anteriormente en esta muestra también se identificó el género *Pichia* (9.6%), al igual que en todas las demás muestras de café analizadas y procesadas por el método seco, las muestras con menor abundancia de *Pichia* fueron coffee_ITS_06 y 07. También el género *Candida* (7.0%), estuvo en todas las muestras procesadas por el método seco, en la muestra coffee_ITS_07 se encontró la abundancia más baja (1%). El prolongado tiempo de secado al sol y con ello la variación de la a_w , es un factor que dificulta el grado de desarrollo de las especies colonizadoras en las muestras de café (Silva, *et al.*, 2008a).

Los géneros *Rhizopus* (1.3%) y *Mucor* (1.1%) (Fig. 3B) fueron géneros que únicamente estuvieron presentes en la muestra coffee_ITS_03, estos géneros han sido reportados en café analizado de costa de marfil ((Djossou *et al.*, 2015), café de Chiapas-México (Garrido-Ramírez, 2018), de Brasil (Batista *et al.*, 2003; de Almeida *et al.*, 2019; Fabiana *et al.*, 2014), de diferentes orígenes y de las variedades robusta y arábica (Pardo *et al.*, 2004). Es importante señalar que se ha estudiado que el género *Rhizopus* favorece el desarrollo de aroma del café (de Melo Pereira *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2016) y además que algunas especies de *Rhizopus* tienen el potencial para degradar micotoxinas como la OTA (de Almeida *et al.*, 2019; Varga *et al.*, 2005).

También en esta muestra coffee_ITS_03 se identificó el género *Sordaria* (2.8%) que es ubicuo y se encuentra en el suelo, plantas y animales. Algunas especies presentan efectos antagónicos contra hongos filamentosos como *Sordaria fimicola* que inhibe el desarrollo de *Fusarium graminearum* causante de la enfermedad conocida como Tizón en trigo y cebada (Santra y Banerjee, 2020).

Meyerozyma también se identificó en las muestras coffee_ITS_03 (7.7%), 04 (49.6%) y coffee_ITS_06 (34.2%), que corresponden a café robusta y arábica procesada por la vía seca, la especie *M. guilliermondii* fue la que se identificó principalmente. Esta levadura ha sido reportada en café de diferentes orígenes y se ha presentado tanto en café procesado por la vía seca (Hamdouche *et al.*, 2016; Silva, Batista *et al.*, 2008b) como en la fermentación de café por la vía húmeda (de Carvalho Neto *et al.*, 2017). Especies pertenecientes al género *Meyerozyma*, han sido identificadas en la superficie de frutas o plantas y presentan actividad contra algunos hongos patógenos como el que produce la antracnosis del chile, y también se ha reportado su efecto fungistático contra *P. roqueforti* (Coda *et al.*, 2013; Leyva Salas *et al.*, 2017).

Wickerhamomyces fue otro género identificado en todas las muestras procesadas por el método seco. La mayor abundancia se identificó en la muestra coffee_ITS_04 (6.0%). Esta levadura se ha nombrado como *Pichia*, fue reclasificada en el 2008 (Kurtzman *et al.*, 2008). En la muestras de café se identificaron *W. anomalus*, y *Wickerhamomyces sp_EN11M01*. Se ha encontrado en café procesado por el método seco, semi-seco y húmedo (Evangelista *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2016; Gutiérrez-Rodríguez, 2019; Silva *et al.*, 2008b). Cabe señalar que *Wickerhamomyces* es una levadura pectinolítica que produce grandes cantidades de poligalacturonasa, lo que favorece la degradación del mucílago. También ha sido utilizada como iniciador en la fermentación del café por el método húmedo (de Melo Pereira *et al.*, 2015b; Haile & Kang, 2019).

En la muestra coffee_ITS_04 al igual que en la muestra coffee_ITS_03 se encontró el género *Kluyveromyces* (4.7%). Las especies identificadas fueron *K. marxianus* y *K. lactis*, estas levaduras también han sido reportadas previamente en procesamiento de café semi-seco

y húmedo (Evangelista *et al.*, 2015; Masoud *et al.*, 2004; Vilela *et al.*, 2010). En esta muestra también se encontró el género *Aspergillus* (4.0%), las especies identificadas en esta muestra fueron *A. brasilienses*, *A. fumigatus*, *A. piperis* y *A. ibericus*, como se puede observar fueron menos especies que las identificadas en la muestra coffee_ITS_03 y su abundancia fue menor.

Los género *Haematonectria* (1.9%) y *Millerozyma* (1.2%) estuvieron presentes únicamente en esta muestra (coffee_ITS_03). Son levaduras que generalmente están en el suelo y plantas, en el caso de *Haematonectria* la especie identificada fue *H. haematococca* es causante de enfermedades en plantas como los cítricos (Yago & Chung, 2011) y *Millerozyma farinosa* (también identificada como *Pichia farinosa*) es un género osmotolerante y puede casuar enfermedades al ser humano, aunque los casos son muy raros (Mallet *et al.*, 2012).

Se observó en las muestras coffee_ITS_06 Y 07 que a mayor tiempo de secado la población del género *Penicillium* fue incrementando. En ambas muestras *Penicillium* fue el género más abundante con 27.0% y 93.5% respectivamente y la única especie identificada fue *Penicillium ornatum*. Este hongo no se ha reportado en muestras de café y se desconoce su potencial micotoxigénico. Fue descrito en 1968 y se aisló del suelo (Houbraken *et al.*, 2020; Houbraken & Samson, 2011; Visagie *et al.*, 2014).

También en ambas muestras se identificó el género *Candida* (31.9% y 5.2% respectivamente). Este género ha sido reportado en procesamiento de café seco y húmedo (Inés *et al.*, 2012; Masoud *et al.*, 2004; Nasanit & Satayawut, 2015; Reis *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2008b; Silva *et al.*, 2000).

Para coffee_ITS_06 además de lo anterior también se identificaron los géneros *Cladosporium* (3.6%), *Debaryomyces* (1.2%). Y en la coffee_ITS_07 se identificó el género *Pichia* (1.1%).

7.9 Procesamiento húmedo

7.9.1 Diversidad bacteriana durante el procesamiento húmedo

En Chiapas, México, durante el procesamiento húmedo, primeramente, la cereza es despulpada de manera manual o mecánica (Figura 17) y posteriormente se pone a fermentar entre 12 a 20 horas, una vez pasado el tiempo se lava del grano y se seca al sol (Figura 18).

Durante el procesamiento del café están presentes diferentes microorganismos que utilizan la pulpa y mucilago como nutrientes durante la fermentación.



Figura 18. Secado de los granos de café al sol.



Figura 17. Despulpadora de café

Esta microbiota produce ácidos orgánicos, azúcares y otros compuestos que influirán positiva o negativamente en las características sensoriales del café. Y que después de la fermentación y durante el secado estos metabolitos y nutrientes remanentes en el grano, sumado con la humedad facilitarán el desarrollo de bacterias, levaduras y hongos que se van adaptando a las nuevas condiciones del grano como la temperaturas y humedad, en los diferentes estados de secado del grano de café (Evangelista *et al.*, 2015).

Al observar la diversidad bacteriana (Figura 15 y 16 (A)), en las muestras procesadas por el método húmedo (coffee_16S_09,10, 12 y 13) se identificaron en todas ellas los géneros *Kosakonia* (0.5%, 64.6%, 0.2% y 48.5%), las especies encontradas fueron *Kosakonia sacchari* (3% en la 10), *Kosakonia cowanii* (0.5% en la muestra coffee_16S_16S_09, 61.5% en coffee_16S_10, 0.2% en coffee_16S_12 y 48.5% en coffee_16S_13). Se puede observar como el género *Kosakonia* fue muy abundante en las muestras de 7 días de secado de arábica cultivada orgánica y convencionalmente. *Kosakonia* es un género reclasificado dentro del complejo de las Enterobacterias y fue clasificado dentro de *Enterobacter*. Es posible encontrarla en el suelo, agua y también viviendo en asociación con plantas, insectos, animales o humanos (Jan-Roblero *et al.*, 2020).

También se identificó en estas muestras el género *Gluconobacter*, las especies que lo conforman se caracterizan por la producción de ácido acético.

Únicamente en la muestra coffee_16S_09 se encontró el género *Lactococcus* (0.54%) específicamente *Lactococcus lactis*, y en la muestra coffee_16S_10, *Pantoea* (4.5%). Estas muestras corresponden a arábica cultivada orgánicamente. En común se encontraron en ambas muestras los géneros *Klebsiella* (26.3% y 7.5%), *Enterobacter* (23.6% y 14.5%) *Enterococcus* (5.7% y 0.1%), *Erwinia* (0.16% y 2.8%), *Citrobacter* (0.1% y 3.1%) y *Salmonella* (0.2% y 2.2%).

Por otra parte, en la muestra coffee_16S_12 cultivada convencionalmente y secada al sol por tres días a diferencia de las otras muestras, se identificaron los *Gluconacetobacter* (0.71%), *Asaia* (0.2%) y *Acetobacter* (1%).

En las muestras coffee_16S_09, 12 y 13 se identificaron en común *Weissella* (12.8, 39.9 y 45.7), *Kozakia* (05, 6.9 y 3.9%). En las muestras coffee_16S_09 y 12, *Leuconostoc* (17.3 y 1.1%), y *Lactobacillus* 10.8 y 42.9%. Y en las muestras coffee_16S_09 y 13 *Bacillus* (2.04% y 1.5%).

Los géneros y especies identificadas coinciden con lo reportado en estudios similares realizados en la fermentación y procesamiento de café arábica por el método húmedo y seco (De Bruyn *et al.*, 2017), así como también los resultados reportados por Evangelista *et al.*, (2015) sobre la diversidad microbiana asociada con la fermentación espontánea durante el método húmedo. Cabe señalar que en este estudio del café de Chiapas-México se encontró abundancias altas de algunas especies como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, así como *Kosakonia*, a diferencia de lo reportado en los estudios anteriormente mencionados.

También se observó que entre las muestras procesadas por el método húmedo, la muestra coffee_16S_09 cultivada orgánicamente y secada al sol por tres días, su diversidad y riqueza fue mayor, este resultado coincide con el valor encontrado de los índices de Chao, Shannon y Simpson (sección 7.4.1). Cabe señalar que las muestras de café orgánico fueron las que presentaron mayor diversidad y riqueza comparadas con las de café convencional, situación que coincide con lo reportado en algunos estudios que afirman que la agricultura orgánica promueve mayor riqueza microbiana que la agricultura convencional (Bengtsson *et al.*, 2005; Tuck *et al.*, 2014).

7.9.2 Diversidad fúngica durante el procesamiento húmedo

Con relación a la diversidad fúngica, las muestras coffee_ITS_09, 10, 12 y 13, se caracterizaron por la abundancia del género *Wickerhamomyces* con 64.4%, 28.4%, 44.4% y 42.9% respectivamente la especie más abundante fue *Wickerhamomyces anomalus* y solo el 0.5% de *Wickerhamomyces lynferdii* en la muestra coffee_ITS_10. Está reportado que el género *Wickerhamomyces* fue primeramente llamado “*Pichia*” y fue renombrado en el 2008 por Kurtzman *et al.*, (2008). La presencia de este género y el género *Pichia* en estas muestras puede ser un factor positivo para inhibir el desarrollo de hongos ocratoxigénicos, ya que diversos estudios han reportado que estas levaduras presentan propiedades antifúngicas al inhibir el desarrollo de hongos filamentosos (de Melo Pereira *et al.*, 2015a; Leyva Salas *et al.*, 2017; Masoud *et al.*, 2004). Se identificaron también los géneros *Candida*, *Hanseniaspora*, *Meyerozyma*, *Schizophyllum*.

Por otra parte, el género *Mucor* fue sobresaliente únicamente en las muestras coffee_ITS_09 y 10 con 0.1% y 24.77% de abundancia relativa, respectivamente.

Únicamente en la muestra coffee_ITS_10 se observaron los géneros *Rhodotorula* (4.74%), *Kwoniella* (2.39%) y *Trichosporon* (0.4%).

En las muestras coffee_ITS_10, 12 y 13 se encontraron los siguientes géneros en común: *Bandoniozyma* (0.26%, 6.59%, 0.54%), *Aspergillus* (0.29%, 6.8% y 40.56%), *Penicillium* (2.3%, 0.45% y 0.9%), *Cladosporium* (3.5%, 0.67% y 0.1%), *Torulaspota* (2.6, 4.33% y 2.1%).

El género *Sterigmatomyces* únicamente se encontró en la muestra coffee_ITS_12 con 0.11%.

Cryptococcus fue común entre la muestra coffee_ITS_10 y la 12 con 0.26% y 1.1% de abundancia relativa, respectivamente.

Cabe señalar que en las muestras coffee_ITS_10 y 13, se caracterizaron por la presencia del género *Zygotulaspota* (0.3 y 0.5%).

También se observó que la diversidad fúngica identificada en este estudio para café de Chiapas, México procesado por los métodos seco y húmedo, estuvo conformada por especies de hongos que, de acuerdo con lo reportado en la literatura no son ocratoxigénicos. Situación que difiere con los reportes de hongos identificados de cafés de origen brasileño, africano o tailandés por citar algunos, en donde una gran parte de hongos filamentosos identificados son productores de OTA (Barcelo *et al.*, 2017; Batista *et al.*, 2009; Djossou *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2008a). En café de Chiapas se identificaron en muestras de café acopiado en centros de comercialización durante el 2007 las especies *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus clavatum*, *Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.*, *Mucor sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Curvalaria sp.*, *Helminthosporium sp.*, y *Monilia sp.*, y la concentración promedio de OTA fue de 40 ppb detectado pruebas de ELISA (Garrido-Ramírez, 2018), aunque no especifica el tipo y características de la muestra en la

que se encontró OTA, es posible que durante el almacenamiento y el manejo del grano sumado a las condiciones climáticas y de humedad en los lugares de almacenamiento hayan facilitado el desarrollo de los hongos filamentosos y la producción de OTA y que no sean propiamente derivado del procesamiento del café.

En la literatura se han reportado especies ocratoxigénicas tales como *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus sulphureus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *A. westerdijkiae*, *Aspergillus sclerotiorum*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus auricomus*, *Aspergillus steynii*, *Aspergillus elegans*, *Aspergillus insulicola*, *Aspergillus petrakii* y *Penicillium verrucosum*, *P. brevicompactum*, *P. crustosum*, *P. olsonii*, *P. oxalicum* o *Penicillium nordicum* (Alvindhia & de Guzman, 2016; Batista *et al.*, 2009; Batista *et al.*, 2003; Benites *et al.*, 2017; Djossou *et al.*, 2015; Leong *et al.*, 2007; Noonim *et al.*, 2008; Suárez-Quiroz *et al.*, 2004; Taniwaki, *et al.*, 2003) y, en este estudio y mediante el análisis de NGS, no se identificó ninguna de las especies antes mencionadas.

Cabe mencionar que, de las 26 muestras de café de Chiapas de este estudio, se aislaron y se identificaron macro y microscópicamente más de 90 hongos de los género *Aspergillus* y *Penicillium* y se les cuantificó su potencial ocratoxigénico (resultados no mostrados, se presentan en el anexo 5). La más alta concentración producida fue en una cepa de *Aspergillus* (155.3 µg/kg de OTA,) en nueve cepas la concentración estuvo entre 1.1-2.1 µg/kg de OTA y en los 74 hongos restantes la OTA fue menor a 0.9 µg/kg. La concentración de OTA producida por el hongo aislado de las muestras de Chiapas fue baja comparada con un hongo ocratoxigénico control (DO162) cuya producción de OTA fue de 7458.1 µg/kg. Este resultado coincide con los resultados reportados por Gutiérrez-Rodríguez (2019), que encontró solamente una cepa de *Aspergillus* en café Tabasco, México cuya concentración producida de OTA fue de 105±16.36µg/kg. Ruellan (2017) cuantificó el potencial de OTA de hongos filamentosos aislados de café de México y de Costa de Marfil. Reportó que la mayoría de hongos mexicanos produjeron concentraciones bajas de OTA (≤ 0.9 µg/kg) y solamente una cepa produjo 155.5 µg/kg de OTA. No obstante, también reportó que para

hongos filamentosos de Costa de Marfil, las concentraciones fueron de 27363.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y de 41038.2 de OTA, ambas correspondientes a *Aspergillus Carbonarius*.

También en este estudio del café de Chiapas, se observó que la diversidad fúngica presente en las muestras, no presentó diferencias entre el método de procesamiento (seco o húmedo), tipo de cultivo, variedad o lugar geográfico (localización). Un comportamiento similar fue reportado en café procesado por el método seco en 15 granjas en Brasil, durante dos años, los hongos filamentosos encontrados fueron uniformes durante todas las etapas en los dos años consecutivos del estudio, sin tener una explicación al respecto (Silva *et al.*, 2000, Silva datos no mostrados). Situación similar respecto a la distribución uniforme en los hongos filamentosos en muestras de café en una región de Brasil fue reportada, atribuyendo este comportamiento a la alta incidencia y ubicuidad de las especies de hongos filamentosos y no tanto por las condiciones ambientales o en las prácticas de manejo de cultivos (Batista *et al.*, 2003).

7.10 Identificación molecular de bacterias aisladas por métodos dependientes de cultivo

Por otra parte, fue interesante corroborar que algunas de las especies de la población bacteriana identificadas en las muestras de café analizadas mediante NGS coincidieron con la identificación molecular de bacterias aisladas de las mismas muestras por métodos dependientes de cultivos. Los géneros y especies aislados (Figura 19) con mayor frecuencia fue *Leuconostoc*, y las especies: *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc mesenteroides subsuionicum*, aisladas de variedades robusta y arábica de cereza fresca (0 días de secado) y también en café secado de manera natural, estas especies no fueron identificadas en las cerezas frescas, solamente se identificó *L. pseudomesenteroides*. En menor proporción se encontraron: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus pentosus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Listeria grayi*, *Streptococcus vestibularis*.

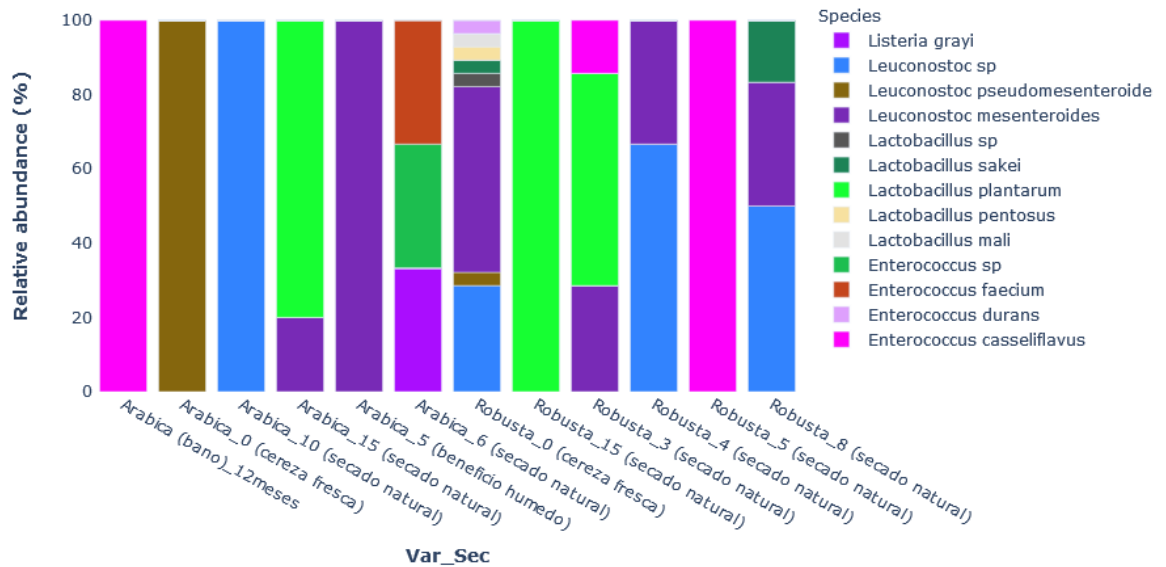


Figura 19. Abundancia relativa de especies de bacterias aisladas por métodos dependientes de cultivo de diferentes muestras de café analizadas en este estudio de café de Chiapas ciclo 2018/2019.

De Bruyn *et al* (2017) encontró que los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Lactobacillus* estaban presentes en muestras de café procesadas por beneficio seco y húmedo en diferentes tiempos de secado. Resultados similares encontramos en el presente trabajo con excepción del género *Lactococcus*. De acuerdo con Dalié *et al.* (2010), los microorganismos del género *Leuconostoc* presentan alguna actividad antagónica contra hongos del género *Penicillium* y *Aspergillus*. Así mismo Leong *et al.* (2014) identificaron al género *Leuconostoc* como especie predominante en muestras cerezas de café. Las especies halladas han sido reportadas en la mayoría de los estudios de café, y algunas han sido reportadas ser capaces de tener algún efecto antagónico contra hongos ocratoxigénicos de hongos ocratoxigénicos (Rodríguez-Serrano, *et al.*, 2019, Djossou, *et al.*, 2011). Por otro lado, Belguesmia *et al.*, (2012) y Kivanc *et al.*, (2014) reportan la actividad de *Enterococcus durans* contra algunos hongos como *Fusarium culmorum*, *Penicillium roqueforti* and *Debaryomyces hansenii*, *P. crysigebyn*, *P. griseofulvum*, *A. parasiticus*, *P. crysigebyn*, *A. parasiticus*.

En cuanto a *L. mali* se ha reportado que tiene características probióticas y produce compuestos de bajo peso molecular que además presentan efectos antagónicos en algunos hongos (Koh, *et al.*, 2018)

El aislamiento e identificación de las bacterias por métodos dependientes de cultivo nos da la oportunidad de aislar microorganismos que puedan ser utilizados tanto de biocontrol para hongos ocratoxigénicos o bien aprovechar su potencial biotecnológico.

7.11 Diversidad Beta (β) en las estructuras bacterianas y fúngicas según Bray Curtis

El análisis de componentes principales (PCA) en 3D del índice de diversidad beta nos permite conocer el cambio en la composición de las comunidades biológica y se deriva de la relación de diversidad alfa con la diversidad gamma. (Balsega & Gómez-Rodríguez, 2019). Para efectos de dicho análisis (PCA), fueron consideradas las disimilitudes Bray-Curtis de las estructuras de las comunidades bacterianas y de comunidades fúngicas. Al mismo tiempo, fueron tomadas en cuenta por separado las diferentes características de las muestras de café (tipo procesamiento postcosecha (seco o húmedo y la cereza fresca), lugar de muestreo, tipo de cultivo y variedad).

Con el análisis de componentes principales de las muestras de café, respecto de los tipos de procesamiento (Figura 20A), se encontró que la diversidad bacteriana es estadísticamente distinta según el procesamiento seco o húmedo. También fue distinta considerando las cerezas frescas (tiempo 0 días) ($p < 0.05$). Un comportamiento similar se observó cuando se analizó respecto al lugar de muestreo (Figura 21A) ($p < 0.05$).

Al analizar las comunidades fúngicas, se encontró que estadísticamente presentaron diferencia significativa en cuanto a su diversidad ($p \leq 0.05$) durante los distintos procesamientos, no así en la cereza fresca, ya que como puede observar en la figura 20B, la agrupación de las comunidades fúngicas en el método seco y húmedo está claramente definida. Lo que refleja que existen diferentes especies entre cada proceso. No obstante, la población fúngica no mostró diferencias según la localización de muestreo (Figura 21B) ($p > 0.05$). Esta homogeneidad en las muestras en los distintos lugares, sugiere que los factores ambientales, geográficos, así como el manejo adecuado del café durante el procesamiento, favorece la colonización y desarrollo de una microbiota fúngica homogénea y que es posible que la ubicuidad de las especies se refleje en esta uniformidad, aunque se requiere de continuar esta investigación para analizar la población fúngica y encontrar la respuesta a esta *variabilidad homogénea*.

Al analizar la diversidad beta de las comunidades bacterianas y fúngica, considerando las estructuras según el tipo de cultivo (fig. 23 A y B) y variedad (fig. 24 A y B), se observó que no existió una diferencia significativa de la diversidad bacteriana según el cultivo y la variedad ($P > 0.05$). No obstante, en la diversidad fúngica al hacer el análisis considerando la variedad de café, la diversidad beta fue estadísticamente diferente Figura 24(B) ($p \leq 0.05$). Dicha situación resulta interesante ya que, en este caso, a pesar de que la población fue homogénea, presenta un cambio en las comunidades bacterianas cuando se trata de la variedad arábica o robusta. Situación que es comprensible porque la variabilidad en cuanto a composición química de cada especie puede favorecer el desarrollo de ciertos géneros y especies en cada uno, así como también las condiciones durante la fermentación (Buchanan, Tice, & Marino, 1982).

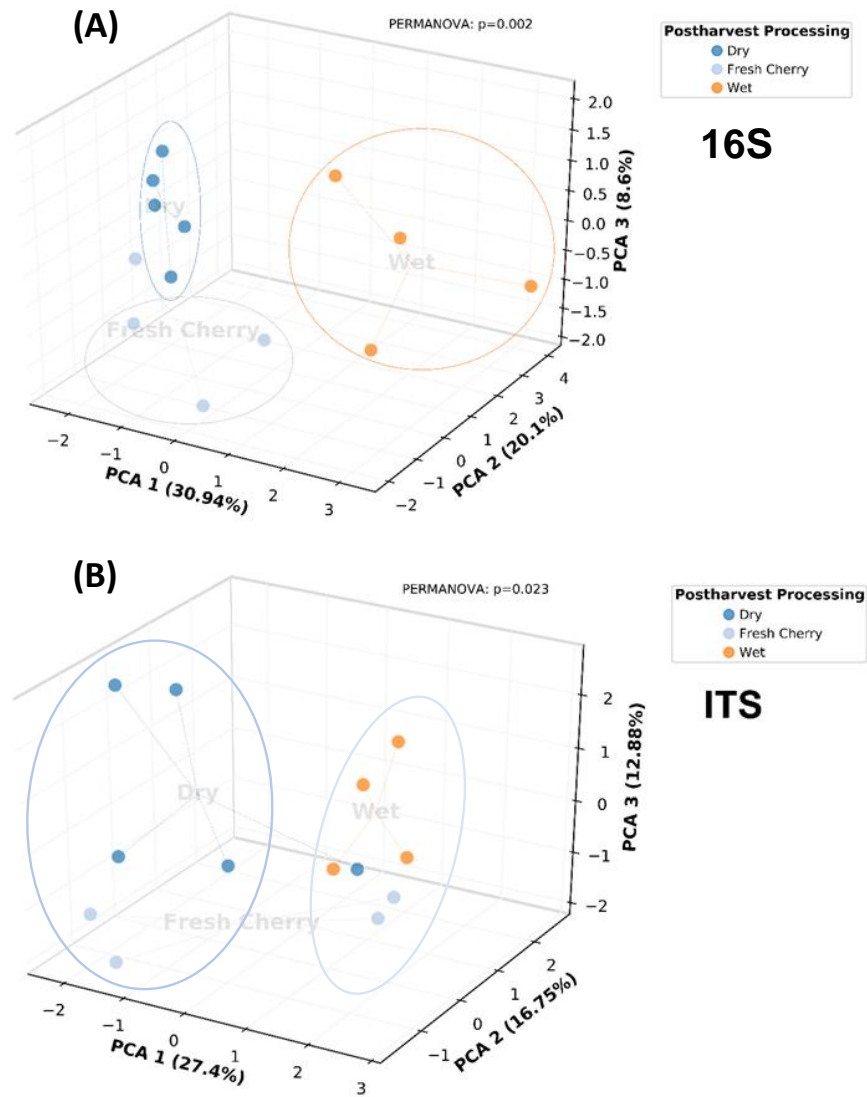


Figura 20. Gráfica tridimensional de PCA de la diversidad beta microbiana de las muestras de café analizadas. El gráfico se basa en las diferencias de Bray Curtis de las comunidades (A) bacterianas (16S) ($p \leq 0.05$) y (B) fúngicas (ITS) ($p \leq 0.05$). Las elipses muestran la agrupación aproximada de conglomerados de las muestras considerando el método de procesamiento (húmedo, seco y cereza fresca)

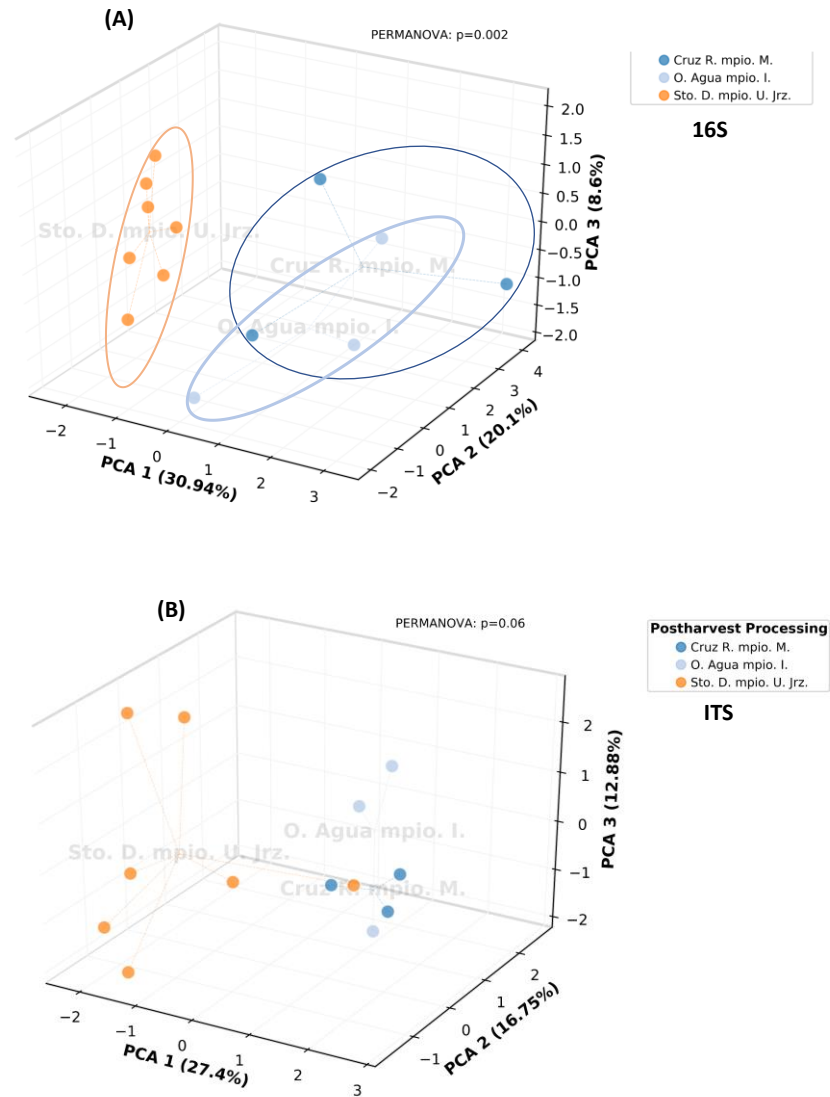


Figura 21. Gráfica tridimensional de PCA de la diversidad beta microbiana de las muestras de café analizadas. El gráfico se basa en las diferencias de Bray Curtis de las comunidades (A) bacterianas ($p \leq 0.05$) y (B) fúngicas (ITS) ($p \geq 0.05$). Las elipses muestran la agrupación aproximada de los conglomerados según el lugar de muestreo.

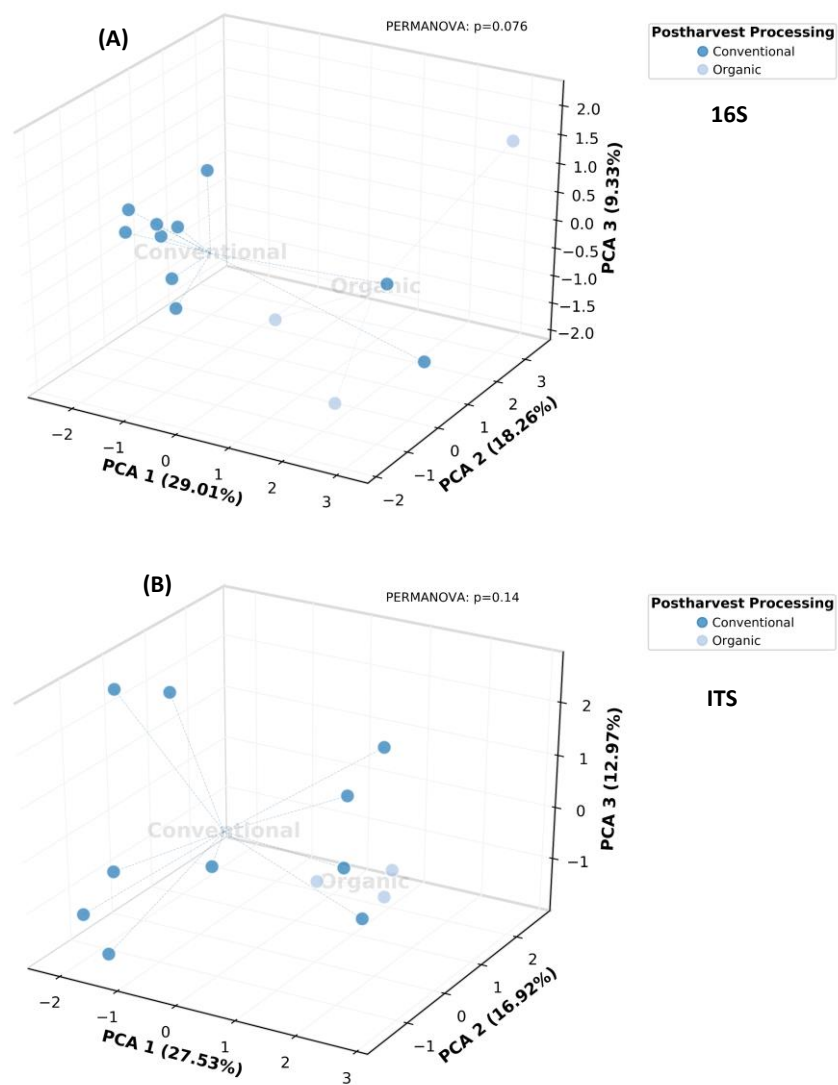


Figura 22. Gráfica tridimensional de PCA de la diversidad beta de las muestras de café analizadas. El gráfico se basa en las diferencias de Bray Curtis de las comunidades (A) bacterianas (16S) y (B) fúngicas (ITS). Las elipses muestran la agrupación aproximada de los conglomerados de las muestras según el tipo de cultivo ($p \geq 0.05$)

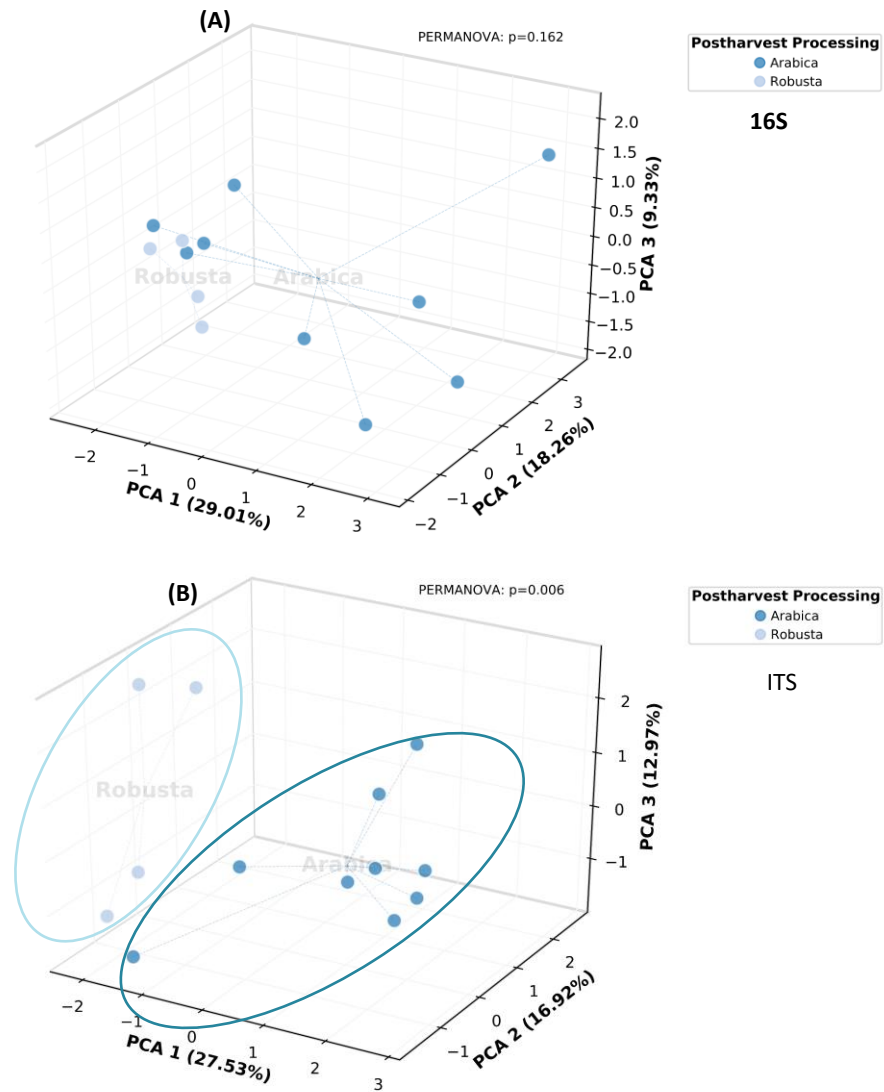


Figura 23. Gráfica tridimensional de PCA de la diversidad beta de las muestras de café analizadas. El gráfico se basa en las diferencias de Bray Curtis de las comunidades (A) bacterianas (16S) ($p \geq 0.05$) y (B) fúngicas (ITS) ($p \leq 0.05$). Las elipses muestran la agrupación aproximada de los conglomerados de las muestras según la variedad de café

7.12 OTA y Diversidad microbiana

La concentración de OTA en cada una de las muestras analizadas se presenta en la Tabla 14. Se observó que en el 92.3% de las muestras (12 de 13), las concentraciones de OTA fueron menores a 5 µg/kg, que es el límite máximo establecido por la Regulación Europea para el café verde o tostado (European-Commission, 2006). Solamente una de las muestras (coffee_07), equivalente al 7.7% del total de las muestras, presentó una concentración de OTA de 15.83 µg/kg. En general se observó que la concentración de OTA es baja. Este resultado es similar al reportado por Aguilar-Alvarez *et al.* (2021), para café de Chiapas-México. Otros estudios de café de Brasil reportan en un bajo porcentaje de muestras de cereza seca de café concentraciones de OTA > 0.5 µg/kg (Batista *et al.*, 2003; Moraes & Luchese, 2003; Taniwaki *et al.*, 2003), no obstante, también reportaron que en muestras de cereza fresca madura, mezclas (madura, verde y sobre madura) y defectuosa/flotante, las concentraciones de OTA fueron hasta de 50 µg/kg (Batista *et al.*, 2003).

La muestra Coffe_07 (15.83 µg/kg), corresponde a café de la variedad arábica, procesado por la vía seca con 15 días de secado, en esa muestra, el género *Penicillium*, específicamente *Penicillium ornatum* fue el de mayor abundancia. También se identificó *Lactobacillus* (1.8%) y las especies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pantheris*, *Lactobacillus vaccinostrictus* y *Lactobacillus thailandensis*. Se ha reportado que estas especies en particular *L. plantarum* presenta efectos antagónicos contra el desarrollo de hongos ocratoxigénicos e inhibe la producción de OTA (Djossou *et al.*, 2011a; Rodríguez- Serrano *et al.*, 2019).

Tabla 14. Concentración de OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en las muestras de café analizadas.

Clave	Característica de muestra de café				OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
	Variedad	Procesamiento	Tipo cultivo	Tiempo (días)	
Coffee_01	robusta	seco	Convencional	0	1.25
Coffee_02	robusta	seco	Convencional	3	0.7
Coffee_03	robusta	seco	Convencional	8	0.74
Coffee_04	robusta	seco	Convencional	10	3.11
Coffee_05	arábica	seco	Convencional	0	0.86
Coffee_06	arábica	seco	Convencional	6	0.7
Coffee_07	arábica	seco	Convencional	15	15.83
Coffee_08	arábica	húmedo	Orgánica	0	3.19
Coffee_09	arábica	húmedo	Orgánica	3	0.64
Coffee_10	arábica	húmedo	Orgánica	7	n.d (0.0)
Coffee_11	arábica	húmedo	Convencional	0	0.73
Coffee_12	arábica	húmedo	Convencional	3	n.d (0.0)
Coffee_13	arábica	húmedo	Convencional	7	0.59

*MUESTRA= R= Robusta convencional, A= arábica convencional, AG= arábica orgánica, C=arábica convencional. (El dígito a la izquierda el número consecutivo de la muestra, el dígito a la derecha el tiempo de secado)

También se encontró OTA en las demás muestras de café procesadas por la vía seca (cereza bola/seca) en concentraciones entre 0.7-3.11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de OTA. La muestra coffee_04 fue la de más alta concentración de OTA (3.11 $\mu\text{g}/\text{kg}$), y corresponde a un café robusta con 10 días de secado al sol. En esta muestra también predominó el género *Lactobacillus* (2.4%), *Weissella* (2.5%) y *Bacillus* (1%), y se encontraron levaduras abundantes como *Pichia* (21.8%) y *Meyerozyma* (49.6%). Y del género *Aspergillus* (4%) y *Penicillium* (0.7%), las especies identificadas fueron *Aspergillus brasiliensis* (3.27%), *Aspergillus fumigatus* (0.22%), *Aspergillus piperis* (0.18%), *Aspergillus ibericus* (0.33%) y *Penicillium georgiense* (0.67%). Aunque se encontró mayor diversidad de hongos filamentosos, no son ocratoxigénicos.

En las cerezas frescas se encontró OTA en un rango entre 0.73-3.19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de OTA, el mayor contenido de OTA se observó en la cereza orgánica (3.19 $\mu\text{g}/\text{kg}$). En todas las muestras de cereza fresca predominaron los géneros *Lactobacillus* y *Pichia*. El género

Aspergillus se identificó solamente en las cerezas coffee_01 y 05 en un bajo porcentaje (≤ 0.2). *Penicillium* fue identificado en las cerezas orgánica y convencional de arábica, coffee_08 y 11 con una abundancia de 5.4% y 0.13% respectivamente. La especie más abundante en estas muestras fue *Penicillium ornatum*.

En cuanto a los granos de café procesados por el método húmedo solamente se encontró OTA en las muestras de café orgánico de 3 días de secado (coffee_09) y de café convencional de 7 días de secado (coffee_13) con 0.65 y 0.59 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de OTA respectivamente. Entre estas dos muestras, la muestra coffee_13 presentó una mayor diversidad fúngica, se identificaron las especies *Aspergillus piperis* (19%), *Aspergillus pseudonomius* (16.75%), *Aspergillus brasiliensis* (2.44%), *Aspergillus sp.*, (0.93%), *Aspergillus wentii* (0.22%), *Aspergillus bombycis* (0.13%), y *Penicillium sp* (0.9%). De estas especies solamente *Aspergillus wentii* ha sido reportado tener potencial bajo ocratoxigénico (Varga *et al.*, 1996). En tanto en la muestra coffee_09 se encontró *Wickerhamomyces* (64.1%), *Pichia* (24.1%) *Hanseniaspora* (4.4%) y *Candida* (4.8%), principalmente y no se identificaron especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Respecto a la diversidad bacteriana predominó en la muestra de café orgánica una mayor variedad de bacterias entre ellas *Lactobacillus* (10.8%), *Leuconostoc* (17.3%), *Klebsiella* (26.3%), *Weissella* (12.2%), *Bacillus* (2%), *Enterococcus* (5.7%), principalmente y en la muestra coffee_13 se identificaron los géneros *Kosakonia* (48.5%) y *Weissella* (45.7%), principalmente. Solamente en las muestras coffee_10 y 12 no se detectó OTA aun cuando se identificaron los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* en ambas muestras y las especies *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus piperis*, *Aspergillus pseudonomius*, *Penicillium neocrassum*, *Penicillium sp.*

Estos resultados nos permiten deducir que, si encontramos OTA, existe una considerable probabilidad de la presencia de hongos ocratoxigénicos que la produjeron, no obstante, mediante el análisis de NGS de ITS no se detectó ninguna especie productora de OTA. Por lo que también puede sugerirnos que la abundancia de estos hongos fue muy baja en el momento del análisis por lo que no se hubieran identificado, o las condiciones de extracción en un punto de la muestra no reflejó la presencia de estos hongos filamentosos.

También, que la diversidad bacteriana y fúngica, durante el procesamiento seco o húmedo participaran como una manera natural de biocontrol en la inhibición del desarrollo de los hongos ocratoxigénicos y en la producción de la OTA. Diversos estudios han señalado que la presencia de algunas levaduras y bacterias lácticas como *Pichia fermentans*, *Sporobolomyces roseus*, *Candida*, *Lactobacillus brevis* (de Melo Pereira *et al.*, 2015a) presentan un efecto antagónico en el desarrollo de *Aspergillus westerdijkiae* presente en café. *Lactobacillus plantarum* también se ha estudiado y reportado su efecto antagónico en el desarrollo de *A. carbonarius* y la inhibición de producción de OTA (Djossou *et al.*, 2011; Rodríguez- Serrano *et al.*, 2019). Masoud & Kaltof (2006) comprobaron el efecto antagónico de *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri* y *Hanseniaspora uvarum* contra *Aspergillus ochraceus* y la producción de OTA. También se reportó que la mezcla de *P. anomala* y *S. cerevisiae* fue exitosa la inhibición y reducción de OTA de *P. verrucosum* (Petersson *et al.*, 1998). Similares estudios se han reportado para diferentes bacterias lácticas (Magnusson *et al.*, 2003; Schnürer & Magnusson, 2005).

El análisis de la presencia de OTA con las comunidades microbianas nos permite ver que la producción de OTA está sujeta a más factores durante los distintos procesamientos postcosecha.

Por una parte, las condiciones ambientales y la población microbiana que no favorezcan el desarrollo de hongos ocratoxigénicos y la producción de OTA. Por otra parte, si el grano de café fue colonizado por hongos ocratoxigénicos es necesario que prevalezcan condiciones adecuadas para la producción de OTA tales como a_w , humedad, temperatura, sustrato, interacciones entre la diversidad microbiana. Si las condiciones fueron favorables

puede ocurrir que no haya suficiente tiempo y/o nutrientes para la síntesis de la OTA (Batista *et al.*, 2009). También dependerá de la composición química del grano de café y compuestos como la cafeína, el ácido clorogénico que se han estudiado que actúan como una barrera natural en algunos hongos ocratoxigénicos susceptibles a estos compuestos (Chalfoun *et al.*, 2000).

Como se observó la OTA y especies ocratoxigénicas en este estudio no varió según el tipo de cultivo orgánico o convencional ya que en ambos se encontró OTA y la diversidad fúngica en las muestras fue uniforme. Esto coincide con Posone *et al.* (2007) que encontraron que las especies ocratoxigénicas de *Aspergillus* y las concentraciones de OTA en uvas cultivadas convencional y orgánicamente no se vieron influenciadas.

8. CONCLUSIONES

1. Este trabajo es el primer estudio de la prevalencia de ocratoxina A en café producido y comercializado en Chiapas, México.
2. El 97% del café analizado durante el ciclo 2017/18 que se produjo y comercializó en Chiapas, cumplió con la regulación europea ($\leq 5\mu\text{g}/\text{kg}$ de OTA).
3. El método de cultivo orgánico o convencional no fue un factor que determinara la presencia de OTA en el café. En tanto la variedad, el tipo de café (tostado o no tostado) y el procesamiento por el método seco o húmedo, sí influyeron en la presencia o ausencia de ocratoxina A.
4. El café procesado por el método seco y de la variedad robusta presentó mayores tendencias para encontrar la micotoxina, pero el nivel de OTA en el café robusta tostado fue significativamente menor que el robusta sin tostar.
5. El café soluble analizado fue el que tuvo niveles más altos de OTA comparado con el café de Chiapas, pero la concentración de la micotoxina fue menor al límite máximo de la regulación europea para este tipo de café ($\leq 10\mu\text{g}/\text{kg}$).
6. Los bajos niveles de OTA encontrados en el café pueden estar ligados a las buenas prácticas de cultivo y procesamiento, así como también a la microbiota presente en el café de Chiapas.
7. Por las bajas concentraciones de OTA presentes en el café de Chiapas es posible señalar que su consumo es adecuado en términos de salud y seguridad alimentaria y que presenta también características deseables para su exportación.
8. El aislamiento de hongos filamentosos por métodos dependientes de cultivo de las muestras de café de Chiapas permitió corroborar que el potencial ocratoxigénico de los hongos fue bajo. Solamente una de las cepas aisladas produjo concentraciones por arriba de la normatividad europea ($155.30\mu\text{g}$ de OTA por kg de medio de cultivo). Comparativamente con un hongo control ($7458.1\mu\text{g}$ de OTA por kg de medio de cultivo), la concentración de OTA producida por el hongo de Chiapas fue muy baja.

9. El aislamiento de bacterias de las muestras de café por métodos dependientes permitió observar la presencia con una mayor abundancia del género *Leuconostoc* además de *Lactobacillus* y algunas *Enterobacterias*.
10. Con el análisis NGS se identificó la diversidad microbiana: bacteriana y fúngica de las muestras de café analizadas y su relación con la ocratoxina presente. El 93% de las muestras analizadas presentaron valores por debajo de la regulación europea ($\leq 5\mu\text{g/kg}$).
11. Se identificaron hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. No se identificaron especies de hongos filamentosos reportados como ocratoxigénicos.
12. La especie más abundante del género *Penicillium* fue *P. ornatum*, se desconoce su potencial ocratoxigénico y es un hongo poco estudiado y es la primera vez que se identifica este hongo en el café de las variedades robusta y arábica y los distintos tipos de procesamiento.
13. Del género *Aspergillus* las especies identificadas en diferentes muestras fueron *A. brasiliensis*, *A. fumigatus*, *A. piperis*, *A. wentii*, *A. ibericus*, *A. aculeatus*, *A. pseudonomius*, *Aspergillus sp.* No se han reportado como especies ocratoxigénicas.
14. Los géneros *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Weissella* y *Pichia* fueron de los más abundantes y muchas de las especies identificadas presentan efectos antagónicos contra hongos filamentosos ocratoxigénicos y la producción de OTA como *Lactobacillus plantarum* y *Pichia sp.*
15. La diversidad alfa y beta en la población bacteriana fue diferente estadísticamente según el método de procesamiento y lugar de muestreo. En tanto para la población fúngica únicamente se encontraron diferencias en la diversidad beta según el tipo de variedad de café.
16. La población fúngica presentó una mayor uniformidad en cuanto a su diversidad de las especies y pudiera representar ubicuidad independiente del lugar y método de procesamiento.
17. La riqueza de la población bacteriana y fúngica conjuntamente con las interacciones durante los distintos procesamientos favorecieron la baja concentración de OTA en el café de Chiapas analizado mediante NGS.

9. PERSPECTIVAS

1. Aislar e identificar el hongo *Penicillium ornatum*, cuya abundancia fue la más alta en las muestras de café y analizar su potencial ocratoxigénico.
2. Estudiar bajo las mismas condiciones de este estudio, la diversidad microbiana en un nuevo ciclo cafetalero. Considerando, además, las variables de actividad de agua, humedad, temperatura, tiempos de fermentación y producción de metabolitos durante la sucesión de la fermentación.
3. Estudiar con mayor detenimiento el comportamiento de las comunidades fúngicas bajo las condiciones que prevalecen en Chiapas.
4. En la extracción de ADN genómico para el estudio de la diversidad microbiana, introducir un control positivo de hongos ocratoxigénicos en muestras de café.
5. Estudiar el efecto e interacciones de las bacterias lácticas y levaduras aisladas sobre el desarrollo y producción de OTA de hongos ocratoxigénicos.
6. Estudiar el uso de iniciadores de la fermentación con las bacterias y levaduras aisladas en los distintos métodos de procesamientos para obtener una taza de café con excelente calidad.

10. REFERENCIAS

- Aguilar-Alvarez, M. E., Saucedo-Castañeda, G., Durand, N., Perraud-Gaime, I., González-Robles, R. O., Rodríguez-Serrano. (2021). The variety, roasting, processing, and type of cultivation determine the low OTA levels of commercialized coffee in Chiapas State, Mexico. *Food Control*, 126, 108088. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108088>
- Ahsan, N., & Shimizu, M. (2021). Lysinibacillus species: Their potential as effective bioremediation, biostimulant, and biocontrol agents. *Reviews in Agricultural Science*, 9, 103–116. https://doi.org/10.7831/ras.9.0_103
- Alhawatem, M., Alqudah, A., & Tawaha, A.R.A. (2019). Application of Using DNA Barcoding Genes in Identification of Fungi Species, a Review. *Bioscience Research*, 16(2): 1763-1775
- Alvandia, D. G., & de Guzman, M. F. (2016). Survey of Philippine coffee beans for the presence of ochratoxigenic fungi. *Mycotoxin Research*, 32(2), 61–67. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0240-3>
- Amézqueta, S., Schorr-Galindo, S., Murillo-Arbizu, M., González-Peñas, E., López de Cerain, A., & Guiraud, J. P. (2012). OTA-producing fungi in foodstuffs: A review. *Food Control*, 26(2), 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.042>
- Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, J. M., Olguin, E., & Guiraud, J. P. (2001). Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. *Current Microbiology*, 42(4), 252–256. <https://doi.org/10.1007/s002840010213>
- Belkacem-Hanfi, N., Fhoula, I., Semmar, N., Guesmi, A., Perraud-Gaime, I., Ouzari, H., Boudabous, A., & Roussos, S.(2014). Lactic acid bacteria against post-harvest moulds and ochratoxin A isolated from stored wheat. *Biological Control*, 76, 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.05.001>.
- Balsega, A., & Gómez-Rodríguez, C. (2019). Diversidad alfa, beta y gamma: ¿cómo medimos diferencias entre comunidades biológicas? *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 26, 39–45.
- Barba, M., Czosnek, H., & Hadidi, A. (2013). Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses*, 6(1), 106–136. <https://doi.org/10.3390/v6010106>
- Barcelo, J. M., & Barcelo, R. C. (2018). Post-harvest practices linked with ochratoxin A contamination of coffee in three provinces of Cordillera Administrative Region, Philippines. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 35(2), 328–340. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1393109>
- Barcelo, J. M., Barcelo, R. C., & Alvarez, A. A. (2017). Ochratoxin A, fungal contamination and antioxidant property of defective Arabica coffee in Benguet, Philippines. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(1), 10–17. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-08-1118>
- Bastos, A. S. (2010). *Aislamiento e identificación de endofitos y epifitos en hojas de café colectadas en zonas de Costa Rica y su posible empleo como biocontroladores de Mycena citricolor*. Instituto del Café de Costa Rica.
- Batista, Chalfoun, S. M., Silva, C. F., Cirillo, M., Varga, E. V., & Schwan, R. F. (2009). Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. *Food Control*, 20, 784–790. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.10.003>
- Batista, L., Chalfoun de Souza, S., Silva e Batista, C., & Schwan, R. (2016). *Coffe: Types and Production*.

- Encyclopedia of Food and Health*, 244–251. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00184-7>
- Batista, L. R., Maria, C. S., Guilherme, P., Freitas, S. R., & E., W. A. (2003). Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). *International Journal of Food Microbiology*, 85(3), 293–300. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00539-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00539-1)
- Belguesmia, Y., Choiset, Y., Rabesona, H., Baudy-Floc'h, M., Le Blay, G., Haertlé, T., & Chobert, J. M. (2013). Antifungal properties of durancins isolated from *Enterococcus durans* A 5-11 and of its synthetic fragments. *Letters in applied microbiology*, 56(4), 237-244.
- Bengtsson, J., Ahnström, J., & Weibull, A. C. (2005). The effects of organic agriculture on biodiversity and abundance: A meta-analysis. *Journal of Applied Ecology*, 42(2), 261–269. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2005.01005.x>
- Benites, A. J., Fernandes, M., Boleto, A. R., Azevedo, S., Silva, S., & Leitão, A. L. (2017). Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples commercialized in Portugal. *Food Control*, 73, 1223–1228. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.037>
- Bolívar-Anillo, H. J., Contreras-Zentella, M. L., & Teherán-Sierra, L. G. (2016). Burkholderia tropica UNA BACTERIA CON GRAN POTENCIAL PARA SU USO EN LA AGRICULTURA. *Tip*, 19(2), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2016.06.003>
- Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Cabañ es, F.J., 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *Int. J. Food Microbiol.* 71, 139–144
- Buchanan, R. L., Tice, G., & Marino, D. (1982). Caffeine Inhibition of Ochratoxin A Production. *Journal of Food Science*, 47(1), 319–321. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1982.tb11089.x>
- Bucheli, P., Meyer, I., Pittet, A., Vuataz, G., & Viani, R. (1998). Industrial Storage of Green Robusta Coffee under Tropical Conditions and Its Impact on Raw Material Quality and Ochratoxin A Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(11), 4507–4511. <https://doi.org/10.1021/jf980468+>
- Bui-Klimke, T. R., & Wu, F. (2015). Ochratoxin A and Human Health Risk: A Review of the Evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(13), 1860–1869. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.724480>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME Journal*, 11(12), 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Cao, Y., Fanning, S., Proos, S., Jordan, K., & Srikumar, S. (2017). A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01829>
- Casal, S., Vieira, T., Cruz, R., & Cunha, S. C. (2014). Ochratoxin A in commercial soluble coffee and coffee substitutes. *Food Research International*, 61, 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.045>
- Castelán, C. J. J. (2019). “Evaluación De La Diversidad Y Dinámica Bacteriana Del Chorizo Tipo Español Durante Su Proceso De Maduración, Mediante Dgge Y Secuenciación Masiva.”
- Castellanos-Onorio, O. (2011). *Estudio de la estabilidad térmica de la ocratoxina A durante el tostado de café (Coffea arabica)*.

- Castellanos-Onorio, O., Gonzalez-Rios, O., Guyot, B., Fontana, T. A., Guiraud, J. P., Schorr-Galindo, S., Durand, N., & Suárez-Quiroz, M. (2011). Effect of two different roasting techniques on the Ochratoxin A (OTA) reduction in coffee beans (*Coffea arabica*). *Food Control*, 22(8), 1184–1188. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.014>
- Chalfoun, S. M., Pereira, ;, Batista, L. R., & Angélico, E. (2000). *Efeito Da Cafeína Sobre O Crescimento Micelial De Fungos Associados Ao Café E Produção De Toxinas Effect of Caffeine on Mycelial Growth of Fungi Associated With Coffee and Toxin Production. 1*, 1120–1125. http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb_anais/simposio2/doenca11.pdf
- Chauhan, P. S., Sharma, P., Puri, N., & Gupta, N. (2014a). A process for reduction in viscosity of coffee extract by enzymatic hydrolysis of mannan. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(7), 1459–1467. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1118-9>
- Chauhan, P. S., Sharma, P., Puri, N., & Gupta, N. (2014b). Purification and characterization of an alkali-thermostable β -mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11 and its application in mannoooligosaccharides preparation having prebiotic potential. *European Food Research and Technology*, 238(6), 927–936. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2170-7>
- Chen, C., Chen, X., Jiang, M., Rui, X., Li, W., & Dong, M. (2014). A newly discovered bacteriocin from *Weissella hellenica* D1501 associated with Chinese Dong fermented meat (Nanx Wudl). *Food Control*, 42, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.031>
- Cheong, E. Y., Sandhu, A., Jayabalan, J., Le, T. T. K., Nhiep, N. T., Ho, H. T. M., ... & Turner, M. S. (2014). Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control*, 46, 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.011>
- Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A., Bartkiene, E. (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread, *Food Control*, 31(2), 539-545. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.004>.
- Coda, R., Rizzello, C. G., Di Cagno, R., Trani, A., Cardinali, G., & Gobbetti, M. (2013). Antifungal activity of *Meyerozyma guilliermondii*: Identification of active compounds synthesized during dough fermentation and their effect on long-term storage of wheat bread. *Food Microbiology*, 33(2), 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.023>
- Codex alimentarius FAO-WHO. (2009). Código De Prácticas Para Prevenir Y Reducir La Contaminación Del Cafe Por Ocratoxina a. In *Codex Alimentarius*. http://www.fao.org/input/download/standards/11250/CXP_069s.pdf
- Comisión Europea. (2006). RECOMENDACIÓN DE LA COMISIÓN de 17 de agosto de 2006, sobre la prevención y la reducción de las toxinas de *Fusarium* en los cereales y los productos a base de cereales. *Diario Oficial de La Unión Europea*, L234(8), 1–6.
- Corso, M. P., Vignoli, J. A., & Benassi, M. D. T. (2016). *Development of an instant coffee enriched with chlorogenic acids*. 2(Itc 2011). <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2163-y>
- Culliao, A. G. L., & Barcelo, J. M. (2015). Fungal and mycotoxin contamination of coffee beans in Benguet province, Philippines. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 32(2), 250–260. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.1001796>

- Dalié, D.K.D., Deschamps, A.M., & Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria- Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21: 370-380.
- de Almeida, Â. B., Corrêa, I. P., Furuie, J. L., de Farias Pires, T., do Rocio Dalzoto, P., & Pimentel, I. C. (2019). Inhibition of growth and ochratoxin A production in *Aspergillus* species by fungi isolated from coffee beans. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(4), 1091–1098. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00152-9>
- De Bruyn, F., Zhang, S. J., Pothakos, V., Torres, J., Lambot, C., Moroni, A. V., Callanan, M., Sybesma, W., Weckx, S., & De Vuysta, L. (2017). Exploring the Impacts of Postharvest Processing on the Microbiota and. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(1), 1–16.
- de Carvalho Neto, D. P., de Melo Pereira, G. V., de Carvalho, J. C., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2018). High-throughput rRNA gene sequencing reveals high and complex bacterial diversity associated with brazilian coffee bean fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), 90–95. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5441>
- de Carvalho Neto, D. P., de Melo Pereira, G. V., Tanobe, V. O. A., Soccol, V. T., da Silva, B. J. G., Rodrigues, C., & Soccol, C. R. (2017). Yeast diversity and physicochemical characteristics associated with coffee bean fermentation from the Brazilian Cerrado Mineiro region. *Fermentation*, 3(1). <https://doi.org/10.3390/fermentation3010011>
- de Melo Pereira, G. V., Neto, E., Soccol, V. T., Medeiros, A. B. P., Woiciechowski, A. L., & Soccol, C. R. (2015b). Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. *Food Research International*, 75, 348–356. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.027>
- de Melo Pereira, G. V., Soccol, V. T., Pandey, A., Medeiros, A. B. P., Andrade Lara, J. M. R., Gollo, A. L., & Soccol, C. R. (2014). Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.008>
- de Melo Pereira, G. V., de Carvalho Neto, D. P., Magalhães Júnior, A. I., Vásquez, Z. S., Medeiros, A. B. P., Vandenberghe, L. P. S., & Soccol, C. R. (2019). Exploring the impacts of postharvest processing on the aroma formation of coffee beans – A review. *Food Chemistry*, 272(August 2018), 441–452. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.061>
- de Melo Pereira, G. V., Beux, M., Pagnoncelli, M. G. B. G. B. B., Soccol, V. T. T., Rodrigues, C., & Soccol, C. R. R. (2015a). Isolation, selection and evaluation of antagonistic yeasts and lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae* on coffee beans. *Letters in Applied Microbiology*, 62(1), 96–101. <https://doi.org/10.1111/lam.12520>
- de Melo Pereira, G., Soccol, V. T., Brar, S. K., Neto, E., & Soccol, C. R. (2017). Microbial ecology and starter culture technology in coffee processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2775–2788. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1067759>
- de Oliveira Junqueira, A. C., de Melo Pereira, G. V., Coral Medina, J. D., Alvear, M. C. R., Rosero, R., de Carvalho Neto, D. P., Enríquez, H. G., & Soccol, C. R. (2019). First description of bacterial and fungal communities in Colombian coffee beans fermentation analysed using Illumina-based amplicon sequencing. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45002-8>

- Djossou, O., Perraud-Gaime, I., Lakhel Mirleau, F., Rodriguez-Serrano, G., Karou, G., Niamke, S., Ouzari, I., Boudabous, A., & Roussos, S. (2011). Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. *Anaerobe*, 17(6), 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.03.006>
- Djossou, O., Russos, S., Perraud-Gaime, I., Hervé, M., Karou, G., & Labrousse, Y. (2015). Fungal population, including Ochratoxin A producing *Aspergillus* section *Nigri* strains from Ivory Coast coffee bean. *African Journal of Agricultural Research*, 10(26), 2576–2589. <https://doi.org/10.5897/AJAR2015.9494>
- Dogi, C.A., Fochesato, A., Pribull, R., de Souza, M.M.S., da Silva Coelho, I., Araujo de Melo, D., Dalcerro, A., & Cavaglieri, L. (2013). Selection of lactic acid bacteria to promote an efficient silage fermentation capable of inhibiting the activity of *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium graminearum* and mycotoxin production. *Journal of Applied Microbiology*, 114, 1650-1660. <http://doi.org/10.1111/jam.12173>
- Dundray, V., & Pacin, A. (2013). Occurrence of Ochratoxin A in coffee beans, ground roasted coffee and soluble coffee and method validation. *Food Control*, 30(2), 675–678. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.004>
- Durand, N. (2012). Dynamique des populations microbiennes au cours du traitement post récolte du café et relations interspécifiques entre souches ochratoxinogènes. Université de Montpellier 2: Thèse de doctorat, biotechnologie, microbiologie. [Dynamics of microbial populations during post-harvest coffee processing and interspecific relationships between ochratoxinogenic strains]. University of Montpellier 2: PhD thesis. Biotechnology, Microbiology. Website visited on March 10 https://agritrop.cirad.fr/567930/1/document_567930.pdf
- Durand, N., El Sheikha, A. F., Suarez-Quiros, M. L., Oscar, G. R., Nganou, N. D., Fontana-Tachon, A., & Montet, D. (2013). Application of PCR-DGGE to the study of dynamics and biodiversity of yeasts and potentially OTA producing fungi during coffee processing. *Food Control*, 34(2), 466–471. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.05.017>
- Duris, D., Mburu, J. K., Durand, N., Clarke, R., Frank, J. M., & Guyot, B. (2010). Ochratoxin A contamination of coffee batches from Kenya in relation to cultivation methods and post-harvest processing treatments. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 27(6), 836–841. <https://doi.org/10.1080/19440040903571770>
- European-Commission. (2006). *Reglamento CE N°1881/2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios*. Diario Oficial de La Unión Europea. <https://www.boe.es/doue/2006/364/L00005-00024.pdf>
- Evangelista, S. R., Miguel, M. G. da C. P., Silva, C. F., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F. (2015). Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.008>
- Ewing, B., LaDeana, H., Wendl, M. C., & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Research*, 8(3), 175–185. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.186>
- Fabiana, A. C., Sara, C. de S., Mnica, C. P. M., Daiani, M. da S., Marcelo, ngelo C., & and, L. R. B. (2014). Diversity and association of filamentous fungi in coffee beans under organic and conventional cultivation. *African Journal of Microbiology Research*, 8(26), 2505–2512. <https://doi.org/10.5897/ajmr2013.6571>
- FAO. (2006a). *Enhancement of Coffee Quality through the Prevention of Mould Formation Final Management Report*.

- FAO. (2006b). *Guidelines for the Prevention of Mould Formation in Coffee*. http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/coffee/guidelines_final_en.pdf
- FAO - ONU. (2004). Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones. In *Estudio FAO. Alimentación y Nutrición*. <https://www.fao.org/publications/card/es/c/3ffa95ab-07a1-568c-bca0-5051fa6d9bae/>
- FAOSTAT. (2020). *FAOSTAT*. FAO Food and Nutrition Paper. <https://www.fao.org/faostat/en/#data>
- Feng, X., Dong, H., Yang, P., Yang, R., Lu, J., Lv, J., & Sheng, J. (2016). Culture-Dependent and -Independent Methods to Investigate the Predominant Microorganisms Associated with Wet Processed Coffee. *Current Microbiology*, 73(2), 190–195. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1047-3>
- FIRA. (2017). Panorama Agroalimentario. Café 2017. Febrero 3 2021, de Fideicomisos instituidos en relación con la agricultura Sitio web: <https://www.fira.gob.mx/InfEspDtoXML/abrirArchivo.jsp?abreArc=68637>
- FIRA. (2019). Panorama Agroalimentario. Café 2019. <https://www.inforural.com.mx/wp-content/uploads/2020/03/Panorama-Agroalimentario-Café-2019.pdf>
- Frisvad, J. C., Frank, J. M., Houbraeken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A., & Samson, R. A. (2004). New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology*, 50(1), 23–43.
- Galarce-Bustos, O., Alvarado, M., Vega, M., & Aranda, M. (2014). Occurrence of ochratoxin A in roasted and instant coffees in Chilean market. *Food Control*, 46, 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.014>
- Garrido-Ramírez, E. R. (2018). Identificación de hongos y micotoxinas asociadas a granos de café en Chiapas, México. *Agro Productividad*, 11(12). <https://doi.org/10.32854/agrop.v11i12.1307>
- Ghosh, A., & Bhadury, P. (2019). Methods of Assessment of Microbial Diversity in Natural Environments. In *Microbial Diversity in the Genomic Era*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00001-0>
- Gil-Serna, J., González-Salgado, A., González-Jaén, M. T., Vázquez, C., & Patiño, B. (2009). ITS-based detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* in grapes and green coffee beans by real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2–3), 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.008>
- Gil-Serna, J., Patiño, B., Cortes, L., Gonzalez-Jaen, M. T., & Vazquez, C. (2015). *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* as potential risk of OTA contamination in food products in warm climates. *Food Microbiology*, 46, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.013>
- Gil-Serna, J., Patiño, B., Cortés, L., González-Jaén, M. T., & Vázquez, C. (2011). Mechanisms involved in reduction of ochratoxin A produced by *Aspergillus westerdijkiae* using *Debaryomyces hansenii* CYC 1244. *International Journal of Food Microbiology*, 151(1), 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.012>
- Gopinandhan, T. N., Velmourougane, K., Panneerselvam, P., Keshamma, E., & Raghuramulu, Y. (2007). Occurrence of ochratoxin-A (OT-A) in green and commercial coffee samples. *Journal of Food Science and Technology*, 44(3), 247–249.

- Gupta, R., & Srivastava, S. (2014). Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. *Food Microbiology*, 42, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.005>
- Gürtler, V., Subrahmanyam, G., Shekar, M., Maiti, B., & Karunasagar, I. (2014). Chapter 12- Bacterial Typing and Identification By Genomic Analysis of 16S–23S rRNA Intergenic Transcribed Spacer (ITS) Sequences. In *Methods in Microbiology*, Vol. 41, 253-274. Editor(s): Goodfellow, M., Sutcliffe, I., & Chun, J. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2014.07.004>
- Gutiérrez-Rodríguez, E. K. (2019). *Caracterización de comunidades microbianas asociadas a cerezas frescas y secas de café de la región de Tabasco mediante métodos dependientes e independientes del cultivo*.
- Haegeman, B., Hamelin, J., Moriarty, J., Neal, P., Dushoff, J., & Weitz, J. S. (2013). Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. In *ISME Journal* (Vol. 7, Issue 6, pp. 1092–1101). <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.10>
- Haile, M., & Kang, W. H. (2019). The Role of Microbes in Coffee Fermentation and Their Impact on Coffee Quality. In *Journal of Food Quality* (Vol. 2019). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/4836709>
- Hamdouche, Y., Christophe, J., Nad, D., Teyssier, C., & Montet, D. (2016). *Discrimination of post-harvest coffee processing methods by microbial ecology analyses*. 65, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.022>
- Handelsman, J. (2005). Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(1), 195–195. <https://doi.org/10.1128/mubr.69.1.195.2005>
- Hashimi, I., Bindschedler, S., & Junier, P. (2020). Chapter 18. Firmicutes. En *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*(363-396). United Kingdom: Elsevier, Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00018-6>
- Heussner, A. H., & Bingle, L. E. H. (2015). Comparative ochratoxin toxicity: A review of the available data. *Toxins*, 7(10), 4253–4282. <https://doi.org/10.3390/toxins7104253>
- Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., Wang, X. C., Meijer, M., Kraak, B., Hubka, V., Bensch, K., Samson, R. A., & Frisvad, J. C. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology*, 95, 5–169. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>
- Houbraken, J., & Samson, R. A. (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology*, 70, 1–51. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.70.01>
- Huch, M., & Franz, C. M. A. P. (2014). Coffee: Fermentation and microbiota. In *Advances in Fermented Foods and Beverages: Improving Quality, Technologies and Health Benefits*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-015-6.00021-9>
- IARC. (2002). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. In *IARC Press* (Vol. 82). <https://doi.org/10.1002/food.19940380335>
- ICO. (2020). The value of coffee: Sustainability, Inclusiveness and Resilience of the Coffee Global Value Chain. *International Coffee Organization*, 108.

- ICO, & Organization, I. C. (2019). *ICO Coffee Development Report 2019 Overview* (Issue September). <http://www.ico.org/documents/cy2018-19/ed-2318e-overview-flagship-report.pdf>
- Illumina. (2010). Illumina Sequencing Technology. Noviembre 29, 2021, de Illumina, Inc. Sitio web: https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf
- INEGI. (2020). *Geografía y Medio Ambiente*. <https://www.inegi.org.mx/temas/climatologia/>
- Inés, G., Quintero, P., Javier., Mejía, M., Gabriel, ;, & Osorio Betancur, A. (2012). Microbiología De La Fermentación Del Mucílago De Café Según Su Madurez Y Selección. *Cenicafé*, 63(2), 58–78. <http://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/536>
- Jan-Roblero, J., Cruz-Maya, J. A., & Barajas, C. G. (2020). Kosakonia. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, 213–231. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823414-3.00012-5>
- Kergourlay, G., Taminiau, B., Daube, G., & Champomier Vergès, M. C. (2015). Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. *International Journal of Food Microbiology*, 213, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.010>
- Khaneghah, A. M., Fakhri, Y., Abdi, L., Coppa, C. F. S. C., Franco, L. T., & de Oliveira, C. A. F. (2019). The concentration and prevalence of ochratoxin A in coffee and coffee-based products: A global systematic review, meta-analysis and meta-regression. *Fungal Biology*, 123(8), 611–617. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.05.012>
- Kim, B. R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K. H., Lee, J. H., Kim, H. B., & Isaacson, R. E. (2017). Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), 2089–2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>
- Kivanc, M., Yilmaz, M., Çakir, E., 2011. Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains. *Turkish J. Biol.* 35, 313-324.
- Koh, W. Y., Utra, U., Ahmad, R., Rather, I. A., & Park, Y. H. (2018). Evaluation of probiótico potential and anti-hyperglycemic properties of a novel *Lactobacillus* strain isolated from water kefir grains. *Food Science and Biotechnology*, 27(5), 1369–1376. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0360-y>
- Kószegi, T., & Poór, M. (2016). Ochratoxin a: Molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins*, 8(4), 1–25. <https://doi.org/10.3390/toxins8040111>
- Krechel, A., Faupel, A., Hallmann, J., Ulrich, A., & Berg, G. (2002). Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(9), 772–786. <https://doi.org/10.1139/w02-071>
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J., & Basehoar-Powers, E. (2008). Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Research*, 8(6), 939–954. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00419.x>
- Lappa, I. K., Mparampouti, S., Lanza, B., & Panagou, E. Z. (2018). Control of *Aspergillus carbonarius* in grape berries by *Lactobacillus plantarum*: A phenotypic and gene transcription study. *International Journal of Food Microbiology*, 275, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.001>

- Lee, T. P., Saad, B., Khayoon, W. S., & Salleh, B. (2012a). Molecularly imprinted polymer as sorbent in micro-solid phase extraction of ochratoxin A in coffee, grape juice and urine. *Talanta*, 88, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.10.021>
- Lee, T. P., Saad, B., Ng, E. P., & Salleh, B. (2012b). Zeolite Linde Type L as micro-solid phase extraction sorbent for the high performance liquid chromatography determination of ochratoxin A in coffee and cereal. *Journal of Chromatography A*, 1237, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.031>
- Lee, L. W., Cheong, M. W., Curran, P., Yu, B., & Liu, S. Q. (2016). Modulation of coffee aroma via the fermentation of green coffee beans with *Rhizopus oligosporus*: II. Effects of different roast levels. *Food Chemistry*, 211, 925–936. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.073>
- Leong, K. H., Chen, Y. S., Pan, S. F., Chen, J. J., Wu, H. C., Chang, Y. C., & Yanagida, F. (2014). Diversity of lactic acid bacteria associated with fresh coffee cherries in taiwan. *Current Microbiology*, 68(4), 440–447. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0495-2>
- Leong, S. L., Hien, L. T., An, T. V., Trang, N. T., Hocking, A. D., & Scott, E. S. (2007). Ochratoxin A-producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans. *Letters in Applied Microbiology*, 45(3), 301–306. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02189.x>
- Levi CP, Trenk HL, Mohr HK. (1974). Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. *J Assoc Off Anal Chem*. 57(4):866-70. PMID: 4425430.
- Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., & Coton, E. (2017). Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review. *Microorganisms*, 5(3), 37. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030037>
- Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). MINIREVIEW Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1875–1883. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1875>
- López-García, F. J., Escamilla-Prado, E., Zamarripa-Colmenero, A., & Guillermo, C.-C. J. (2016). Producción y calidad en variedades de café (*Coffea arabica* L.) en Veracruz, México. *Rev. Fitotec. Mex*, 39(3), 297–304.
- Lozano, L. C., & Dussán, J. (2013). Metal tolerance and larvicidal activity of *Lysinibacillus sphaericus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(8), 1383–1389. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1301-9>
- Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J., & Schnürer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 219(1), 129–135. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01207-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01207-7)
- Mahendra Rai, A. V. (2010). Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons. In *Springer*.
- Mallet, S., Weiss, S., Jacques, N., Leh-Louis, V., Sacerdot, C., & Casaregola, S. (2012). Insights into the life cycle of yeasts from the CTG clade revealed by the analysis of the *Millerozyma* (*Pichia*) *farinosa* species complex. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035842>
- Mariño-Cárdenas, Y. (2007). Identificación de bacterias en cicadélidos vectores potenciales de *Xylella fastidiosa* que se alimentan del tejido vascular de plantas de café. In *Universidad De Puerto Rico Recinto Universitario De Mayagüez* (Issue January).

- Marizzoni, M., Gurry, T., Provasi, S., Greub, G., Lopizzo, N., Ribaldi, F., Festari, C., Mazzelli, M., Mombelli, E., Salvatore, M., Mirabelli, P., Franzese, M., Soricelli, A., Frisoni, G. B., & Cattaneo, A. (2020). Comparison of Bioinformatics Pipelines and Operating Systems for the Analyses of 16S rRNA Gene Amplicon Sequences in Human Fecal Samples. *Frontiers in Microbiology*, 11(June). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01262>
- Masoud, W., Cesar, L. B., Jespersen, L., & Jakobsen, M. (2004). Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast*, 21(7), 549–556. <https://doi.org/10.1002/yea.1124>
- Masoud, W., & Kalsoft, C. H. (2006). The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.015>
- Moraes, M. H., & Luchese, R. H. (2003). Ochratoxin A on green coffee: Influence of harvest and drying processing procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(19), 5824–5828. <https://doi.org/10.1021/jf026248k>
- Moreno, C. (2001). *Métodos para medir la biodiversidad, edición electrónica*. (O.-U.-S. CYTED (ed.); Primera Ed, Issue June).
- Nasanit, R., & Satyawut, K. (2015). Microbiological study during coffee fermentation of *Coffea arabica* var. chiangmai 80 in Thailand. *Kasetsart Journal - Natural Science*, 49(1), 32–41.
- Naureen, Z., Ur Rehman, N., Hussain, H., Hussain, J., Gilani, S. A., Al Housni, S. K., Mabood, F., Khan, A. L., Farooq, S., Abbas, G., & Harrasi, A. A. (2017). Exploring the potentials of *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 for plant growth promotion and biocontrol activities against phytopathogenic fungi. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01477>
- Ndagano, D., Lamoureux, T., Dortu, C., Vandermoten, S., & Thonart, P. (2011). Antifungal Activity of 2 Lactic Acid Bacteria of the *Weissella* Genus Isolated from Food. *Journal of Food Science*, 76(6). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02257.x>
- Nielsen, K. F., Mogensen, J. M., Johansen, M., Larsen, T. O., & Frisvad, J. C. (2009). Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Anal Bioanal Chem*, 395(1), 1225–1242. <https://doi.org/10.1128/AEM.02635-18>
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2008). Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.005>
- Nudrat, H. S., & Debajit, T. (2020). Chapter 21. Actinobacteria. En *Beneficial Microbes in Agro-Ecology. Bacteria and Fungi*. pp. 443–476. (A. S. N. Amaresan, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, Krishna Kumar (ed.); 1st edition). Elsevier.
- Oliveira, P. M., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2014). Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. *Food Microbiology*, 37, 78–95. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.003>
- Pardo, E., Marín, S., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2004). Occurrence of Ochratoxigenic Fungi and Ochratoxin

- A in Green Coffee from Different Origins. *Food Science and Technology International*, 10(1), 45–49. <https://doi.org/10.1177/1082013204041509>
- Paterson, R. R. M., Lima, N., & Taniwaki, M. H. (2014). Coffee, mycotoxins and climate change. *Food Research International*, 61, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.037>
- Pereira, G. V. de M., de Carvalho Neto, D. P., Medeiros, A. B. P., Soccol, V. T., Neto, E., Woiciechowski, A. L., & Soccol, C. R. (2016). Potential of lactic acid bacteria to improve the fermentation and quality of coffee during on-farm processing. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(7), 1689–1695. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13142>
- Petersson, S., Hansen, M. W., Axberg, K., Hult, K., & Schnürer, J. (1998). Ochratoxin A accumulation in cultures of *Penicillium verrucosum* with the antagonistic yeast *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycological Research*, 102(8), 1003–1008. <https://doi.org/10.1017/S0953756297006047>
- Piotrowska, M., & Zakowska, Z. (2005). The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria strains. *Polish Journal of Microbiology*, 54(4), 279–286.
- Pitt, J. I., Taniwaki, M. H., & Cole, M. B. (2013). Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives. *Food Control*, 32(1), 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.023>
- Ponsone, M.L., Combina, M., Dalcero, A., Chulze, S., (2007). Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinian wine grapes under organic and nonorganic systems. *International Journal of Food Microbiology* 114, 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.001>
- Poř, M., Kunsági-Máté, S., Czibulya, Z., Li, Y., Peles-Lemli, B., Petrik, J., Vladimir-Knežević, S., & Koszegi, T. (2013). Fluorescence spectroscopic investigation of competitive interactions between ochratoxin A and 13 drug molecules for binding to human serum albumin. *Luminescence*, 28(5), 726–733. <https://doi.org/10.1002/bio.2423>
- Porras-Alfaro, A., Liu, K. L., Kuske, C. R., & Xiec, G. (2014). From genus to phylum: Large-subunit and internal transcribed spacer rRNA operon regions show similar classification accuracies influenced by database composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(3), 829–840. <https://doi.org/10.1128/AEM.02894-13>
- Reis, S., Gabriela, M., Miguel, P., Ferreira, C., Carla, A., Pinheiro, M., Freitas, R., Evangelista, S. R., Miguel, M. G. da C. P., Silva, C. F., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F. (2015). Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.008>
- Rezende, E. de F., Borges, J. G., Cirillo, M. Â., Prado, G., Paiva, L. C., & Batista, L. R. (2013). Ochratoxigenic fungi associated with green coffee beans (*Coffea arabica* L.) in conventional and organic cultivation in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 377–384. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200006>
- Ribeiro, L. S., da Cruz Pedrozo Miguel, M. G., Martinez, S. J., Bressani, A. P. P., Evangelista, S. R., Silva e Batista, C. F., & Schwan, R. F. (2020). The use of mesophilic and lactic acid bacteria strains as starter cultures for improvement of coffee beans wet fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(12), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02963-7>
- Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y. J., & Larondelle, Y. (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions*, 159(1), 18–46.

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.10.106>

- Rodríguez-Serrano, G., Fernández-Soto, R., Escalona-Buendía, H., Perraud-Gaime, I., Fernández-Perrino, F., & Champion-Martínez, I. (2019). Utilization of lactic acid bacteria for *Aspergillus carbonarius* biocontrol. *NHBT*.
- Romani, S., Sacchetti, G., Lopez, C. C., Pinnavaia, G. G., & Rosa, M. D. (2000). Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3616–3619. <https://doi.org/10.1021/jf990783b>
- Ruellan, C. (2017). Biocontrol de la flore fongique toxigène du café. Tesis de licenciatura. UMR QualiSud, CIRAD Montpellier, Francia.
- SADER-SIAP. (2020). Panorama Agroalimentario 2020. Marzo 20, 2022, de Secretaria de desarrollo Rural. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera Sitio web: <https://www.inforural.com.mx/wp-content/uploads/2020/11/Atlas-Agroalimentario-2020.pdf>
- Sakiyama, N.S., & Gava, F.M.A. (2015). Botany of production of coffee. En *Cocoa and Coffee fermentations* (341-365). EUA: Taylor & Francis Group.
- Schnürer, J., & Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 16(1–3), 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.014>
- Schrenk, D., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L., Leblanc, J. C., Nebbia, C. S., Nielsen, E., Ntzani, E., Petersen, A., Sand, S., Schwerdtle, T., Vlemminckx, C., Wallace, H., Alexander, J., Dall’Asta, C., Mally, A., ... Bignami, M. (2020). Risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA Journal*, 18(5). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6113>
- Sellstedt, A., & Richau, K. H. (2013). Aspects of nitrogen-fixing actinobacteria, in particular free-living and symbiotic frankia. *FEMS Microbiology Letters*, 342(2), 179–186. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12116>
- Shemekite, F., Gómez-Brandón, M., Franke-Whittle, I. H., Praehauser, B., Insam, H., & Assefa, F. (2014). Coffee husk composting: An investigation of the process using molecular and non-molecular tools. *Waste Management*, 34(3), 642–652. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.11.010>
- Silva, C. F., Batista, L. R., Abreu, L. M., Dias, E. S., & Schwan, R. F. (2008a). Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food Microbiology*, 25(8), 951–957. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.07.003>
- Silva, C. F., Batista, L. R., & Schwan, R. F. (2008b). Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3), 521–526. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000300022>
- Silva, D. M., Batista, L. R., Rezende, E. F., Fungaro, M. H. P., Sartori, D., & Alves, E. (2011). Identification of fungi of the genus *aspergillus* section *nigri* using polyphasic taxonomy. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2), 761–773. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000200044>
- Silva, F., Schwan, R. F., Sousa Dias, E., & Wheals, A. E. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2–3), 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00315-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00315-9)

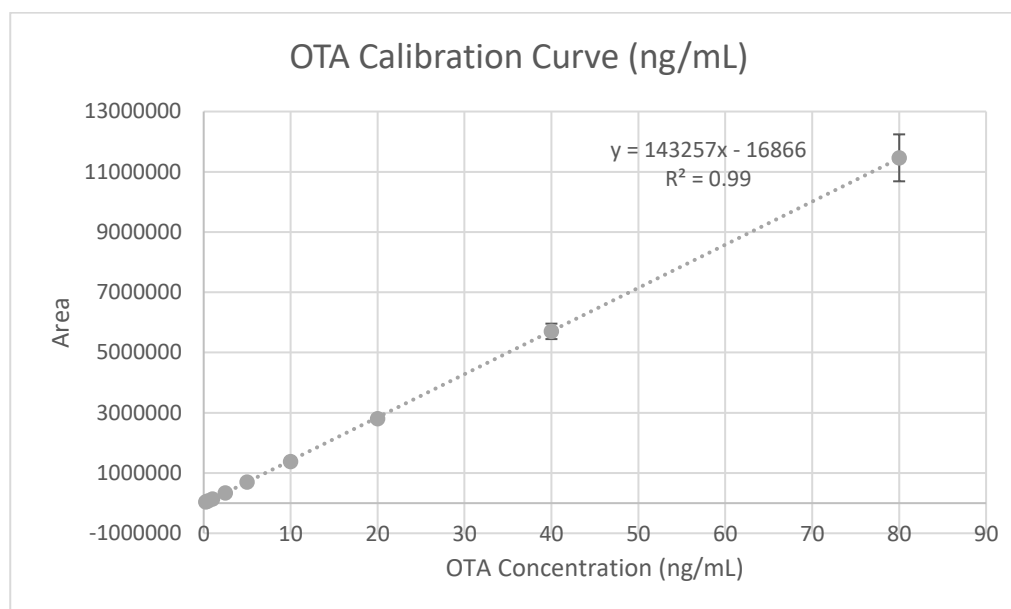
- Steinberg, J. P., & Burd, E. M. (2014). Other Gram-Negative and Gram-Variable Bacilli. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (Eighth Edi, Vol. 2). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00238-1>
- Stephan, R., Grim, C. J., Gopinath, G. R., Mammel, M. K., Sathyamoorthy, V., Trach, L. H., Chase, H. R., Fanning, S., & Tall, B. D. (2014). Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris* and *Enterobacter turicensis* as members of the genus *Cronobacter* and their reclassification in the genera *Franconibacter* gen. nov. and *Siccibacter* gen. nov. as *Francon*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *64*, 3402–3410. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.059832-0>
- Suárez-Quiroz, M., De Louise, B., Gonzalez-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., & Guiraud, J. P. (2005). The impact of roasting on the ochratoxin a content of coffee. *International Journal of Food Science and Technology*, *40*(6), 605–611. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00958.x>
- Suárez-Quiroz, M., González-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., & Guiraud, J. P. (2004). Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. *International Journal of Food Science and Technology*, *39*(5), 501–507. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00810.x>
- Swingland, I. R. (2013). Biodiversity, Definition of. *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition, November*, 399–410. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00009-5>
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Teixeira, A. A., & Iamanaka, B. T. (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology*, *82*(2), 173–179. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00310-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00310-0)
- Tatsadjieu, L.N., Tchikoua, R., Funtong, M.C.M.(2016).Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria against Molds Isolated from Corn and Fermented Corn Paste. *American Journal of Microbiological Research*, *4*(4) 90-100. DOI:10.12691/ajmr-4-4-1
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2004). Screening of lactic-acid bacteria from South African barley beer for the production of bacteriocin-like compounds. *Folia Microbiologica*, *49*(4), 406–410. <https://doi.org/10.1007/bf02931601>
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2005). *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, *36*(2–3), 318–326. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.09.009>
- Tuck, S. L., Winqvist, C., Mota, F., Ahnström, J., Turnbull, L. A., & Bengtsson, J. (2014). Land-use intensity and the effects of organic farming on biodiversity: A hierarchical meta-analysis. *Journal of Applied Ecology*, *51*(3), 746–755. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12219>
- Urbano, G. R., Taniwaki, M. H., Leitão, M. F., & Vicentini, M. C. (2001). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. *Journal of Food Protection*, *64*(8), 1226–1230.
- van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Merwe, van der, K.J., S. P. S., & Fourie, L. (1965). Ochratoxin A, a Toxic Metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, *205*(4976), 1112–1113.
- Varga, J., Kevei, E., Rinyu, E., Teren, J., & Kozakiewicz, Z. (1996). Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Appl Environ Microbiol*, *62*(12), 4461–4464.
- Varga, J., Péteri, Z., Tábori, K., Téren, J., & Vágvölgyi, C. (2005). Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, *99*(3), 321–328.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.034>

- Varsha, K. K., & Priya, S. (2014). *Control of Spoilage Fungi by Protective Lactic Acid Bacteria Displaying Probiotic Properties*. 3402–3413. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0779-4>
- Vidal, A., Sanchis, V., Ramos, A. J., & Marín, S. (2015). Thermal stability and kinetics of degradation of deoxynivalenol, deoxynivalenol conjugates and ochratoxin A during baking of wheat bakery products. *Food Chemistry*, 178, 276–286. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.098>
- Vilela, D. M., Pereira, G. V. de M., Silva, C. F., Batista, L. R., & Schwan, R. F. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology*, 27(8), 1128–1135. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.024>
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T., & Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78(1), 343–371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Waters, D. M., Arendt, E. K., & Moroni, A. V. (2017). Overview on the mechanisms of coffee germination and fermentation and their significance for coffee and coffee beverage quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(2), 259–274. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.902804>
- Whittaker, R. H. (1972). Evolution and Measurement of Species Diversity. *Taxon*, 21(2), 213–251.
- Yago, J. I., & Chung, K. R. (2011). First Report of Twig Blight Disease of Citrus Caused by *Haematonectria haematococca* in the Philippines. *Plant Disease*, 95(12), 1590-1590.
- Zhang, S. J., De Bruyn, F., Pothakos, V., Torres, J., Falconi, C., Moccand, C., Weckx, S., & De Vuyst, L. (2019). Following coffee production from cherries to cup: Microbiological and metabolomic analysis of wet processing of *Coffea arabica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(6), 1–22. <https://doi.org/10.1128/AEM.02635-18>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O’toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración de la OTA



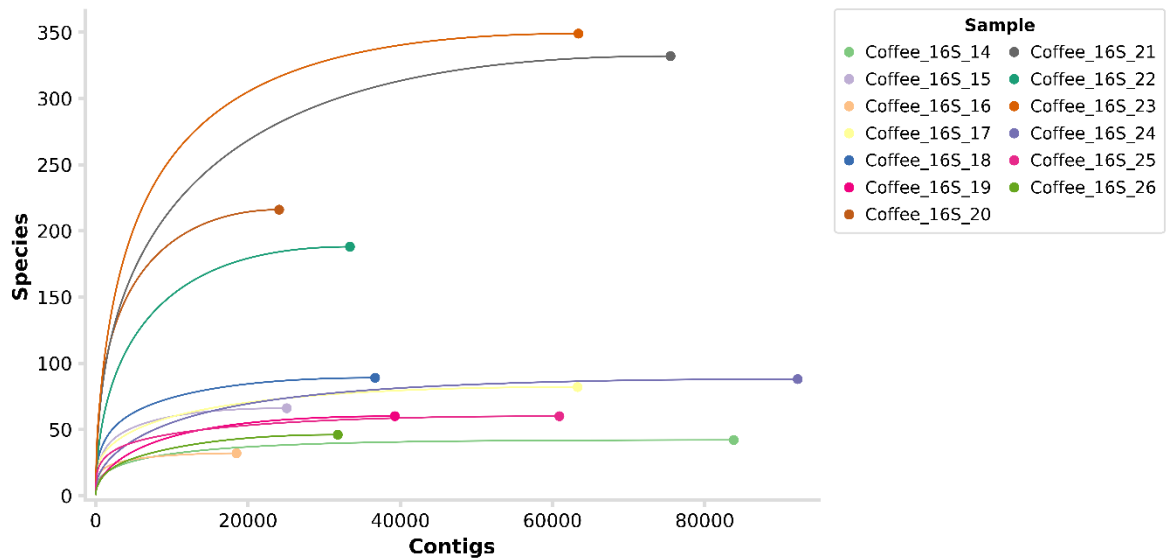
Curva de calibración de OTA

Cf de OTA (ng/ml)	Área Repetición1	Área Repetición2	Área Repetición3	Área
0.25	43673	41334	42503.5	1653.9
0.5	75107	75981	75544	618.0
1	141762	144970	143366	2268.4
2.5	344468	347723	346095.5	2301.6
5	686013	712247	699130	18550.2
10	1373851	1395818	1384834.5	15533.0
20	2755267	2853580	2804423.5	69517.8
40	5521358	5883996	5702677	256423.8
80	12014100	10912668	11463384	778830.0

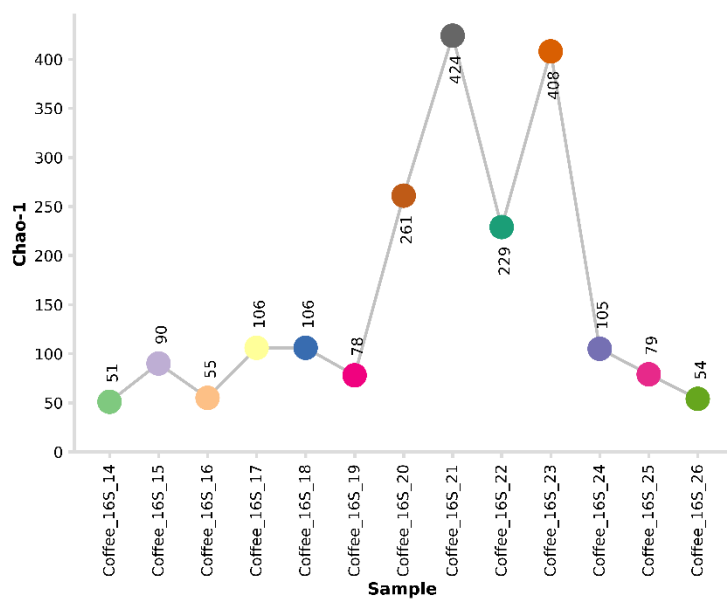
Anexo 2. Resultado de la diversidad microbiana utilizando el kit DNeasy UltraClean Microbial (Kit Microbial) para la extracción de ADN de las muestras de café.

Diversidad bacteriana (16S)

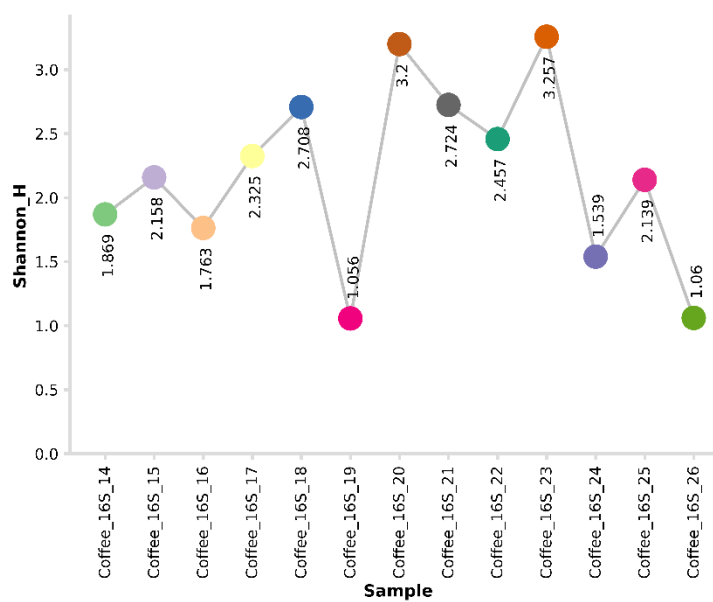
1) Curvas de rarefacción obtenidas (16S)



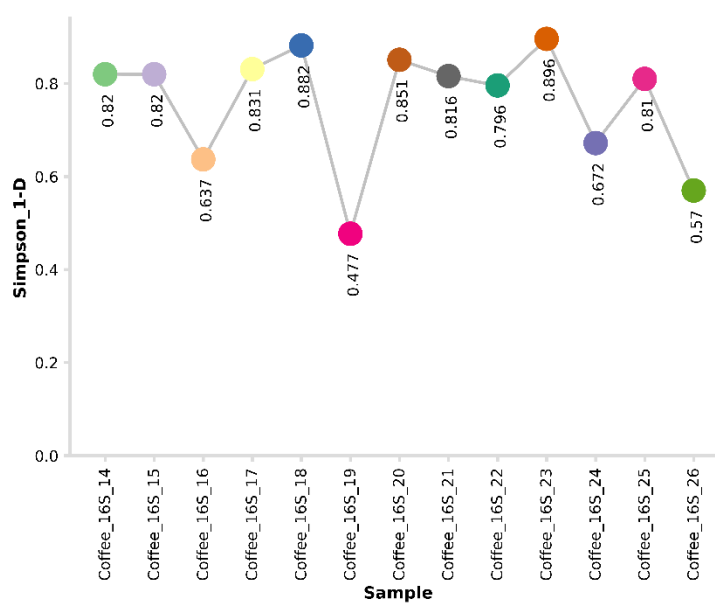
2) Figura del índice de Chao (16S)



3) Figura del índice de Shannon 16S

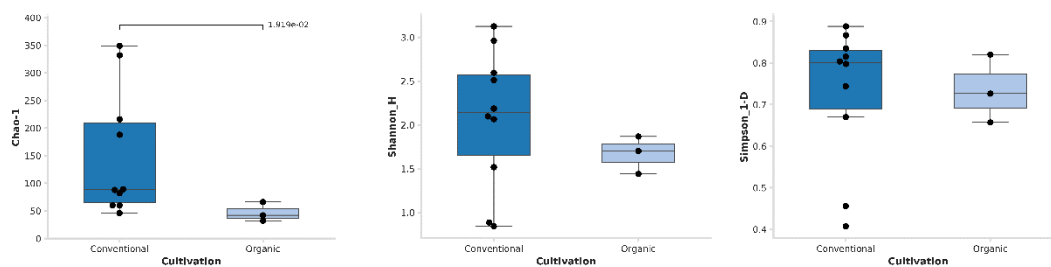


4). Figura del índice de Simpson 16S

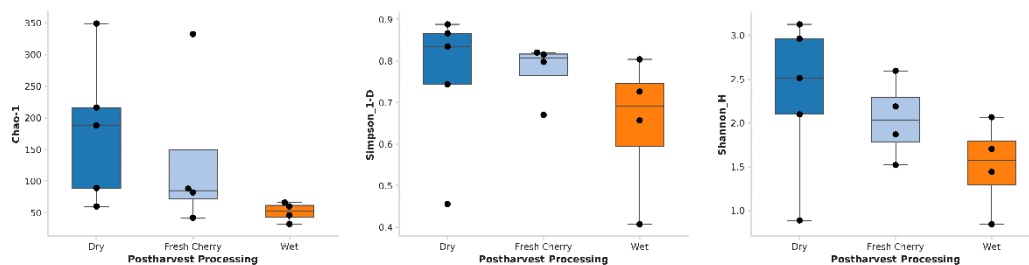


Resultados del análisis de riqueza por variable (16S)

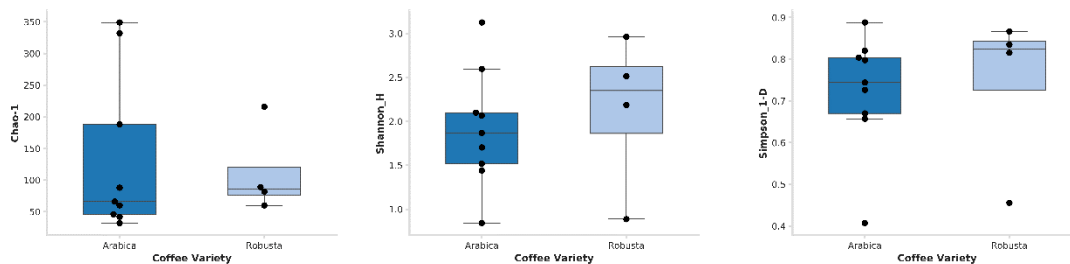
1) Por cultivo 16s



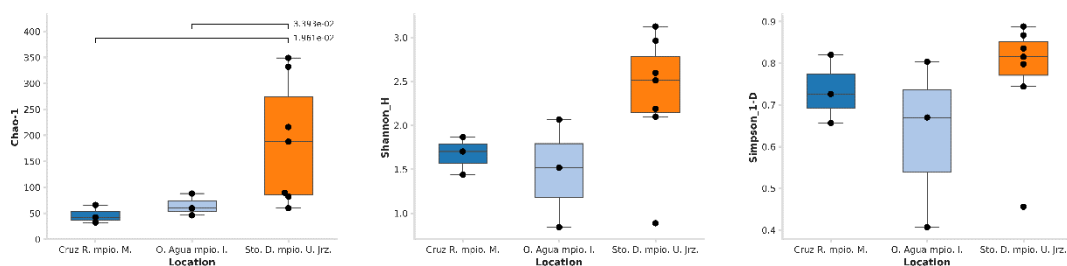
2) Por procesamiento 16S



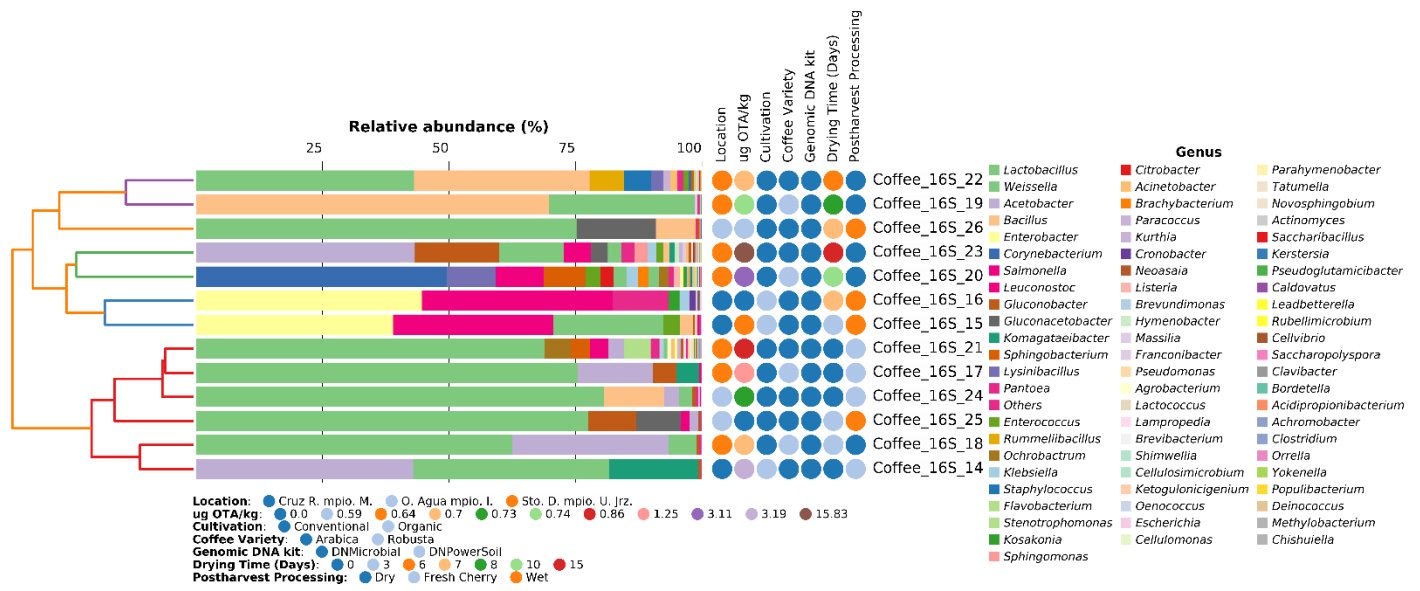
3) Por variedad 16S



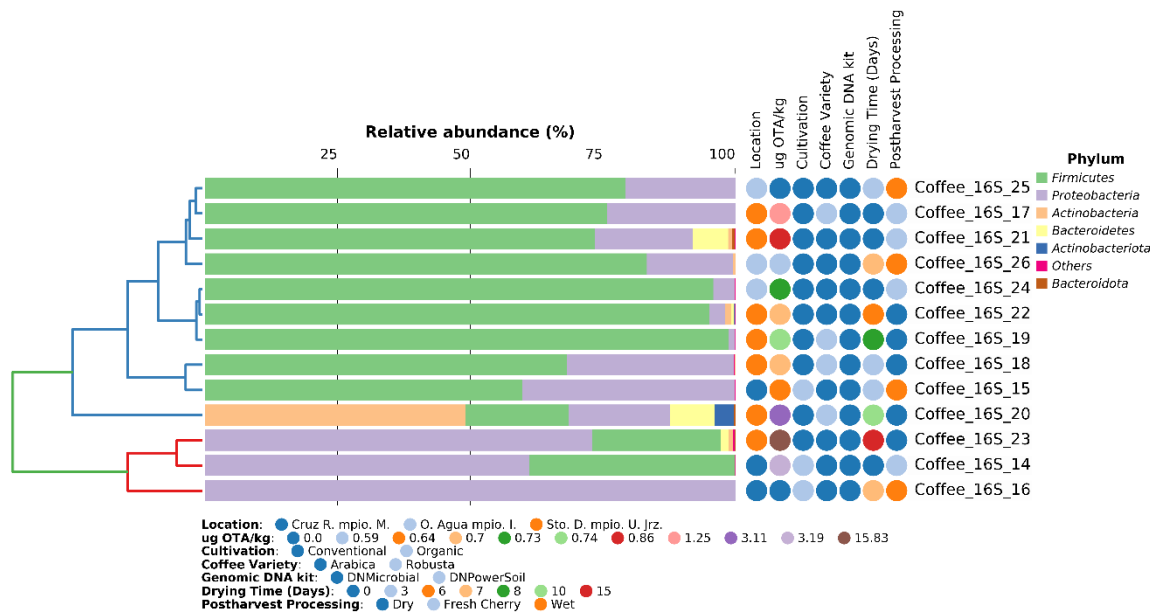
4) Por lugar de muestreo (localización) 16S



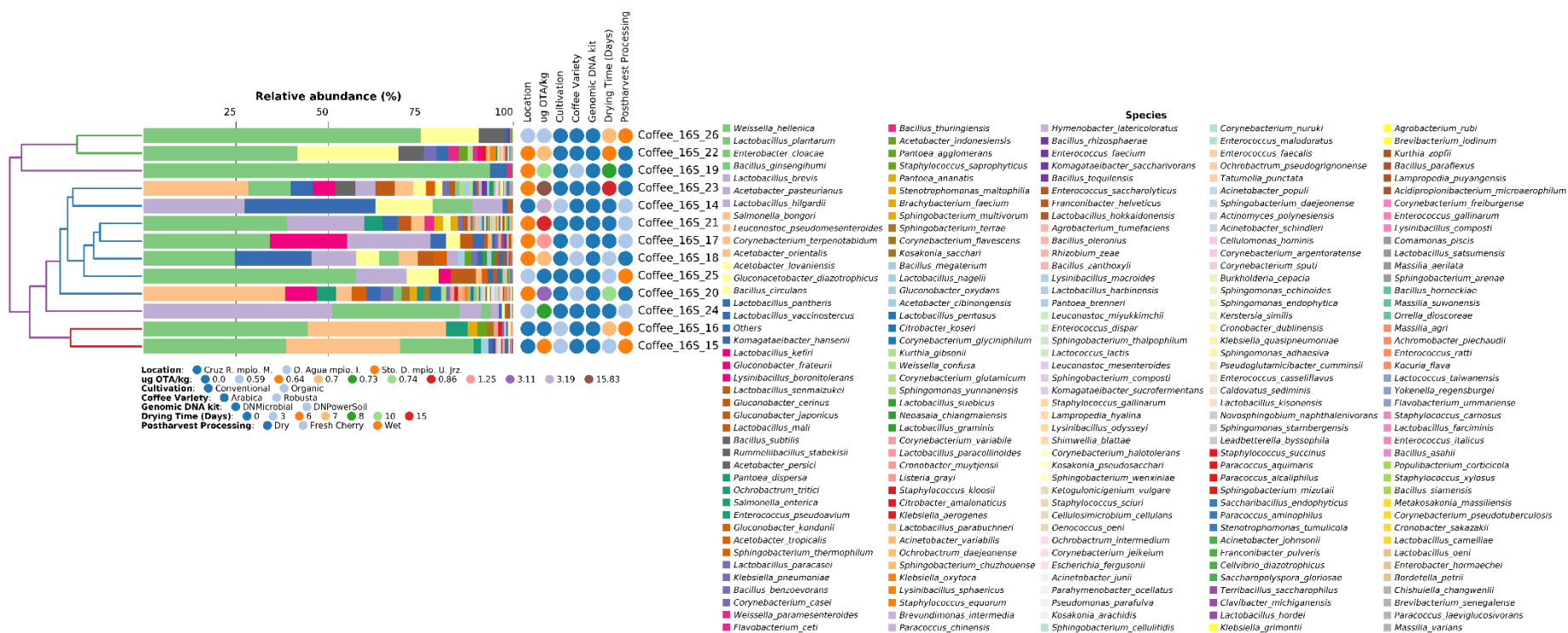
Gráfica abundancia relativa por Fila del gen ribosomal 16s obtenido con el kit microbial



Gráfica abundancia relativa por género del gen ribosomal 16s con el kit microbial

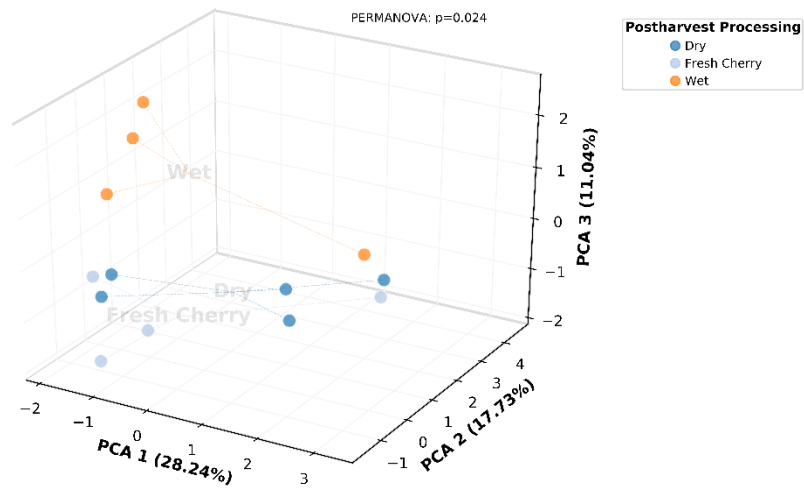


Gráfica abundancia relativa por especie del gen ribosomal 16s con el kit microbial

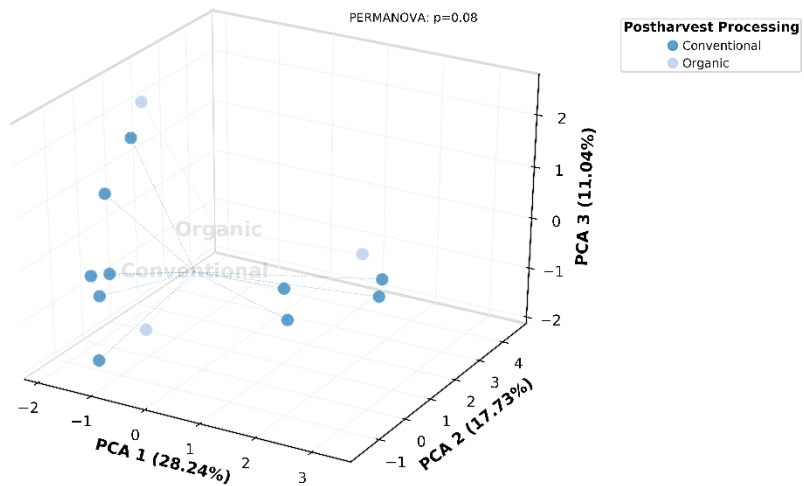


Gráficos del análisis de componentes principales entre variables (bryan-curtis)
diversidad microbiana (16S)

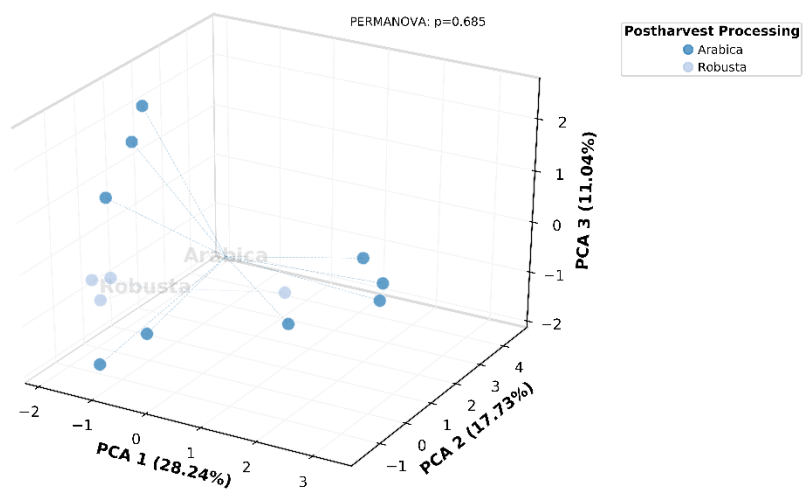
A) Por procesamiento 16S



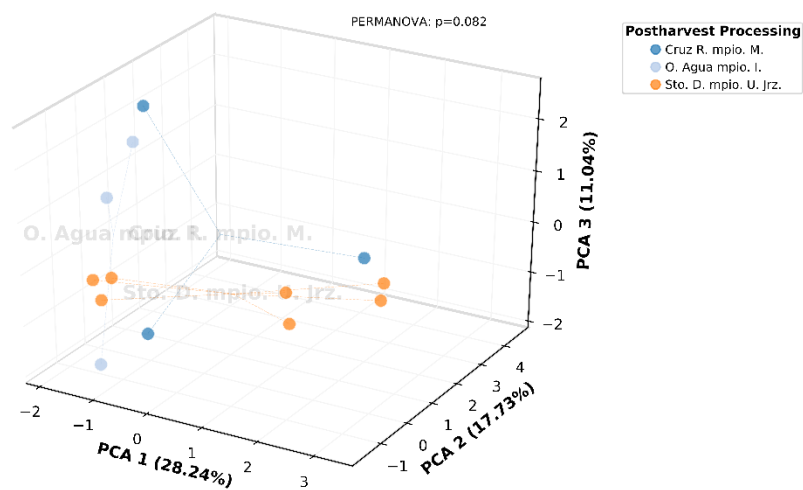
B) Por cultivo



C) Por variedad

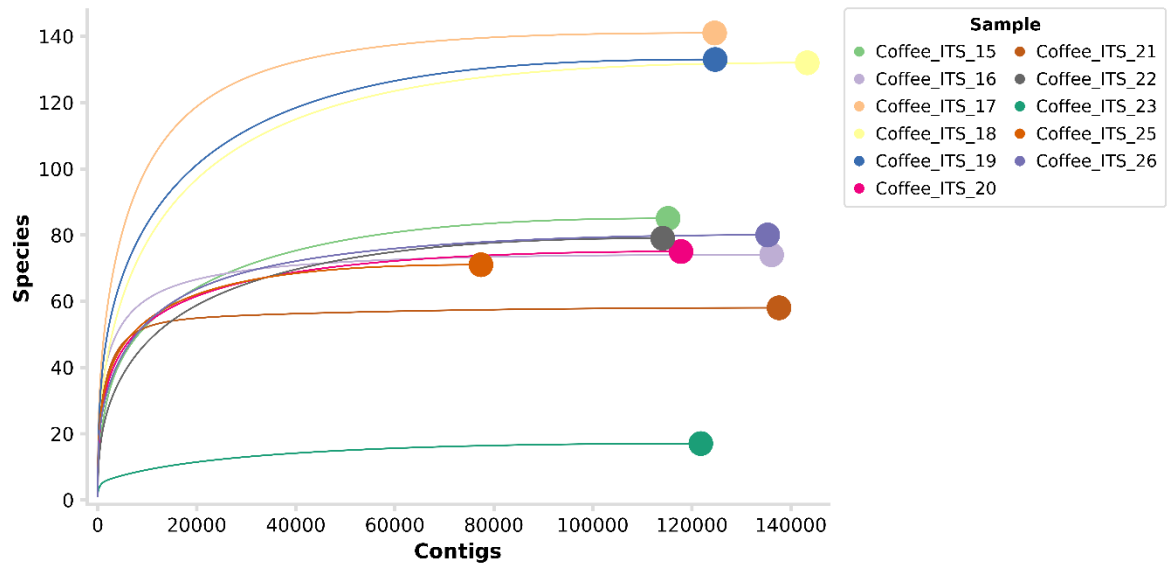


D) Por lugar de muestreo (localización)

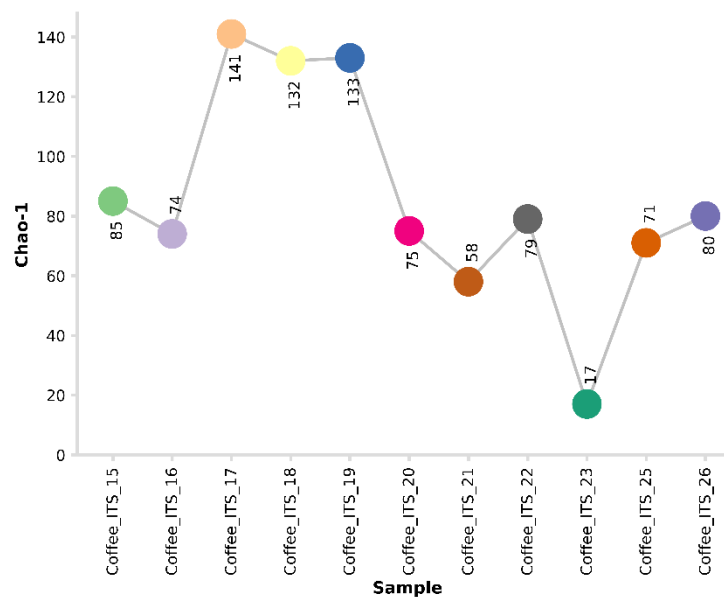


Resultados obtenidos de la diversidad fúngica (ITS) con el Kit Microbial

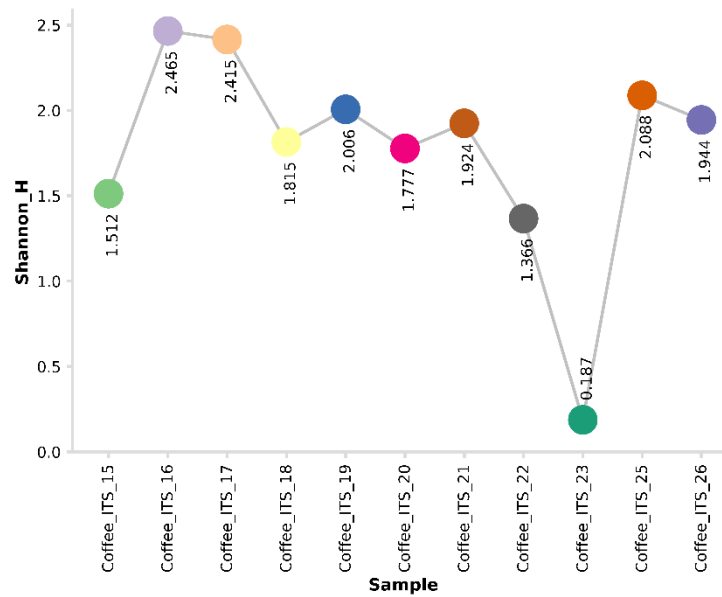
1) Gráfica de rarefacción de las muestras de café diversidad fúngica (ITS)



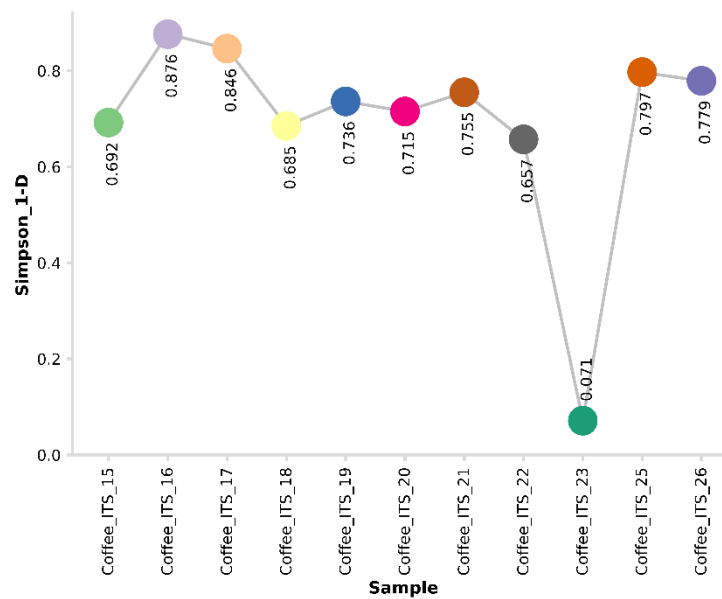
2) Gráfica del índice de Chao para la diversidad fúngica (ITS)



3) Gráfica índice Shannon para diversidad fúngica

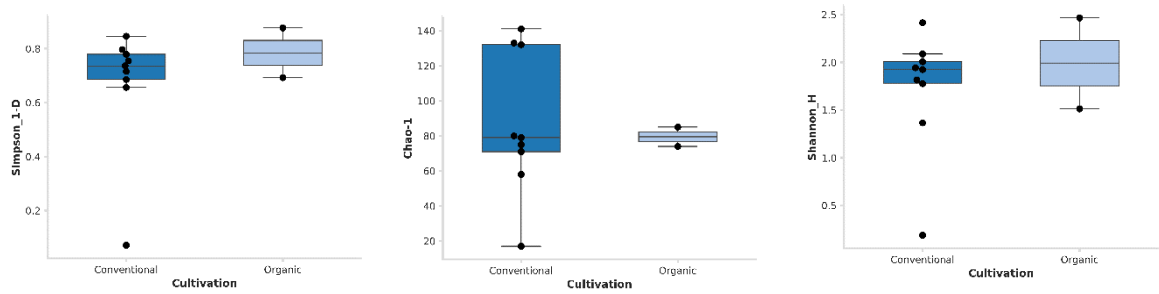


4) Gráfica del índice Simpson para diversidad fúngica (ITS)

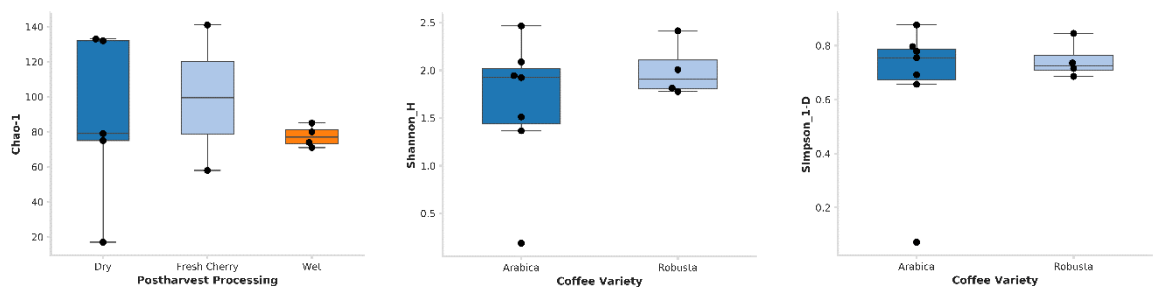


Resultado de riqueza diversidad fúngica (its) por variable

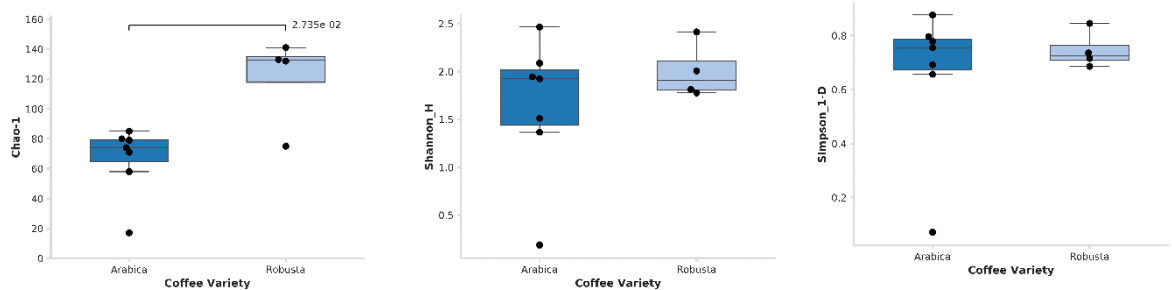
A) Por cultivo



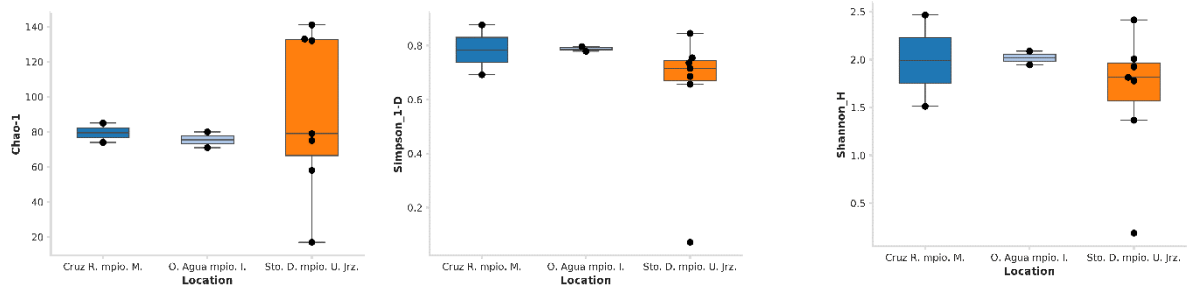
B) Por procesamiento



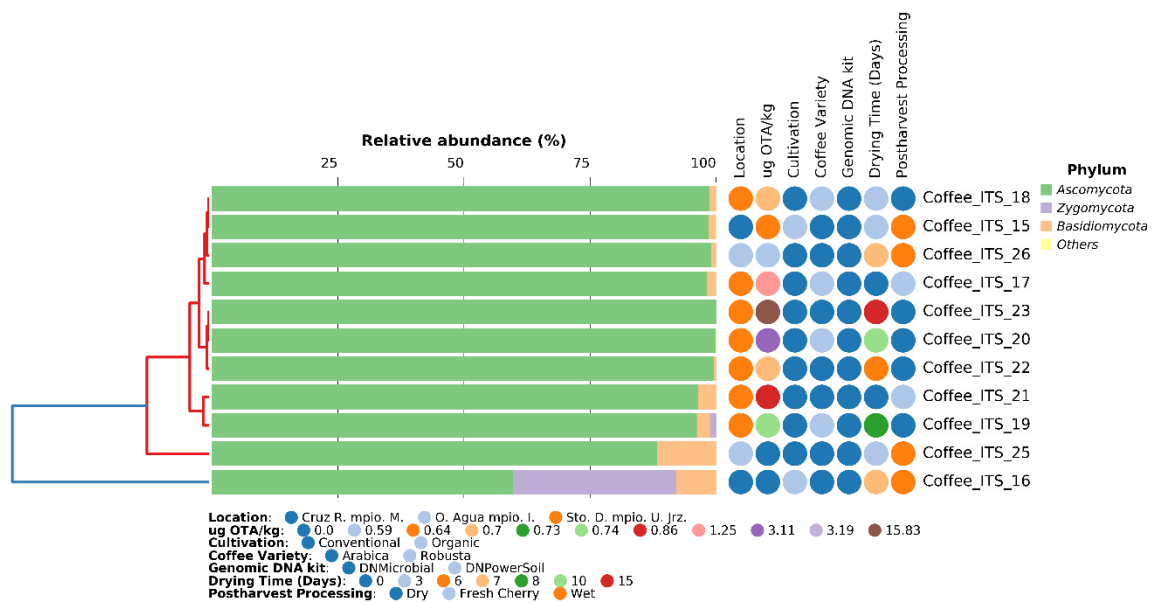
C) Por variedad



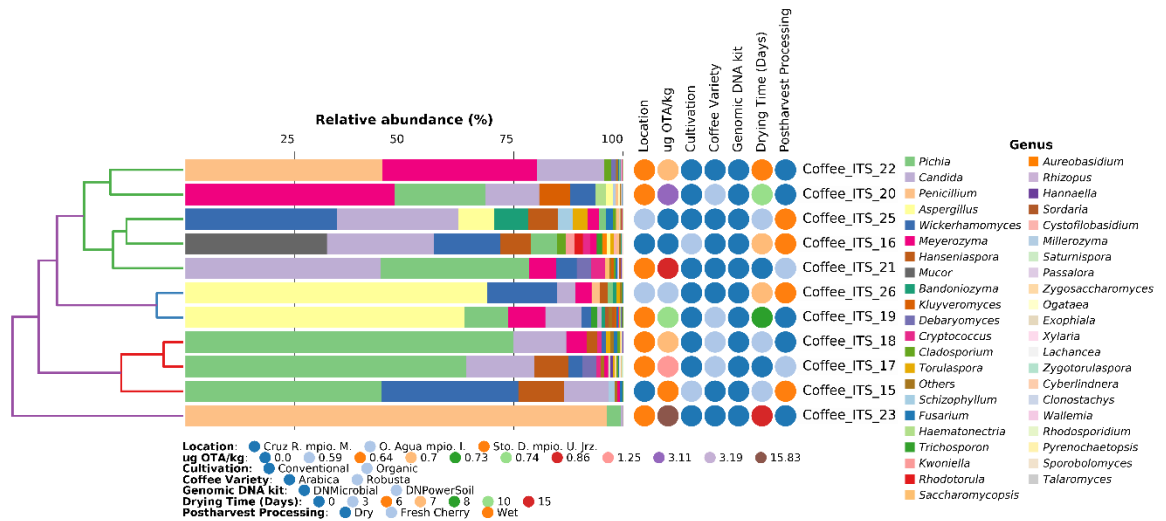
E) Por lugar de muestreo (localización)



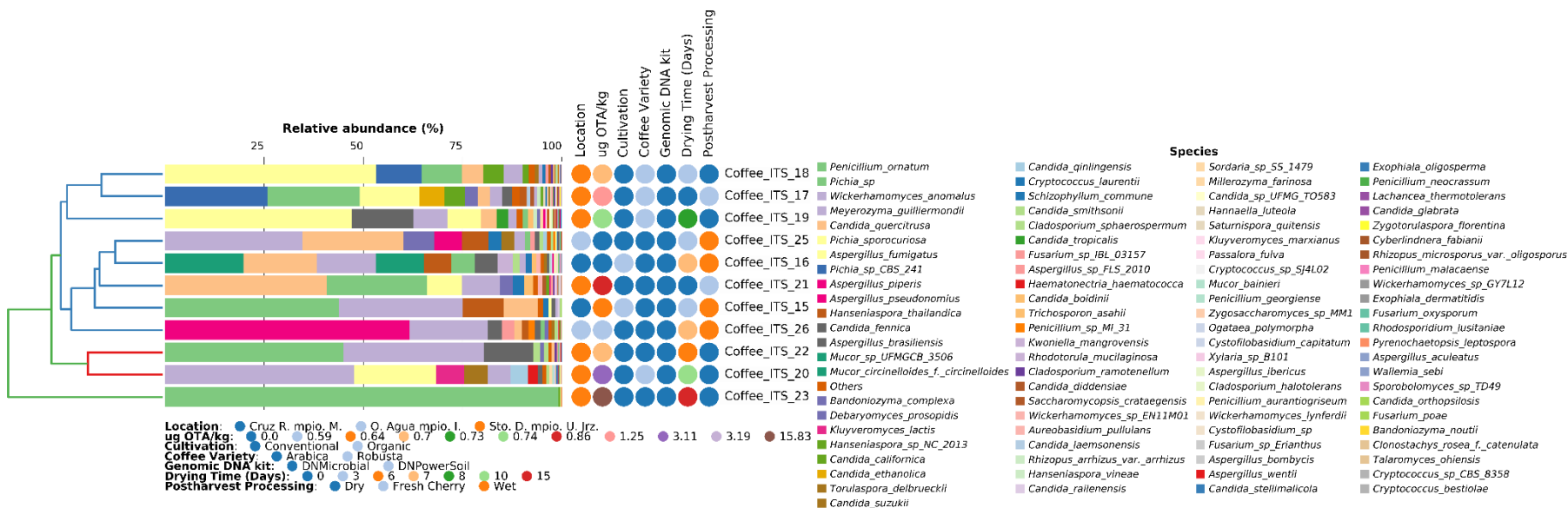
Gráfica de la abundancia relativa por fila de los hongos(its) obtenida con el kit microbial



Gráfica de la abundancia relativa de la diversidad fúngica (its) por género obtenida con el kit microbial

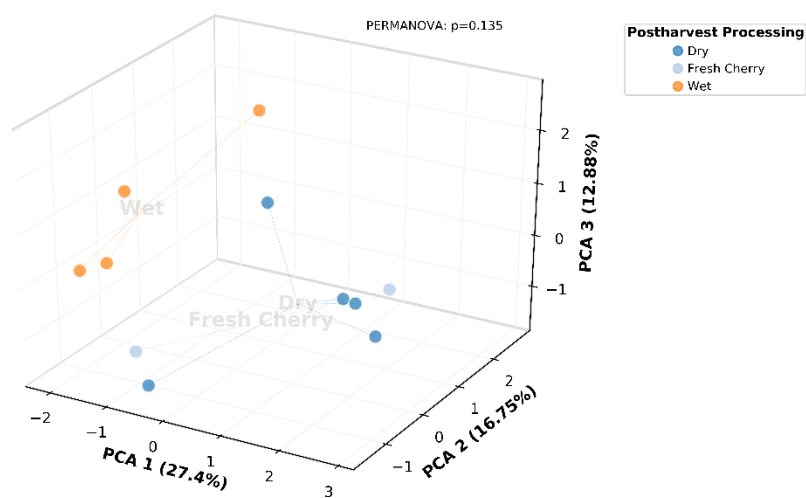


Gráfica de la abundancia relativa de la diversidad fúngica (ITS) por especie con el kit microbrial

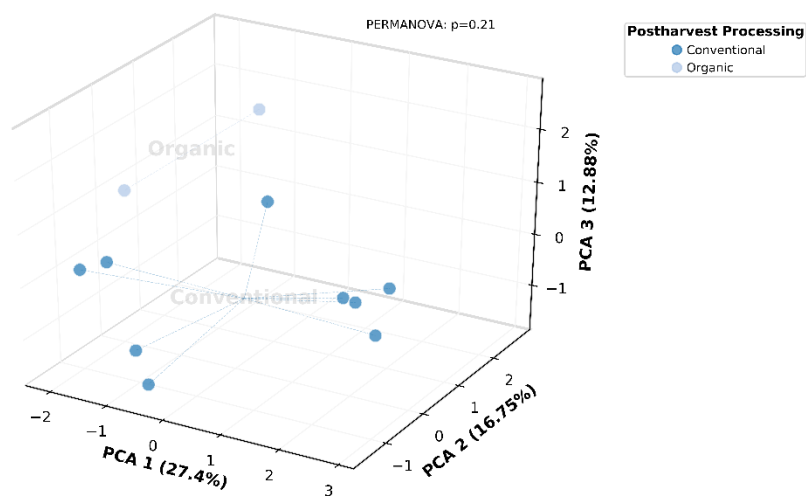


Gráficos componentes principales entre variables (bryan-curtis) diversidad fúngica (ITS)

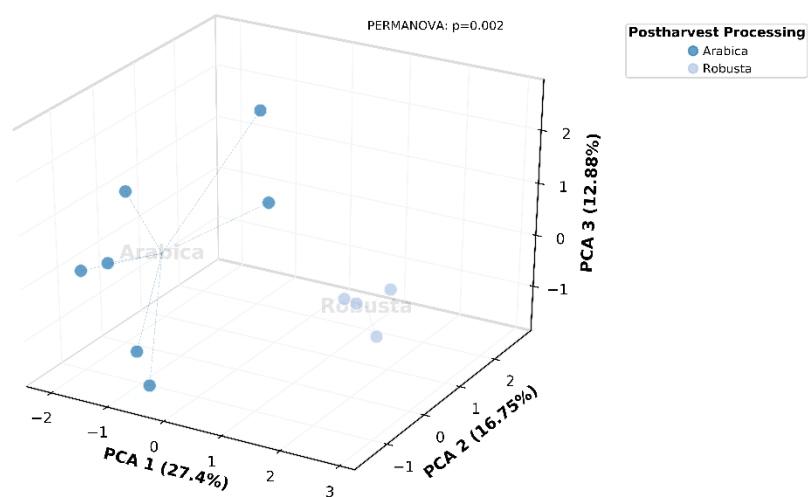
A) Por procesamiento (ITS)



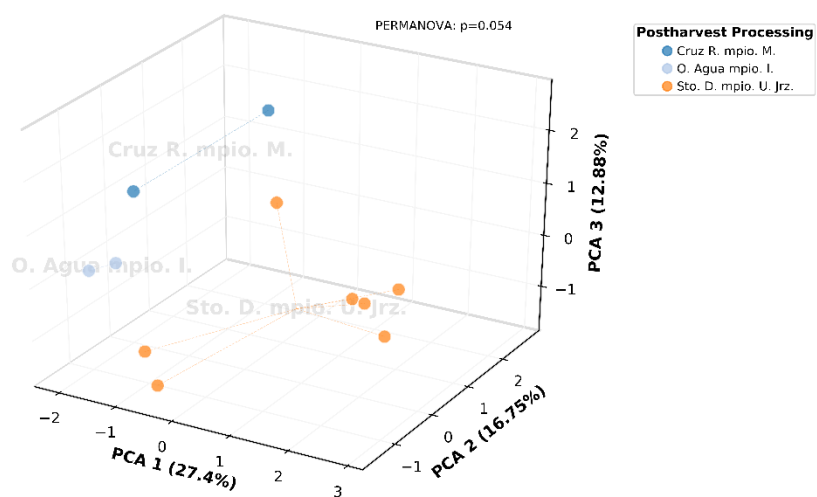
B) Por cultivo (ITS)



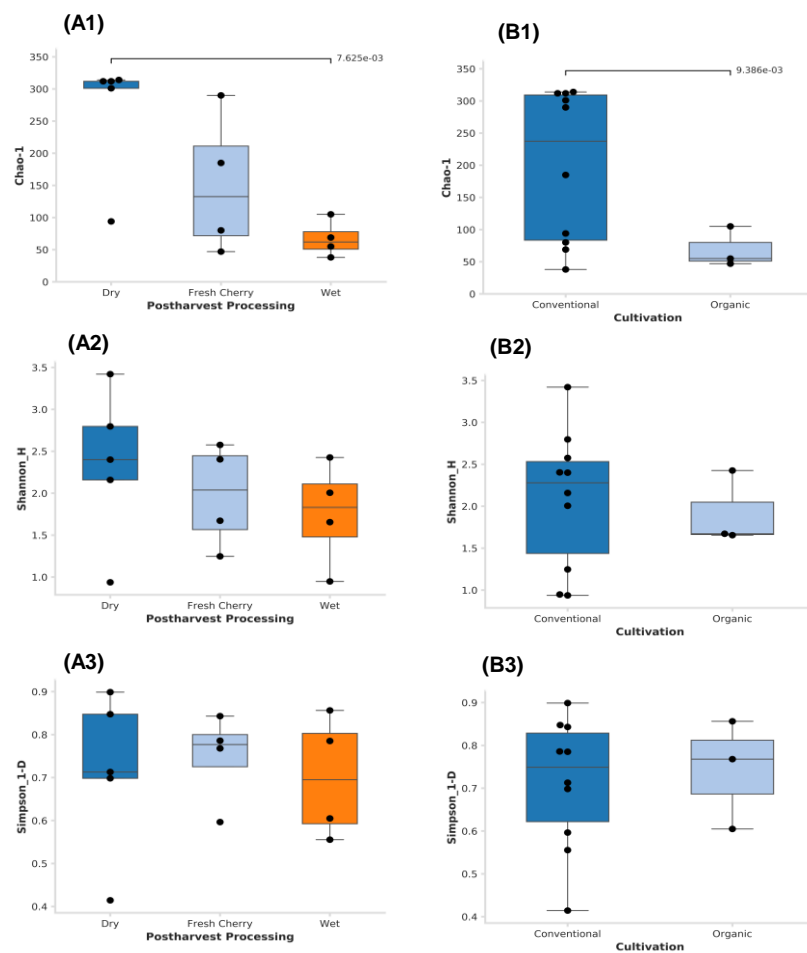
C) Por variedad (ITS)

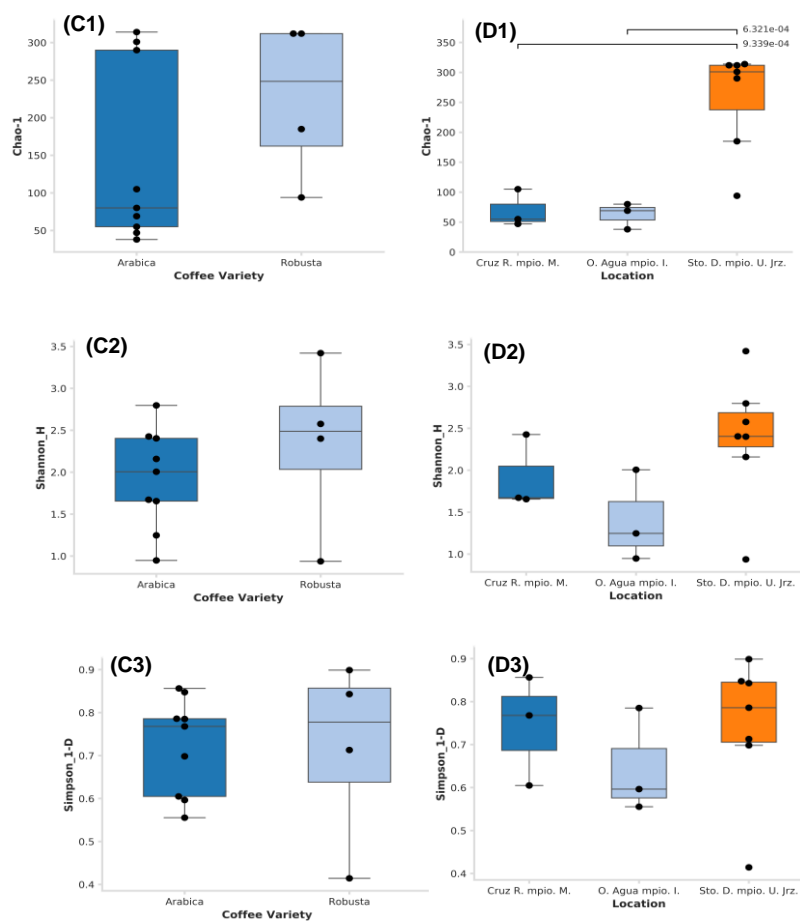


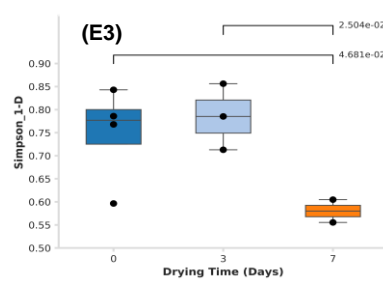
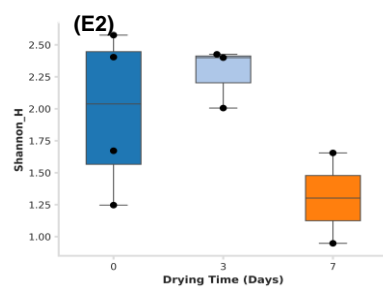
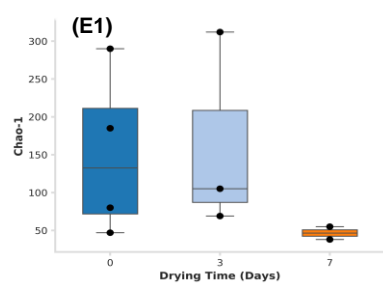
D) Por lugar de muestreo (localización) (ITS)



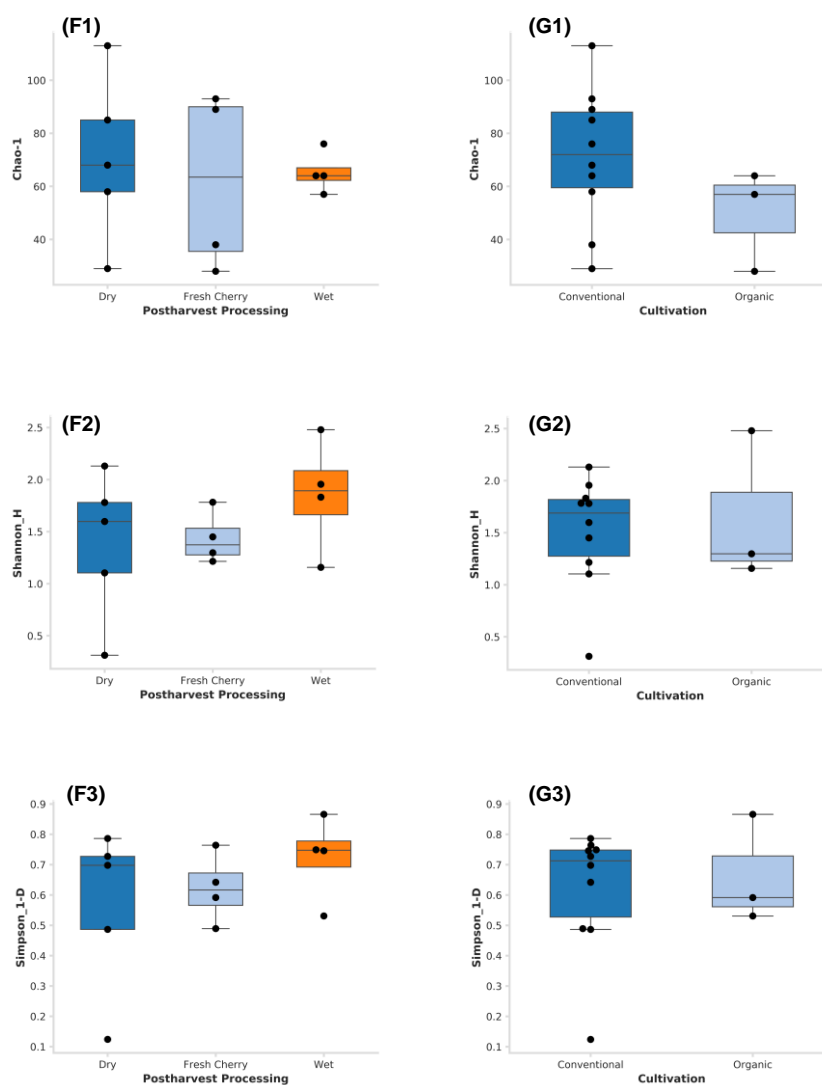
Anexo 3. Índices de riqueza para las comunidades bacterianas (16S) Kit power soil considerando las diferentes variables

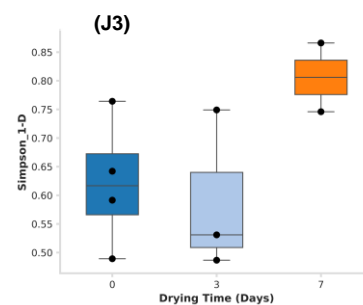
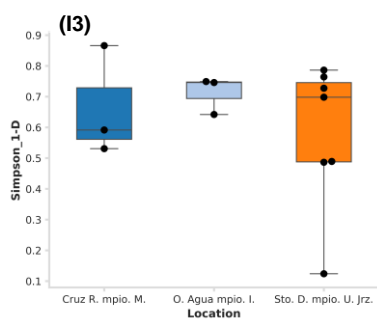
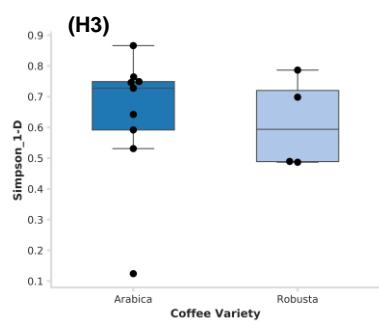
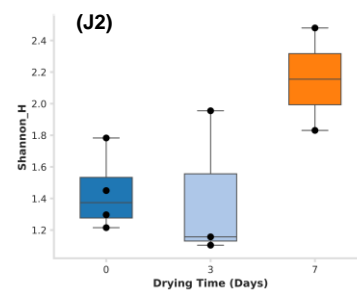
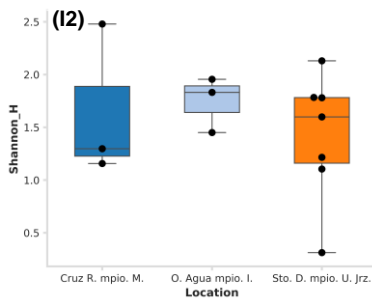
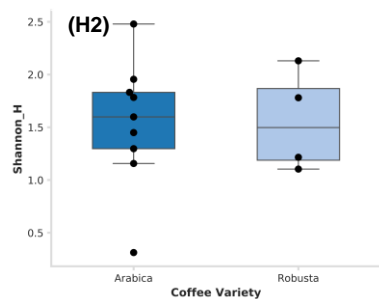
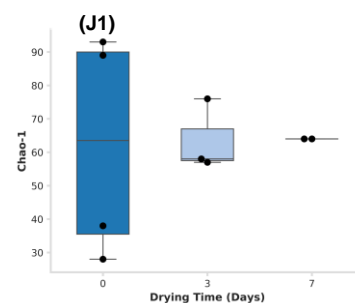
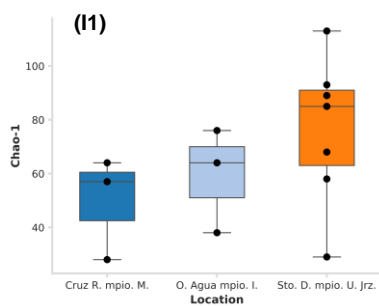
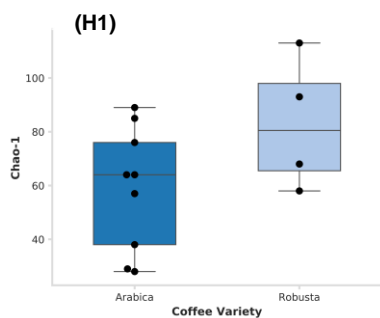


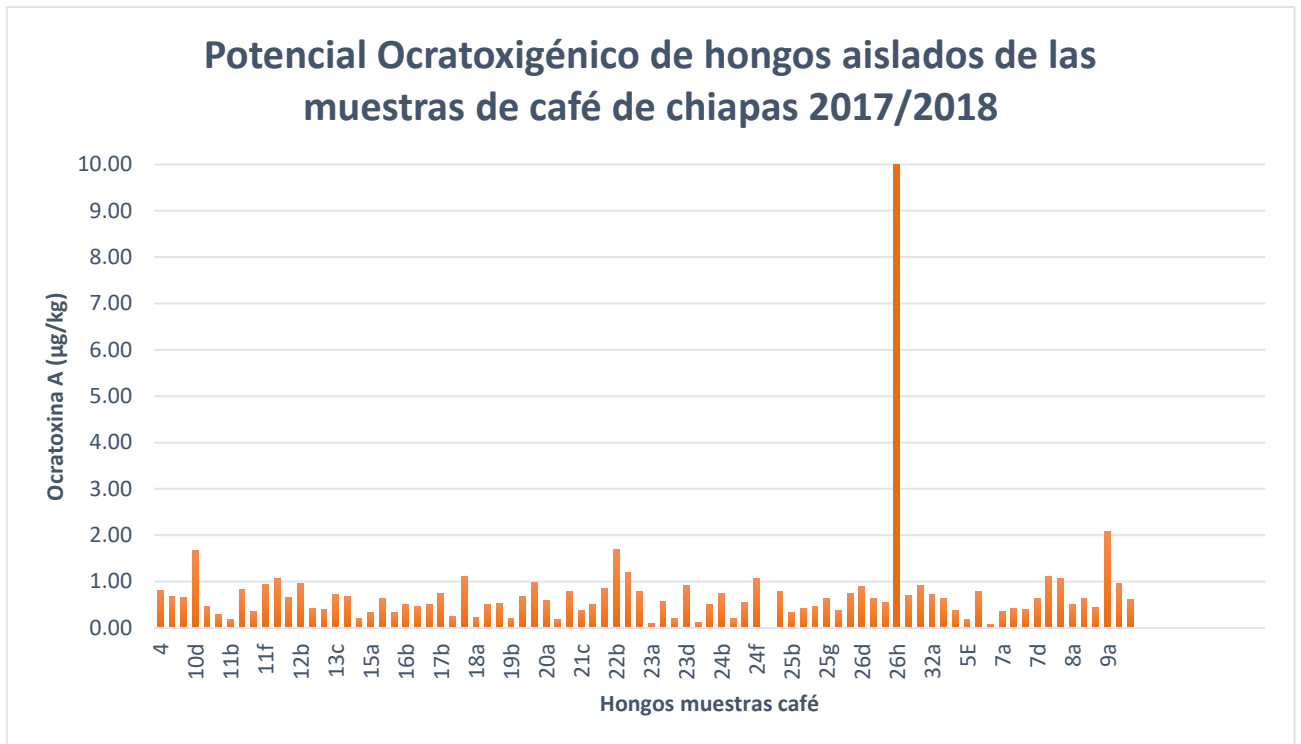




Anexo 4. Índices de riqueza para las comunidades fúngicas (ITS) Kit power soil considerando las diferentes variables





Anexo 5. Potencial ocratoxigénico de los hongos filamentosos aislados







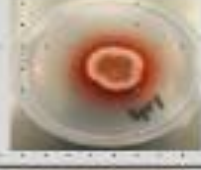


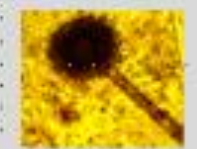
Potencial ocratoxigénico de los hongos filamentosos aislados

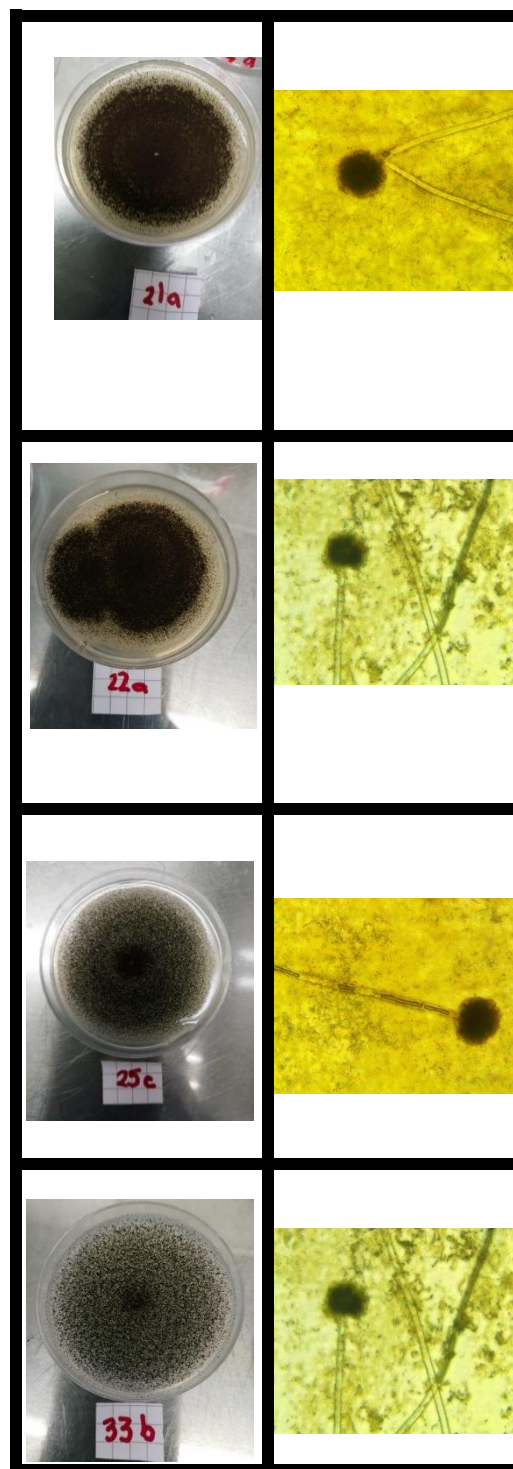
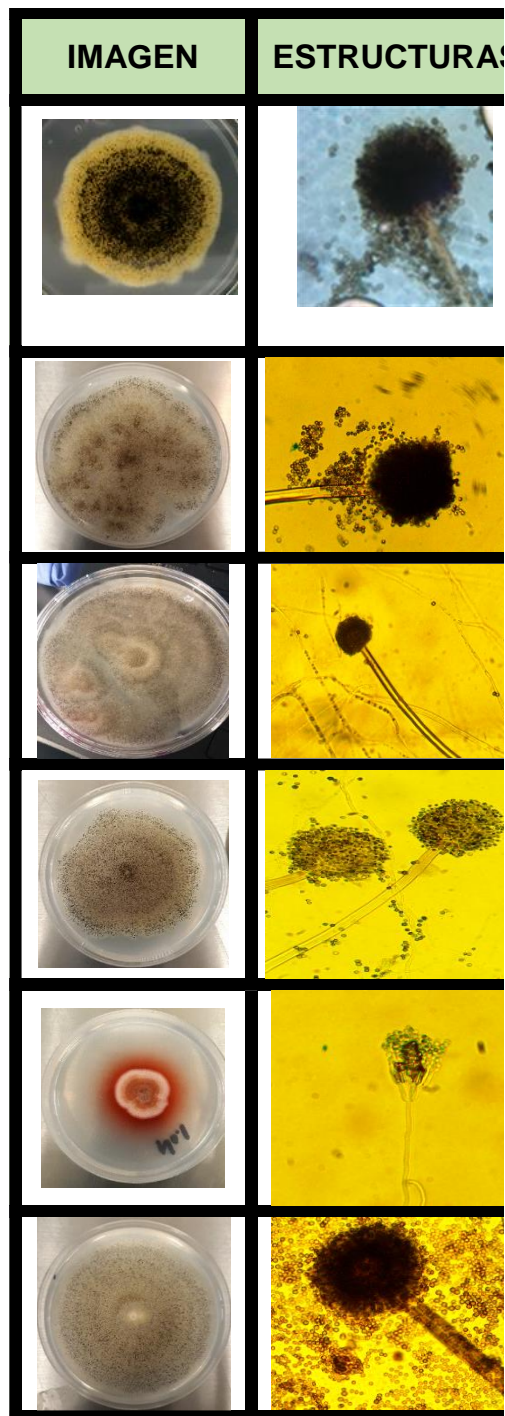
NO. HONGO	$\mu\text{g OTA/kg}$
4	0.81
10a	0.69
10b	0.66
10d	1.68
10f	0.46
11a	0.29
11b	0.19
11c	0.83
11d	0.35
11f	0.94
11g	1.06
12a	0.66
12b	0.96
13a	0.41
13b	0.40
13c	0.72
13d	0.68
13f	0.20
15a	0.33
15b	0.64
16a	0.33
16b	0.50
16c	0.45
17a	0.50
17b	0.74
17c	0.25
17d	1.11
18a	0.23
18b	0.51
19a	0.52
19b	0.21
19c	0.68
19d	0.98
20a	0.60
21a	0.17
21b	0.78
21c	0.39
21d	0.51

22a	0.84
22b	1.70
22c	1.19
22d	0.79
23a	0.08
23b	0.56
23c	0.19
23d	0.92
23f	0.11
24a	0.51
24b	0.74
24c	0.20
24d	0.55
24f	1.06
24g	0.00
25a	0.80
25b	0.32
25c	0.42
25d	0.47
25g	0.64
26a	0.37
26c	0.75
26d	0.90
26f	0.64
26g	0.55
26h	155.33
27a	0.69
27b	0.92
32a	0.73
33a	0.63
33b	0.38
5E	0.19
5e(1)	0.78
5E(2)	0.08
7a	0.36
7b	0.42
7c	0.41
7d	0.63
7f	1.12

7g	1.07
8a	0.50
8b	0.64
8c	0.43
9a	2.09
9b	0.96
9c	0.62

Identificación macro y microscópica de algunos hongos aislados del café para cuantificación de potencial ocratoxigénicos

CLAVE Y NO. CEPA	IMAGEN	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	ESTRUCTURAS
M10R8H2 (143) Cereza Robusta (8 días secado)		Textura glauco, granuloso, plano, café oscuro, sin pigmentación reversa.	
R8M9HH(2)1B (151) Cereza Robusta (8 días secado)		Textura glauco, granuloso, estrias, ligeramente elevado, café, sin pigmentación reversa.	
R8M4HI2II (69) Cereza Robusta (8 días secado)		Textura glauco, granuloso, plano, café, ninguna, sin pigmentación reversa.	
R8M10HI (1) Cereza Robusta (8 días secado)		Aterciopejado, plano, blanco, pigmentación reversa negra.	
A15M2H1(28) Cereza Arabica (15 días secado)		Glauco, polvoroso, plano, café, sin pigmentación reversa.	



Anexo 6. Validación del modelo para asignación taxonómica

Para validar el desempeño del modelo de entrenamiento se usó la función *crossvalidate* de RDP Classifier, la cual realiza una validación de submuestreo aleatorio, es decir, calcula los valores de (1 – especificidad) y sensibilidad para cada rango en cada bootstrap. El resultado de la validación se muestra a continuación, como se puede observar la asignación hasta nivel de género tiene mayor sensibilidad y especificidad, mientras que a nivel de especie se pierde.

Se muestran los siguientes archivos de texto, que se generan con el análisis de validación cruzada.

NCBI_crossvalidate_450.txt

RDP_crossvalidate_450.txt

SILVA_crossvalidate_450.txt

NCBI_crossvalidate_450.txt
 taxon file NCBI_train_taxonomy.txt
 train sequence file NCBI_train_seqs.fasta
 word size 8
 minimum number of words for bootstrap 5
 length 450
 selectedRank NA
 trainingset size 17422
 testset size 1883

bootstrap	1-Specificity	Sensitivity	bootstrap	Order_Spec	Order_Sens	rootrank_Spec	rootrank_Sens	Kingdom_Spec	Kingdom_Sens		
Phylum_Spec	Phylum_Sens	Genus_Spec	Genus_Sens	Family_Spec	Family_Sens	Class_Spec	Class_Sens	Species_Spec	Species_Sens		
0	1.0	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
1	1.0	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2	1.0	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
3	1.0	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
4	1.0	1.0	0.999185667752443	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	0.9925373134328358	1.0	1.0
5	1.0	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	0.9925373134328358	1.0	1.0
6	1.0	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	0.9925373134328358	1.0	1.0
7	1.0	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	0.9850746268656716	1.0	1.0
8	0.8333333333333334	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	0.9701492537313433	1.0	1.0
9	0.875	1.0	0.6666666666666667	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	0.9701492537313433	1.0	1.0
10	0.8333333333333334	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	0.9701492537313433	1.0	1.0
11	0.6666666666666667	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	0.985498473282443	1.0	1.0
12	0.6666666666666667	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	0.5	0.9994683678894205	1.0	1.0
13	0.6666666666666667	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	0.5	0.9994683678894205	1.0	1.0
14	0.6666666666666667	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	0.5	0.9994683678894205	1.0	1.0
15	0.6666666666666667	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	0.5	0.9994683678894205	1.0	1.0
16	0.5	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9994683678894205	0.9402985074626866	1.0	1.0
17	0.5	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9994683678894205	0.9402985074626866	1.0	1.0
18	0.5	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9994683678894205	0.9402985074626866	1.0	1.0
19	0.5	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9994683678894205	0.9402985074626866	1.0	1.0
20	0.5	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9994683678894205	0.9402985074626866	1.0	1.0
21	0.5	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9994683678894205	0.9402985074626866	1.0	1.0
22	0.5	0.9994672349493873	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9994683678894205	0.9402985074626866	1.0	1.0
23	0.5	0.9994672349493873	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9994683678894205	0.9402985074626866	1.0	1.0
24	0.5	0.9994672349493873	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9994683678894205	0.9402985074626866	1.0	1.0
25	0.5	0.9994672349493873	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9994683678894205	0.9402985074626866	1.0	1.0
26	0.5	0.9994672349493873	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9994683678894205	0.9402985074626866	1.0	1.0
27	0.5	0.9994672349493873	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9994683678894205	0.9402985074626866	1.0	1.0

28	0.5	0.9994672349493873	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841	
0.835820895522388		0.9925671812464265	0.25	0.9984	0.3333333333333337		0.9989361702127659	0.8908794788273615	
0.9633587786259542									
29	0.5	0.9989344698987747	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841	
0.8208955223880597		0.9919954259576901	0.25	0.9978666666666667		0.3333333333333337		0.9989361702127659	
0.8835504885993486		0.9633587786259542							
30	0.3333333333333337	0.9989344698987747		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841
0.8134328358208955		0.9902801600914809	0.125	0.9978666666666667		0.3333333333333337		0.9989361702127659	
0.8737785016286646		0.9603053435114504							
31	0.3333333333333337	0.9989344698987747		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841
0.7985074626865671		0.989136649514008	0.125	0.9978666666666667		0.3333333333333337		0.9989361702127659	
0.8623778501628665		0.9587786259541985							
32	0.3333333333333337	0.9989344698987747		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841
0.791044776119403		0.989136649514008	0.125	0.9978666666666667		0.3333333333333337		0.9989361702127659	
0.8542345276872965		0.9572519083969465							
33	0.3333333333333337	0.9989344698987747		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841
0.791044776119403		0.9868496283590623	0.125	0.9978666666666667		0.3333333333333337		0.9989361702127659	
0.8428338762214984		0.9526717557251908							
34	0.3333333333333337	0.9989344698987747		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841
0.791044776119403		0.985134362492853	0.125	0.9978666666666667		0.3333333333333337		0.9989361702127659	
0.8330618892508144		0.9511450381679389							
35	0.3333333333333337	0.9989344698987747		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841
0.7761194029850746		0.9845626072041166	0.125	0.9978666666666667		0.3333333333333337		0.9989361702127659	
0.8249185667752443		0.9496183206106871							
36	0.3333333333333337	0.9989344698987747		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841
0.7388059701492538		0.9839908519153803	0.125	0.9973333333333333		0.3333333333333337		0.9989361702127659	
0.8094462540716613		0.9480916030534351							
37	0.3333333333333337	0.9989344698987747		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841
0.7388059701492538		0.982275586049171	0.125	0.9973333333333333		0.3333333333333337		0.9989361702127659	
0.7964169381107492		0.9465648854961832							
38	0.1666666666666663	0.9989344698987747		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841
0.7313432835820896		0.9799885648942253	0.125	0.9973333333333333		0.3333333333333337		0.9989361702127659	
0.7866449511400652		0.9419847328244275							
39	0.1666666666666663	0.9989344698987747		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841
0.708955223880597		0.9788450543167524	0.125	0.9973333333333333		0.3333333333333337		0.9989361702127659	
0.7793159609120521		0.932824427480916							
40	0.1666666666666663	0.9989344698987747		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841
0.6791044776119404		0.978273299028016	0.125	0.9968	0.3333333333333337		0.9989361702127659	0.7654723127035831	
0.9297709923664123									
41	0.1666666666666663	0.9989344698987747		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841
0.6791044776119404		0.9765580331618068	0.125	0.9968	0.3333333333333337		0.9989361702127659	0.757328990228013	
0.9251908396946565									
42	0.1666666666666663	0.9984017048481619		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841
0.6791044776119404		0.9754145225843339	0.125	0.9968	0.3333333333333337		0.9989361702127659	0.744299674267101	
0.9190839694656489									
43	0.1666666666666663	0.9978689397975493		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841
0.6716417910447761		0.9731275014293882	0.125	0.9968	0.3333333333333337		0.9984042553191489	0.7337133550488599	
0.9099236641221374									
44	0.1666666666666663	0.9978689397975493		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841
0.6716417910447761		0.9725557461406518	0.125	0.9962666666666666		0.3333333333333337		0.9984042553191489	
0.7239413680781759		0.9053435114503817							
45	0.1666666666666663	0.9978689397975493		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841
0.664179104477612		0.9714122355631789	0.125	0.9962666666666666		0.3333333333333337		0.997872340425532	
0.7133550488599348		0.8946564885496183							
46	0.1666666666666663	0.9978689397975493		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841
0.6567164179104478		0.9685534591194669	0.125	0.9962666666666666		0.3333333333333337		0.997872340425532	
0.6978827361563518		0.8885496183206106							
47	0.1666666666666663	0.9978689397975493		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841
0.6417910447761195		0.967409948542024	0.125	0.9962666666666666		0.3333333333333337		0.997872340425532	
0.6824104234527688		0.8870229007633588							
48	0.1666666666666663	0.9978689397975493		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.998936735778841
0.6194029850746269		0.9656946826758147	0.125	0.9957333333333334		0.3333333333333337		0.997872340425532	
0.6685667752442996		0.8793893129770992							
49	0.1666666666666663	0.9978689397975493		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9984051036682615
0.6194029850746269		0.9634076615208691	0.125	0.9957333333333334		0.3333333333333337		0.9968085106382979	
0.6579804560260587		0.8748091603053435							
50	0.1666666666666663	0.9973361747469366		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9984051036682615
0.6044776119402986		0.9594053744997141	0.125	0.9946666666666667		0.3333333333333337		0.9968085106382979	
0.6425081433224755		0.8687022900763359							
51	0.1666666666666663	0.9973361747469366		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9984051036682615
0.5895522388059702		0.9582618639222413	0.125	0.9946666666666667		0.3333333333333337		0.9968085106382979	
0.6327361563517915		0.8656488549618321							
52	0.1666666666666663	0.9973361747469366		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9984051036682615
0.5671641791044777		0.956546598056032	0.125	0.9941333333333333		0.3333333333333337		0.9968085106382979	
0.6197068403908794		0.8549618320610687							
53	0.1666666666666663	0.9973361747469366		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9984051036682615
0.5597014925373134		0.9519725557461407	0.125	0.9936	0.3333333333333337		0.9968085106382979	0.5903908794788273	
0.8458015267175573									
54	0.1666666666666663	0.9973361747469366		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9984051036682615
0.5597014925373134		0.9519725557461407	0.125	0.9936	0.3333333333333337		0.9968085106382979	0.5903908794788273	
0.8458015267175573									
55	0.1666666666666663	0.9973361747469366		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9984051036682615
0.5522388059701493		0.9485420240137221	0.125	0.9936	0.3333333333333337		0.9968085106382979	0.5814332247557004	
0.8412213740458016									
56	0.1666666666666663	0.996803409696324		NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9984051036682615
0.5223880597014925		0.9451114922813036	0.125	0.992	0.0	0.9968085106382979		0.5675895765472312	
0.8366412213740458									
57	0.0	0.996803409696324	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9984051036682615	0.5
0.9445397369925672		0.0	0.9909333333333333	0.0	0.9962765957446809		0.5513029315960912	0.8259541984732824	

58	0.0	0.9962706446457112	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9973418394471026
0.4850746268656716		0.9428244711263579	0.0	0.9909333333333333	0.0	0.9957446808510638	0.5399022801302932	
0.8122137404580153								
59	0.0	0.9962706446457112	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9973418394471026
0.4701492537313433		0.9376786735277302	0.0	0.9893333333333333	0.0	0.9957446808510638	0.5195439739413681	
0.7984732824427481								
60	0.0	0.9962706446457112	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9973418394471026
0.4701492537313433		0.9376786735277302	0.0	0.9893333333333333	0.0	0.9957446808510638	0.5195439739413681	
0.7984732824427481								
61	0.0	0.9962706446457112	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9973418394471026
0.4626865671641791		0.934819897084048	0.0	0.9893333333333333	0.0	0.9957446808510638	0.511400651465798	
0.7877862595419848								
62	0.0	0.9962706446457112	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9973418394471026
0.4477611940298507		0.9331046312178388	0.0	0.9882666666666666	0.0	0.9957446808510638		
0.49267100977198697		0.7862595419847328						
63	0.0	0.9957378795950985	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9973418394471026
0.4104477611940298		0.9296740994854202	0.0	0.9877333333333334	0.0	0.9957446808510638	0.4837133550488599	
0.7770992366412214								
64	0.0	0.9952051145444859	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9973418394471026
0.4029850746268657		0.9262435677530018	0.0	0.9856	0.0	0.9957446808510638	0.4731270358306189	
0.7725190839694657								
65	0.0	0.9952051145444859	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9973418394471026
0.3880597014925373		0.9245283018867925	0.0	0.9850666666666666	0.0	0.9957446808510638		
0.46335504885993484		0.7572519083969466						
66	0.0	0.9952051145444859	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9973418394471026
0.3880597014925373		0.923956546598056	0.0	0.984	0.0	0.9957446808510638	0.4560260586319218	
0.7404580152671756								
67	0.0	0.9946723494938732	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9973418394471026
0.3880597014925373		0.9233847913093196	0.0	0.984	0.0	0.9957446808510638	0.4495114006514658	
0.7358778625954199								
68	0.0	0.9946723494938732	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9973418394471026
0.3880597014925373		0.9205260148656375	0.0	0.984	0.0	0.9957446808510638	0.43892508143322473	
0.7297709923664122								
69	0.0	0.9946723494938732	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9973418394471026
0.3805970149253731		0.9182389937106918	0.0	0.984	0.0	0.9957446808510638	0.4267100977198697	
0.7251908396946565								
70	0.0	0.9946723494938732	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9973418394471026
0.3731343283582089		0.9136649514008005	0.0	0.9824	0.0	0.9952127659574468	0.42263843648208466	
0.7190839694656489								
71	0.0	0.9941395844432606	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9973418394471026
0.35820895522388063		0.9102344196683819	0.0	0.9818666666666667	0.0	0.9952127659574468	0.4128664495114006	
0.7053435114503817								
72	0.0	0.9941395844432606	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9973418394471026
0.35074626865671643		0.9056603773584906	0.0	0.9808	0.0	0.9952127659574468	0.4063517915309446	
0.6961832061068702								
73	0.0	0.9941395844432606	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9973418394471026
0.34328358208955223		0.9033733562035449	0.0	0.9802666666666666	0.0	0.9952127659574468		
0.39657980456026054		0.6916030534351145						
74	0.0	0.9936068193926478	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9973418394471026
0.33582089552238803		0.9005145797598628	0.0	0.9792	0.0	0.9952127659574468	0.3908794788273615	
0.6793893129770993								
75	0.0	0.9936068193926478	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9973418394471026
0.33582089552238803		0.8987993138936535	0.0	0.9786666666666667	0.0	0.9952127659574468	0.3835504885993485	
0.6717557251908397								
76	0.0	0.9930740543420352	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9973418394471026
0.30597014925373134		0.8959405374499714	0.0	0.9786666666666667	0.0	0.9952127659574468		
0.37540716612377845		0.6687022900763359						
77	0.0	0.9925412892914225	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9973418394471026
0.29104477611940294		0.8936535162950258	0.0	0.9770666666666666	0.0	0.9952127659574468	0.3648208469055375	
0.6641221374045801								
78	0.0	0.9914757591901971	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9968102073365231
0.27611940298507465		0.8919382504288165	0.0	0.976	0.0	0.9946808510638298	0.35423452768729646	
0.6580152671755726								
79	0.0	0.9914757591901971	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9968102073365231
0.26865671641791045		0.8890794739851343	0.0	0.9749333333333333	0.0	0.9946808510638298	0.3363192182410424	
0.6534351145038167								
80	0.0	0.9909429941395844	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9968102073365231
0.26865671641791045		0.884505431675243	0.0	0.9738666666666667	0.0	0.9946808510638298		
0.32573289902280134		0.6458015267175573						
81	0.0	0.9904102290889718	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9968102073365231
0.26865671641791045		0.8805031446540881	0.0	0.9728	0.0	0.9946808510638298	0.3143322475570033	
0.6412213740458015								
82	0.0	0.9898774640383591	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9968102073365231
0.26865671641791045		0.8759291023441966	0.0	0.9722666666666666	0.0	0.9946808510638298	0.3004885993485342	
0.6351145038167939								
83	0.0	0.9898774640383591	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9962785752259437
0.26865671641791045		0.8713550600343053	0.0	0.9712	0.0	0.9946808510638298	0.2931596091205212	
0.6244274809160305								
84	0.0	0.9893446989877464	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9962785752259437
0.25373134328358204		0.8656375071469411	0.0	0.9696	0.0	0.9946808510638298	0.28420195439739415	
0.6183206106870229								
85	0.0	0.9893446989877464	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9962785752259437
0.24626865671641796		0.8610634648370498	0.0	0.9690666666666666	0.0	0.9946808510638298	0.2760586319218241	
0.6137404580152672								
86	0.0	0.9872136387852957	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9962785752259437
0.23134328358208955		0.8570611778158947	0.0	0.9658666666666667	0.0	0.9936170212765958		
0.26302931596091206		0.6076335877862595						

87	0.0	0.986680873734683	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9962785752259437
0.22388059701492535		0.8524871355060034	0.0	0.9642666666666667		0.0	0.9930851063829788	0.254071661237785
0.5954198473282443								
88	0.0	0.985082578582845	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9962785752259437
0.20895522388059706		0.8473413379073756	0.0	0.9626666666666667		0.0	0.9925531914893617	
0.23941368078175895		0.5832061068702229						
89	0.0	0.985082578582845	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9962785752259437
0.19402985074626866		0.8433390508862207	0.0	0.9616	0.0	0.9925531914893617		0.2263843648208469
0.5740458015267176								
90	0.0	0.9840170484816196	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9962785752259437
0.19402985074626866		0.8364779874213837	0.0	0.96	0.0	0.9925531914893617		0.21824104234527686
0.5603053435114503								
91	0.0	0.9840170484816196	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9962785752259437
0.18656716417910446		0.8319039451114922	0.0	0.9584	0.0	0.9920212765957447		0.2076547231270358
0.5541984732824428								
92	0.0	0.9818859882791688	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9957469431153642
0.18656716417910446		0.8267581475128645	0.0	0.9568	0.0	0.9914893617021276		0.19951140065146578
0.5450381679389313								
93	0.0	0.9792221630261055	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9957469431153642
0.17164179104477617		0.819325328759291	0.0	0.952	0.0	0.9904255319148936		0.1824104234527687
0.5358778625954198								
94	0.0	0.9781566329248801	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9952153110047847
0.14925373134328357		0.8130360205831904	0.0	0.9504	0.0	0.9893617021276596		0.17263843648208466
0.5206106870229008								
95	0.0	0.9754928076718167	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9946836788942052
0.13432835820895528		0.8033161806746713	0.0	0.9461333333333334		0.0	0.9888297872340426	0.1620521172638436
0.4961832061068702								
96	0.0	0.9744272775705913	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9936204146730463
0.11940298507462688		0.7913093196112064	0.0	0.9424	0.0	0.9882978723404255		0.15309446254071657
0.48244274809160304								
97	0.0	0.9717634523175279	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9930887825624668
0.09701492537313428		0.7747284162378502	0.0	0.9354666666666667		0.0	0.9877659574468085	0.1392508143322475
0.46106870229007635								
98	0.0	0.9675013319126265	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9914938862307283
0.08955223880597019		0.7558604917095483	0.0	0.9274666666666667		0.0	0.9867021276595744	
0.12785016286644946		0.4442748091603053						
99	0.0	0.9627064464571125	NaN	1.0	NaN	1.0	0.0	0.9904306220095693
0.06716417910447758		0.7204116638078902	0.0	0.9104	0.0	0.9851063829787234		0.10993485342019549
0.40610687022900765								
100	0.0	0.9477890250399574	NaN	1.0	NaN	0.9989378651088688	0.0	0.9883040935672515
0.06716417910447758		0.6592338479130933	0.0	0.8757333333333334		0.0	0.9808510638297873	
0.08306188925081437		0.36946564885496186						

RDP_crossvalidate_450.txt
 taxon file RDP_train_taxonomy.txt
 train sequence file RDP_train_seqs.fasta
 word size 8
 minimum number of words for bootstrap 5
 length 450
 selectedRank NA
 trainingset size 177096
 testset size 16749

bootstrap	1-Specificity	Sensitivity	Order_Spec	Order_Sens	rootrank_Spec	rootrank_Sens	Kingdom_Spec	Kingdom_Sens	Phylum_Spec	Phylum_Sens	Genus_Spec	Genus_Sens	Family_Spec	Family_Sens	Class_Spec	Class_Sens
0	1.0	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
1	1.0	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2	1.0	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
3	1.0	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
4	1.0	1.0	NaN	1.0	0.9998744901	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
5	1.0	1.0	NaN	1.0	0.9998117351	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
6	1.0	1.0	NaN	1.0	0.9997489802	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
7	1.0	1.0	NaN	1.0	0.9975429975	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
8	1.0	1.0	NaN	1.0	0.9975429975	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
9	1.0	1.0	NaN	1.0	0.9938574938	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
10	0.9999402592	1.0	NaN	1.0	0.9938574938	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
11	0.9999402592	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
12	0.9996993277	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
13	0.9996993277	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
14	0.9996993277	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
15	0.9995791498	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
16	0.9995791498	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
17	0.9995791498	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
18	0.9995190284	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
19	0.9994589069	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
20	0.9994589069	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
21	0.9993386641	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
22	0.9993386641	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
23	0.9992785426	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
24	0.9992184212	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
25	0.9990981783	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
26	0.9989779354	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
27	0.9987975710	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
28	0.9986773282	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
29	0.9985570853	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
30	0.9984969638	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
31	0.9984969638	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
32	0.9983767209	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
33	0.8965517241	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
34	0.8706896551	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
0.9695010982	1.0	1.0	NaN	1.0	0.9914004914	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

35	1.0	0.9999402878127426	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999402949429816
0.8620689655172413		0.9981362351950941	0.8	0.9995220741979808	1.0		0.9999402878127426	0.8329238329238329
0.9678067147787889								
36	1.0	0.9999402878127426	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999402949429816
0.853448275862069		0.998015992304455	0.8	0.999402592747476	1.0		0.9999402878127426	0.8243243243243243
0.9644807028553498								
37	1.0	0.9999402878127426	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999402949429816
0.8448275862068966		0.9978356279684963	0.8	0.9992831112969711	1.0		0.9999402878127426	0.816953316953317
0.9614057106997176								
38	1.0	0.9999402878127426	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999402949429816
0.8017241379310345		0.9976552636325378	0.7	0.9992831112969711	1.0		0.9999402878127426	0.8071253071253071
0.9573266394728585								
39	1.0	0.9998805756254852	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998805898859633
0.7931034482758621		0.9969939277340227	0.7	0.9991636298464663	1.0		0.9998805756254852	0.8022113022113022
0.9546909319108879								
40	1.0	0.9998805756254852	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998805898859633
0.7931034482758621		0.996693320507425	0.7	0.999103889121214	1.0		0.9998805756254852	0.7960687960687961
0.9511139002196423								
41	1.0	0.9998208634382277	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998805898859633
0.7672413793103449		0.9964528347261468	0.7	0.9989844076707092	1.0		0.9998805756254852	0.7837837837837838
0.9450266708503294								
42	1.0	0.9998208634382277	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998805898859633
0.7586206896551724		0.9962724703901882	0.7	0.9989844076707092	1.0		0.9998805756254852	0.773955773955774
0.9405083150298086								
43	1.0	0.9998208634382277	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998805898859633
0.7241379310344828		0.9959718631635904	0.6	0.9989844076707092	1.0		0.9998805756254852	0.7628992628992629
0.9370567932224663								
44	0.5	0.9997611512509703	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998805898859633
0.7068965517241379		0.9956712559369927	0.6	0.9989844076707092	1.0		0.9998208634382277	0.7530712530712531
0.9328522121117038								
45	0.5	0.9997014390637129	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998805898859633
0.6982758620689655		0.9954908916010341	0.6	0.9989246669454567	1.0		0.9997611512509703	0.7444717444717445
0.9276435519297145								
46	0.5	0.9997014390637129	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998805898859633
0.6896551724137931		0.9951301629291168	0.4	0.9989246669454567	1.0		0.9997611512509703	0.7358722358722358
0.9225604016316284								
47	0.5	0.9997014390637129	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.999820884828945
0.6810344827586207		0.9945890699212409	0.4	0.9989246669454567	0.5		0.9997611512509703	0.7235872235872236
0.9172889865076875								
48	0.5	0.9996417268764555	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.6551724137931034		0.9942283412493237	0.4	0.9988649262202043	0.5		0.9997014390637129	0.7125307125307125
0.911327267022278								
49	0.0	0.9996417268764555	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.6379310344827587		0.9939277340227259	0.4	0.9988051854949519	0.5		0.9997014390637129	0.7076167076167077
0.90429871352369								
50	0.0	0.9996417268764555	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.6206896551724138		0.9937473696867672	0.4	0.9988051854949519	0.5		0.9997014390637129	0.6977886977886978
0.8985252588641356								
51	0.0	0.9996417268764555	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.6206896551724138		0.9933265195695304	0.4	0.9988051854949519	0.5		0.9997014390637129	0.6867321867321867
0.8913711954816442								
52	0.0	0.9996417268764555	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.603448275862069		0.9930259123429327	0.3000000000000004	0.9988051854949519	0.5		0.9997014390637129	
0.6683046683046683		0.8848446815186696						
53	0.0	0.9996417268764555	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.5775862068965517		0.9921240906631396	0.3000000000000004	0.9986259633191947	0.5		0.9997014390637129	
0.6461916461916462		0.8716033887668654						
54	0.0	0.9996417268764555	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.5775862068965517		0.9921240906631396	0.3000000000000004	0.9986259633191947	0.5		0.9997014390637129	
0.6461916461916462		0.8716033887668654						
55	0.0	0.9995223025019406	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.5775862068965517		0.9914627547646245	0.3000000000000004	0.9985662225939423	0.5		0.9997014390637129	
0.6351351351351351		0.8638217759648572						
56	0.0	0.9995223025019406	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.5603448275862069		0.9908014188661095	0.3000000000000004	0.9985064818686898	0.5		0.9997014390637129	
0.6216216216216216		0.8556008785691873						
57	0.0	0.9995223025019406	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.5517241379310345		0.9902002044129141	0.3000000000000004	0.9984467411434375	0.5		0.9996417268764555	
0.6154791154791155		0.848635080012551						
58	0.0	0.9995223025019406	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.5344827586206897		0.9893585041784404	0.1999999999999996	0.9982675189676803	0.5		0.9996417268764555	
0.597051597051597		0.8413555067461562						
59	0.0	0.9995223025019406	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.5258620689655172		0.9883364396080082	0.1999999999999996	0.9982077782424279	0.5		0.9996417268764555	
0.5786240786240786		0.8277376843426419						
60	0.0	0.9995223025019406	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.5258620689655172		0.9883364396080082	0.1999999999999996	0.9982077782424279	0.5		0.9996417268764555	
0.5786240786240786		0.8277376843426419						
61	0.0	0.9995223025019406	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.5172413793103448		0.9874947393735345	0.1999999999999996	0.9981480375171755	0.5		0.9996417268764555	
0.5687960687960688		0.8203953561342956						
62	0.0	0.9994625903146832	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.4913793103448276		0.9867732820296999	0.1999999999999996	0.9981480375171755	0.5		0.9996417268764555	
0.5601965601965602		0.8129902729839975						
63	0.0	0.9994028781274258	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.48275862068965514		0.985570853123309	0.1999999999999996	0.9979090746161658	0.5		0.9996417268764555	
0.55528255282553		0.8048321305302792						

64	0.0	0.9994028781274258	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.47413793103448276		0.984909517224794	0.19999999999999996		0.9978493338909135		0.5	0.9996417268764555
0.5503685503685504		0.796485723250706						
65	0.0	0.9994028781274258	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.4568965517241379		0.9843684242169182	0.19999999999999996		0.9978493338909135		0.5	0.9996417268764555
0.5393120393120393		0.7884530906808911						
66	0.0	0.9991640293783961	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.4568965517241379		0.9834064810918054	0.19999999999999996		0.9977298524404086		0.5	0.9996417268764555
0.5331695331695332		0.780859742704738						
67	0.0	0.9991043171911387	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.43965517241379315		0.9829255095292491	0.19999999999999996		0.9976701117151562		0.5	0.9996417268764555
0.5245700245700246		0.7731408848446815						
68	0.0	0.9990446050038813	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.4224137931034483		0.9818433235134972	0.19999999999999996		0.9976103709899038		0.5	0.999582014689198
0.5147420147420148		0.7654847819265768						
69	0.0	0.9989848928166238	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.4224137931034483		0.9809415018337041	0.19999999999999996		0.9974311488141466		0.5	0.9995223025019406
0.5098280098280099		0.7579541888923753						
70	0.0	0.9989848928166238	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.4224137931034483		0.98015992304455	0.19999999999999996		0.9973714080888942		0.5	0.9995223025019406
0.5012285012285012		0.7494822717288987						
71	0.0	0.9989848928166238	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997611797719267
0.4137931034482759		0.9795587805913545	0.19999999999999996		0.9973116673636417		0.5	0.9994625903146832
0.4926289926289926		0.7412613743332287						
72	0.0	0.9989848928166238	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997014747149083
0.4051724137931034		0.9789574941381591	0.09999999999999998		0.9972519266383894		0.5	0.9994625903146832
0.48157248157248156		0.7338562911829306						
73	0.0	0.9989251806293664	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997014747149083
0.39655172413793105		0.9778753081224073	0.09999999999999998		0.9971324451878846		0.5	0.9994028781274258
0.4680589680589681		0.7271415123941011						
74	0.0	0.9989251806293664	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.99964176965789
0.3879310344827587		0.976733000661336	0.09999999999999998		0.9970129637373798		0.5	0.9994028781274258
0.4631449631449631		0.7191088798242862						
75	0.0	0.9989251806293664	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.99964176965789
0.3706896551724138		0.9758311789815427	0.09999999999999998		0.9969532230121274		0.5	0.9993431659401684
0.45945945945945943		0.7122685911515532						
76	0.0	0.9988057562548516	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.99964176965789
0.3620689655172413		0.9749894787470691	0.09999999999999998		0.9968934822868749		0.5	0.9993431659401684
0.4533169533169533		0.7053655475368685						
77	0.0	0.9987460440675942	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.99964176965789
0.3620689655172413		0.9734864426140805	0.09999999999999998		0.9967142601111177		0.5	0.9993431659401684
0.4434889434889435		0.6964543457797302						
78	0.0	0.9986863318803367	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9995820646008717
0.35344827586206895		0.9725244994889677	0.09999999999999998		0.996594778660613		0.5	0.9992834537529109
0.4373464373464373		0.6868528396611233						
79	0.0	0.9986863318803367	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9995820646008717
0.3448275862068966		0.9713821920278963	0.09999999999999998		0.996594778660613		0.5	0.9992834537529109
0.42874692874692877		0.678694697207405						
80	0.0	0.9986266196930793	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9995223595438534
0.3275862068965517		0.970239884566825	0.09999999999999998		0.9964752972101081		0.5	0.9992237415656535
0.4201474201474201		0.6709758393473486						
81	0.0	0.9986266196930793	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9995223595438534
0.31034482758620685		0.968917212769795	0.09999999999999998		0.9963558157596033		0.5	0.9992237415656535
0.4103194103194103		0.6630687166614371						
82	0.0	0.9985669075058219	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9995223595438534
0.2931034482758621		0.967714783863404	0.09999999999999998		0.9963558157596033		0.5	0.9992237415656535
0.3918918918918919		0.6551615939755255						
83	0.0	0.9985669075058219	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9995223595438534
0.2931034482758621		0.9658510190584981	0.09999999999999998		0.9962363343090985		0.5	0.9992237415656535
0.3857493857493858		0.6458738625666771						
84	0.0	0.998447483131307	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9995223595438534
0.2844827586206896		0.9645283472614682	0.09999999999999998		0.9960571121333412		0.5	0.9991640293783961
0.37960687960687955		0.6370881706934421						
85	0.0	0.9983877709440497	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.999462654486835
0.27586206896551724		0.9622437323393255	0.0		0.9958778899575841		0.5	0.9991640293783961
0.6278631942265454								0.3685503685503686
86	0.0	0.9983280587567923	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.999462654486835
0.26724137931034486		0.9605603318703781	0.0		0.9956986677818269		0.5	0.9991043171911387
0.35626535626535627		0.6190775023533103						
87	0.0	0.9982086343822775	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.999462654486835
0.2586206896551724		0.9592376600733482	0.0		0.9956389270565744		0.5	0.9991043171911387
0.610290555381237								0.3476658476658476
88	0.0	0.9982086343822775	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.999462654486835
0.24137931034482762		0.9571935309324836	0.0		0.9955194456060696		0.5	0.9991043171911387
0.33415233415233414		0.6004392845936618						
89	0.0	0.9982086343822775	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.999462654486835
0.23275862068965514		0.9553297661275777	0.0		0.9952804827050601		0.5	0.9989848928166238
0.5887041104486979								0.3255528255528255
90	0.0	0.9982086343822775	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9993432443727984
0.22413793103448276		0.9526844225335177	0.0		0.994981779078798		0.0	0.9989848928166238
0.577533730781299								0.3157248157248157
91	0.0	0.9982086343822775	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9992238342587617
0.2068965517241379		0.9494378644862622	0.0		0.994683075452536		0.0	0.9989848928166238
0.5644179479133982								0.3058968058968059
92	0.0	0.99814892219502	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9992238342587617
0.19827586206896552		0.9464919136656045	0.0		0.9942648903757692		0.0	0.9989251806293664
0.28746928746928746		0.5513021650454973						

93	0.0	0.9977309368842181	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9991641292017434
0.18103448275862066		0.9431251127277099	0.0	0.9937272238484975		0.0	0.9987460440675942	0.2788697788697788
0.5374333228741763								
94	0.0	0.9976115125097033	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.99892530897367
0.1637931034482759		0.9393975831178981	0.0	0.9933090387717307		0.0	0.9986266196930793	0.2702702702702703
0.5223093818638218								
95	0.0	0.997432375947931	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.99892530897367
0.13793103448275867		0.9344075031563759	0.0	0.992472668618197		0.0	0.9986266196930793	
0.25429975429975427		0.5053027925949168						
96	0.0	0.9972532393861587	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9988656039166517
0.1293103448275862		0.9294174231948537	0.0	0.991576557739411		0.0	0.9985071953185645	0.2371007371007371
0.48622529024160654								
97	0.0	0.9967755418880994	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9986267836885784
0.11206896551724133		0.9232249143269404	0.0	0.9901427803333532		0.0	0.9983280587567923	
0.21498771498771496		0.4645120803263257						
98	0.0	0.9963575565772974	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9985670786315601
0.09482758620689657		0.912162568388144	0.0	0.9884102993010335		0.0	0.99814892219502	
0.19164619164619168		0.4365861311578287						
99	0.0	0.9957604347047232	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9983879634605051
0.051724137931034475		0.8953886851439908	0.0	0.9851245594121513		0.0	0.9977906490714755	
0.17321867321867324		0.3996862252902416						
100	0.0	0.9931330984653968	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9978506179473401
0.051724137931034475		0.863103469007395	0.0	0.9738335623394468		0.0	0.9968949662626142	
0.14250614250614246		0.3466582993410731						

SILVA_crossvalidate_450.txt
taxon file SILVA_train_taxonomy.txt
train sequence file SILVA_train_seqs.fasta
word size 8
minimum number of words for bootstrap 5
length 450
selectedRank NA
trainingset size 197897
testset size 21944

bootstrap	1-Specificity	Sensitivity		Kingdom_Spec			Kingdom_Sens				
bootstrap	Order_Spec	Order_Sens	rootrank_Spec	rootrank_Sens		Kingdom_Spec	Kingdom_Sens				
Phylum_Spec	Phylum_Sens		Genus_Spec	Genus_Sens	Family_Spec	Family_Sens	Class_Spec				
Class_Sens	Species_Spec	Species_Sens									
0	1.0	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0
1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
1	1.0	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0
1.0	1.0	1.0	1.0	0.9998156002212797	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0
2	1.0	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0
1.0	1.0	1.0	1.0	0.9998156002212797	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0
3	1.0	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0
1.0	1.0	1.0	1.0	0.9997695002765997	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	1.0	1.0
4	1.0	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	0.9999543982853756	
1.0	1.0	1.0	1.0	0.9996312004425595	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	0.9999543982853756	
5	1.0	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	0.9999543982853756	
1.0	1.0	1.0	1.0	0.9995851004978794	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	0.9999543982853756	
6	1.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	0.99995442738003	
0.999908796570751	1.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9994929006085193	1.0	0.99995442738003	
7	1.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	1.0	1.0	0.99995442738003	
0.999908796570751	1.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	0.996031746031746	0.9991241010510787	1.0	0.99995442738003	
8	1.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999544294567991	1.0	0.99995442738003	
0.999908796570751	1.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	0.9920634920634921	0.9989858012170385	1.0	0.99995442738003	
9	1.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999544294567991	1.0	0.99995442738003	
0.9998631948561266	1.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	0.9920634920634921	0.9988014014383183	1.0	0.99995442738003	
10	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999544294567991	1.0	0.99995442738003	
0.9333333333333333	0.0	0.9998631948561266	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9841269841269842	0.9841269841269842	
0.9986631016042781	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
11	0.0	0.9998631948561266	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9841269841269842	0.9841269841269842	
0.9333333333333333	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
0.9981560022127973	0.0	0.9998175931415021	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9841269841269842	0.9841269841269842	
12	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
0.9333333333333333	0.0	0.9998175931415021	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9722222222222222	0.9722222222222222	
0.9980177023787572	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
13	0.0	0.9998175931415021	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9722222222222222	0.9722222222222222	
0.9333333333333333	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
0.9975106029872765	0.0	0.9998175931415021	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9682539682539683	0.9682539682539683	
14	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
0.9333333333333333	0.0	0.9997719914268777	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9682539682539683	0.9682539682539683	
0.9972801032638761	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
15	0.0	0.9997263897122531	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9682539682539683	0.9682539682539683	
0.9333333333333333	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
0.9964503042596349	0.0	0.9997263897122531	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9682539682539683	0.9682539682539683	
16	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
0.9333333333333333	0.0	0.9997263897122531	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9682539682539683	0.9682539682539683	
0.995804905034114	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
17	0.0	0.9997263897122531	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9682539682539683	0.9682539682539683	
0.9333333333333333	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
0.9953900055319934	0.0	0.9997263897122531	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9682539682539683	0.9682539682539683	
18	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
0.9333333333333333	0.0	0.9997263897122531	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9682539682539683	0.9682539682539683	
0.9946524064171123	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
19	0.0	0.9997263897122531	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9682539682539683	0.9682539682539683	
0.9333333333333333	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
0.9940070071915914	0.0	0.9997263897122531	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9642857142857143	0.9642857142857143	
20	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
0.9333333333333333	0.0	0.9996351862830043	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9642857142857143	0.9642857142857143	
0.9931311082426701	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
21	0.0	0.9996351862830043	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9563492063492064	0.9563492063492064	
0.9333333333333333	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
0.992301309238429	0.0	0.9997263897122531	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9563492063492064	0.9563492063492064	
22	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
0.9333333333333333	0.0	0.9995895845683798	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9563492063492064	0.9563492063492064	
0.9912871104554675	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
23	0.0	0.9996351862830043	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9563492063492064	0.9563492063492064	
0.9333333333333333	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
0.9901807117831458	0.0	0.9997263897122531	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9563492063492064	0.9563492063492064	
24	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
0.9333333333333333	0.0	0.999407177098819	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9484126984126984	0.9484126984126984	
0.9888438133874239	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
25	0.0	0.999703725660085	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9365079365079365	0.9365079365079365	
0.8666666666666667	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
0.987553014936382	0.0	0.9992703725660085	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9246031746031746	0.9246031746031746	
26	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
0.8666666666666667	0.0	0.9992703725660085	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9246031746031746	0.9246031746031746	
0.9866310160427807	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	1.0	0.99995442738003	
27	0.0	0.9992703725660085	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.9246031746031746	0.9246031746031746	
0.9992703725660085	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	0.99995442738003	
	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.99995442738003	0.0	0.9206349206349207	0.985432417481099	0.985432417481099	

28	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
0.9991791691367595	0.0	0.99995442738003	0.0	0.0	0.99995442738003	0.0	0.9166666666666666	0.9839111193066569		
29	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
0.9989511605636372	0.0	0.99995442738003	0.0	0.0	0.99995442738003	0.0	0.9087301587301587	0.9822515212981744		
30	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
0.9988599571343882	0.0	0.99995442738003	0.0	0.0	0.99995442738003	0.0	0.9087301587301587	0.9796699243960907		
31	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
0.9986775502758903	0.0	0.99995442738003	0.0	0.0	0.99995442738003	0.0	0.9047619047619048	0.9780103263876083		
32	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
0.998449541702768	0.0	0.99995442738003	0.0	0.0	0.99995442738003	0.0	0.9007936507936508	0.9761202286557256		
33	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
0.998358338273519	0.0	0.99995442738003	0.0	0.0	0.99995442738003	0.0	0.8928571428571429	0.9745067305919233		
34	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
0.9981759314150213	0.0	0.99995442738003	0.0	0.0	0.99995442738003	0.0	0.8809523809523809	0.9728010326387608		
35	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
0.9981303297003967	0.0	0.99995442738003	0.0	0.0	0.99995442738003	0.0	0.8650793650793651	0.9697584362898765		
36	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
0.9979479228418988	0.0	0.99995442738003	0.0	0.0	0.99995442738003	0.0	0.8531746031746031	0.9675917388899133		
37	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
0.9977199142687765	0.0	0.99995442738003	0.0	0.0	0.99995442738003	0.0	0.8531746031746031	0.9653328416005901		
38	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
0.9975735074102786	0.0	0.9999088547600602	0.0	0.0	0.99995442738003	0.0	0.8492063492063492	0.9625668449197861		
39	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
0.7333333333333334	0.9972182954079073	0.0	0.9999088547600602	0.0	0.99995442738003	0.8293650793650793				
0.9592015489581412	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
40	0.0	0.9972182954079073	0.0	0.9999088547600602	0.0	0.8174603174603174				
0.7333333333333334	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8		
0.95559653328416	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
41	0.0	0.99995442738003	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
0.7333333333333334	0.9971726936932829	0.0	0.9999088547600602	0.0	0.99995442738003	0.8174603174603174				
0.9521943573667712	0.0	0.9999088547600602	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
42	0.0	0.9970814902640339	0.0	0.9998632821400902	0.0	0.8095238095238095				
0.7333333333333334	0.9998632821400902	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8		
0.9498893601327678	0.9967622782616626	0.0	0.9997721369001504	0.0	0.99995442738003	0.7936507936507937				
43	0.0	0.9998632821400902	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
0.6666666666666667	0.9961694559715445	0.0	0.9998609916602105	0.0	0.99995442738003	0.7896825396825397				
0.9467084639498433	0.0	0.9998632821400902	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
44	0.0	0.9961694559715445	0.0	0.9998609916602105	0.0	0.99995442738003	0.7896825396825397			
0.6666666666666667	0.9998632821400902	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8		
0.9429282684860778	0.9960782525422955	0.0	0.9996354190402407	0.0	0.99995442738003	0.7777777777777778				
45	0.0	0.9998632821400902	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
0.6666666666666667	0.9960782525422955	0.0	0.9996354190402407	0.0	0.99995442738003	0.7777777777777778				
0.9389636732435921	0.9998632821400902	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8		
46	0.0	0.9955766336814265	0.0	0.9996354190402407	0.0	0.99995442738003	0.7777777777777778			
0.6666666666666667	0.9998632821400902	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8		
0.9347685782777061	0.9953030233936796	0.0	0.9996354190402407	0.0	0.99995442738003	0.7619047619047619				
47	0.0	0.9998632821400902	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
0.6666666666666667	0.9953030233936796	0.0	0.9996354190402407	0.0	0.99995442738003	0.7619047619047619				
0.9307578830905403	0.9998632821400902	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8		
48	0.0	0.9945733959596881	0.0	0.9995898464202707	0.0	0.99995442738003	0.7579365079365079			
0.6666666666666667	0.9998632821400902	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8		
0.9267010879586944	0.9942085822426924	0.0	0.9995898464202707	0.0	0.99995442738003	0.746031746031746				
49	0.0	0.9998632821400902	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
0.6666666666666667	0.9942085822426924	0.0	0.9995898464202707	0.0	0.99995442738003	0.746031746031746				
0.921537894154527	0.9998632821400902	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8		
50	0.0	0.993524565233253	0.0	0.9995898464202707	0.0	0.99995442738003	0.7420634920634921			
0.6666666666666667	0.9998632821400902	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8		
0.9150839018993178	0.9927037256600848	0.0	0.9995898464202707	0.0	0.99995442738003	0.7341269841269842				
51	0.0	0.9998632821400902	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
0.6666666666666667	0.9927037256600848	0.0	0.9995898464202707	0.0	0.99995442738003	0.7341269841269842				
0.9092292089249493	0.9998632821400902	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.6		
52	0.0	0.9995442738003008	0.0	0.99995442738003	0.0	0.7222222222222222	0.9035589157293011			
0.9922021067992156	0.0	0.9998632821400902	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.6	
53	0.0	0.9994987011803309	0.0	0.9999088547600602	0.0	0.6785714285714286	0.8921722293933247			
0.9913356742213507	0.0	0.9998632821400902	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.6	
54	0.0	0.9994987011803309	0.0	0.9999088547600602	0.0	0.6785714285714286	0.8921722293933247			
0.9913356742213507	0.0	0.9997721369001504	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.6	
55	0.0	0.9909252587897305	0.0	0.999453128560361	0.0	0.9999088547600602	0.6746031746031746			
0.4666666666666667	0.9997721369001504	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8		
0.8851189378572746	0.9901500296411145	0.0	0.999453128560361	0.0	0.9999088547600602	0.6706349206349207				
56	0.0	0.9997721369001504	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
0.4666666666666667	0.9901500296411145	0.0	0.999453128560361	0.0	0.9999088547600602	0.6706349206349207				
0.8780656463212244	0.9997721369001504	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8		
57	0.0	0.9892379953486251	0.0	0.99940755940391	0.0	0.6666666666666667				
0.4666666666666667	0.9997721369001504	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8		
0.8717960538447354	0.988645173058507	0.0	0.99940755940391	0.0	0.9999088547600602	0.6547619047619048				
58	0.0	0.9997721369001504	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088589135983	0.8	
0.4666666666666667	0.98651576618108058	0.0	0.99940755940391	0.0	0.9999088547600602	0.6547619047619048				
0.8651576618108058	0.9997721369001504	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088547600602	0.6150793650793651		
59	0.0	0.9871403164758995	0.0	0.9992708380804812	0.0	0.9999088547600602	0.6150793650793651			
0.4666666666666667	0.9997721369001504	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088547600602	0.6150793650793651		
0.851373778351466	0.9871403164758995	0.0	0.9992708380804812	0.0	0.9999088547600602	0.6150793650793651				
60	0.0	0.9997721369001504	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088547600602	0.6150793650793651	
0.4666666666666667	0.9871403164758995	0.0	0.9992708380804812	0.0	0.9999088547600602	0.6150793650793651				
0.851373778351466	0.9997721369001504	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9999088547600602	0.5992063492063492		
61	0.0	0.9865018924711569	0.0	0.9992252654605113	0.0	0.9999088547600602	0.5992063492063492			
0.4666666666666667	0.8444587866494561									

62	0.0	0.9997721369001504	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998632883703974	
0.4666666666666667		0.9858178667517898	0.0	0.9991796928405414	0.0	0.9999088547600602	0.5992063492063492		
0.8359763968283238									
63	0.0	0.9997721369001504	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998632883703974	
0.4666666666666667		0.984951434173925	0.0	0.9991341202205715	0.0	0.9999088547600602	0.5912698412698413		
0.8283238060114327									
64	0.0	0.9997721369001504	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998632883703974	
0.4666666666666667		0.984176205025309	0.0	0.9990429749806317	0.0	0.9999088547600602	0.5714285714285714		
0.820855614973262									
65	0.0	0.9997721369001504	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998632883703974	
0.4666666666666667		0.9838113913083132	0.0	0.9989518297406917	0.0	0.9999088547600602	0.5634920634920635		
0.8132952240457312									
66	0.0	0.9997265642801805	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998632883703974	0.4
0.9830361621596972		0.0	0.9989062571207219	0.0	0.9999088547600602	0.5595238095238095	0.806979531624562		
67	0.0	0.9996809916602105	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998632883703974	0.4
0.9823065347257057		0.0	0.9988606845007519	0.0	0.9999088547600602	0.5396825396825398	0.7984049419140697		
68	0.0	0.9996809916602105	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998632883703974	0.4
0.9814401021478407		0.0	0.9988606845007519	0.0	0.9999088547600602	0.5277777777777778	0.7901069518716578		
69	0.0	0.9996809916602105	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998632883703974	0.4
0.9808472798577227		0.0	0.998815111880782	0.0	0.9999088547600602	0.5238095238095238	0.7825465609441269		
70	0.0	0.9996809916602105	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998632883703974	
0.3333333333333333		0.979524830133613	0.0	0.9987239666408422	0.0	0.9999088547600602			
0.49603174603174605		0.773603171676194							
71	0.0	0.9996809916602105	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998632883703974	
0.3333333333333333		0.9785215924118746	0.0	0.9987239666408422	0.0	0.9998632821400902			
0.48809523809523814		0.7665037801954637							
72	0.0	0.9996809916602105	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998177178271965	
0.3333333333333333		0.9778375666925077	0.0	0.9987239666408422	0.0	0.9998632821400902	0.4841269841269841		
0.759727088327494									
73	0.0	0.9996809916602105	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998177178271965	
0.3333333333333333		0.9773359478316385	0.0	0.9987239666408422	0.0	0.9998632821400902			
0.47619047619047616		0.7538723953531256							
74	0.0	0.9996809916602105	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998177178271965	
0.1999999999999999		0.9765607186830225	0.0	0.9987239666408422	0.0	0.9998632821400902			
0.46031746031746035		0.747234003319196							
75	0.0	0.9996809916602105	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998177178271965	
0.1333333333333333		0.975831091249031	0.0	0.9985872487809324	0.0	0.9998632821400902			
0.44047619047619047		0.7397197123363451							
76	0.0	0.9996809916602105	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998177178271965	
0.1333333333333333		0.9751470655296639	0.0	0.9985872487809324	0.0	0.9998632821400902	0.4285714285714286		
0.7322515212981744									
77	0.0	0.9996354190402407	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998177178271965	
0.1333333333333333		0.974371836381048	0.0	0.9985416761609625	0.0	0.9998632821400902	0.4126984126984127		
0.7251060298727642									
78	0.0	0.9996354190402407	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998177178271965	
0.1333333333333333		0.9738246158055542	0.0	0.9984961035409926	0.0	0.9998632821400902			
0.40476190476190477		0.7176839387792735							
79	0.0	0.9995898464202707	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998177178271965	
0.0666666666666667		0.9727757763691914	0.0	0.9984505309210226	0.0	0.9998632821400902	0.4007936507936508		
0.7108611469666236									
80	0.0	0.9995898464202707	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998177178271965	
0.0666666666666667		0.9719093437913265	0.0	0.9983593856810828	0.0	0.9998632821400902	0.3849206349206349		
0.7046376544348146									
81	0.0	0.9995442738003008	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998177178271965	
0.0666666666666667		0.9707236992110904	0.0	0.9983138130611129	0.0	0.9998632821400902	0.373015873015873		
0.6970311635626038									
82	0.0	0.9995442738003008	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998177178271965	
0.0666666666666667		0.9691732409138584	0.0	0.9982682404411429	0.0	0.9998632821400902			
0.36904761904761907		0.6901622718052738							
83	0.0	0.9994987011803309	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998177178271965	
0.0666666666666667		0.9685348169091158	0.0	0.998226678211731	0.0	0.9998632821400902	0.3650793650793651		
0.681218882537341									
84	0.0	0.999453128560361	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998177178271965	
0.0666666666666667		0.9672123671850061	0.0	0.9979948047213234	0.0	0.9998632821400902	0.3571428571428571		
0.6711690945970865									
85	0.0	0.999407555940391	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998177178271965	
0.0666666666666667		0.9652058917415295	0.0	0.9978580868614136	0.0	0.9998632821400902			
0.35317460317460314		0.6621796053844735							
86	0.0	0.999407555940391	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998177178271965	
0.0666666666666667		0.9639746454466688	0.0	0.9976757963815339	0.0	0.9998632821400902			
0.34523809523809523		0.6528213166144201							
87	0.0	0.999407555940391	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998177178271965	
0.0666666666666667		0.9624241871494368	0.0	0.9974479332816844	0.0	0.9998177095201203	0.3412698412698413		
0.6440162271805274									
88	0.0	0.9993164107004512	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9998177178271965	
0.0666666666666667		0.9604633134205847	0.0	0.997083352321925	0.0	0.9998177095201203			
0.3333333333333333		0.6330905402913517							
89	0.0	0.9993164107004512	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997721472839957	
0.0666666666666667		0.958365634547859	0.0	0.9969010618420453	0.0	0.9998177095201203			
0.31746031746031744		0.622257053291536							
90	0.0	0.9992708380804812	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997721472839957	
0.0666666666666667		0.9564503625336312	0.0	0.9963541904024062	0.0	0.9998177095201203	0.3055555555555556		
0.612529964964042									
91	0.0	0.9991796928405414	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997721472839957	
0.0666666666666667		0.9548087008071503	0.0	0.9960351820626168	0.0	0.9998177095201203			
0.29761904761904767		0.601834777982667							
92	0.0	0.9991341202205715	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997721472839957	
0.0666666666666667		0.9518901910711842	0.0	0.9955794558629175	0.0	0.9998177095201203	0.2936507936507936		
0.5895260925686889									

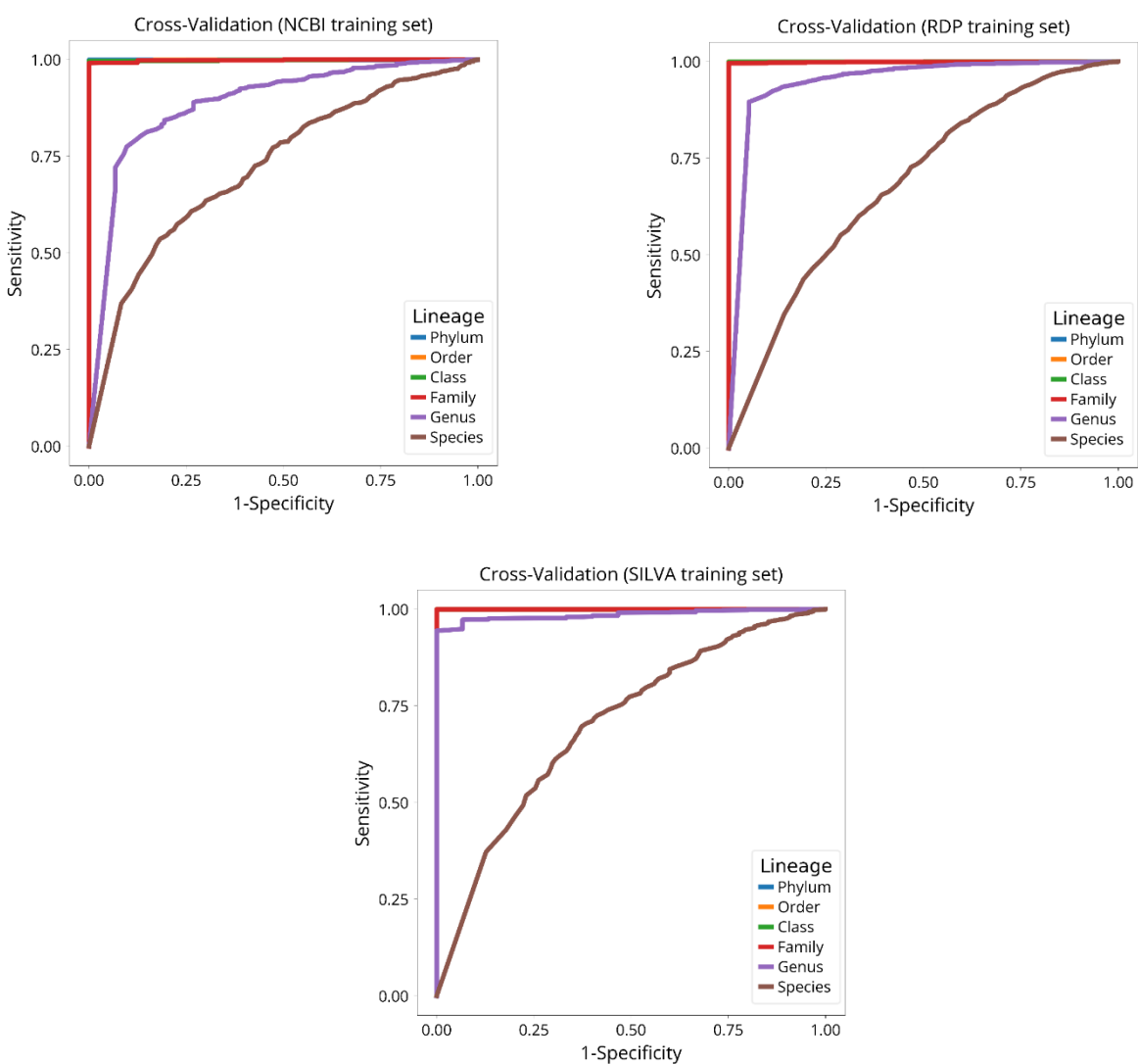
93	0.0	0.9991341202205715	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997721472839957	
0.06666666666666665		0.948561265903598	0.0	0.9949870118033086		0.0	0.9998177095201203	0.2857142857142857	
0.5726996127604647									
94	0.0	0.9991341202205715	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997721472839957	0.0
0.9444115098727712		0.0	0.9946224308435492	0.0	0.9998177095201203		0.26190476190476186	0.5578093306288032	
95	0.0	0.9991341202205715	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997721472839957	0.0
0.9393953212640795		0.0	0.9934831153443011	0.0	0.9998177095201203		0.25396825396825395	0.537479255024894	
96	0.0	0.9990429749806317	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9997721472839957	0.0
0.933330293219025		0.0	0.9924805177049628	0.0	0.9997721369001504		0.23015873015873012	0.5183016780379863	
97	0.0	0.9989062571207219	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.999635435654393	0.0
0.9262620274522322		0.0	0.9902474593264367	0.0	0.9996809916602105		0.2222222222222222		
0.49253180896182924									
98	0.0	0.9988606845007519	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9995442945679912	0.0
0.9150440056546126		0.0	0.9871029485485121	0.0	0.9995898464202707		0.20238095238095233	0.4651484418218698	
99	0.0	0.9984961035409926	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.9994987240247903	0.0
0.8994938209676684		0.0	0.9814975162922116	0.0	0.9994987011803309		0.1785714285714286		
0.42960538447353863									
100	0.0	0.9976757963815339	NaN	1.0	NaN	1.0	NaN	0.999270871308786	0.0
0.8722695973368598		0.0	0.969056191040423	0.0	0.9991796928405414		0.12698412698412698		
0.37239535312557626									

También se muestran las figuras originales que se obtuvieron con los resultados de los archivos

NCBI_Sensitivity_Specificity_ROC_450.png

RDP_Sensitivity_Specificity_ROC_450.png

SILVA_Sensitivity_Specificity_ROC_450.png



11. PRODUCTOS GENERADOS DE ESTE PROYECTO DE INVESTIGACION

Artículo científico publicado en la revista *Food Control* (2021).

Aguilar-Alvarez, M. E., Saucedo-Castañeda, G., Durand, N., Perraud-Gaime, I., González-Robles, R. O., Rodríguez-Serrano, G. M. (2021). The variety, roasting, processing, and type of cultivation determine the low OTA levels of commercialized coffee in Chiapas State, Mexico. *Food Control*, 126, 108088. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108088>

Eventos científicos especializados

1. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología (2018). Aislamiento de hongos filamentosos productores de ocratoxina A presentes en granos de café de Chiapas procesados por la vía natural. (Cartel).
2. XL Encuentro Nacional de la AMIDIC “Retos de la Ingeniería química para el desarrollo Nacional (2019). Cuantificación de la presencia de ocratoxina A en muestras de cafés comercializados en Chiapas (ID. 747). (Cartel y resumen in extenso).
3. E-Latin Food 2020: 9TH Food Science, Biotechnology & Safety. Isolation and identification of bacteria in coffee beans from Chiapas-México. Cartel.
4. XIX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería (2021). Impacto del cultivo y procesamiento de *Coffea arabica* en la microbiota asociada con el contenido de ocratoxina A mediante secuenciación masiva de nueva generación (NGS). (Cartel y presentación virtual).
5. XXV Congreso Latinoamericano de microbiología ALAM (2021). Evaluación de la diversidad microbiana y contenido de Ocratoxina A en cerezas de *Coffea canephora* durante el procesamiento seco, desde la cosecha y en diferentes tiempos de secado usando secuenciación masiva de nueva generación. (Cartel y presentación virtual).
6. Simposio: Perspectivas en Biotecnología. Posgrado de Biotecnología UAM-Iztapalapa(2021). Identificación de la microbiota en *Coffea arabica* y *Coffea canephora* mediante NGS y la prevalencia de ocratoxina A en café comercializado en Chiapas. (cartel y presentación virtual).



Food Control

Volume 126, August 2021, 108088



The variety, roasting, processing, and type of cultivation determine the low OTA levels of commercialized coffee in Chiapas State, Mexico

Maria Eugenia Aguilar-Alvarez ^a ✉, Gerardo Saucedo-Castañeda ^a ✉, Noel Durand ^{b, c} ✉, Isabelle Perraud-Gaime ^d ✉, Rosa Obdulia González-Robles ^e ✉, Gabriela Mariana Rodríguez-Serrano ^a 👤 ✉

Show more ▾

+ Add to Mendeley 🔗 Share 🗒 Cite

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108088>

Get rights and content

Se otorga el presente certificado a:

María E Aguilar-Álvarez (autor), Gerardo Saucedo-Castañeda, Noël Durand, Isabelle Perraud, Aurea I Morales-Estrada, Luis F Jiménez-Santiago, Isabel Champion-Martínez, Gabriela Rodríguez-Serrano

Por haber participado como expositor en el XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología 2018 realizado del 13 al 16 de Noviembre de 2018, Santiago, Chile.
Presentando el trabajo titulado:

Aislamiento de hongos filamentosos productores de Ocratoxina A presentes en granos de café de Chiapas procesados por vía natural.

[Signature]
Dra. Claudia Saavedra
Presidenta
Comité Organizador ALAM 2018

[Signature]
Dr. Renato Chavez
Comité Organizador
ALAM 2018





SIMPOSIO DE PERSPECTIVAS EN BIOTECNOLOGÍA 2021



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa



Institut de Recherche
pour le Développement
Editions
FRANCE

El Posgrado en Biotecnología de la UAM agradece a los coautores:

Aguilar-Alvarez M.E, Zúñiga-León E., Saucedo-Castañeda G., Durand N.,
González-Robles R.O, Serrato-Díaz A., Perraud-Gaime I., Fernández-
Perrino F.J., Rodríguez-Serrano G.M

Quienes presentaron el trabajo:
Identificación de la microbiota en *Coffea arabica* y *Coffea canephora*
mediante NGS Y la prevalencia de la ocratoxina a en café
comercializado en Chiapas

Modalidad Virtual
5 de noviembre de 2021





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
CASA ABIERTA AL TIEMPO
POSGRADO
BIOTECNOLOGÍA



Dr. Octavio Loera Corral
Coordinador del Posgrado en Biotecnología



Dra. Sara Lucía Camargo Ricalde
Directora
División de Ciencias Biológicas y de la Salud