

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



ESCUELA DE POSGRADO

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO
EN GESTIÓN PARA EL DESARROLLO SUSTENTABLE**

**ECOLOGÍA MICROBIANA DE LA FERMENTACIÓN DEL
CACAO FINO DE AROMA DE AMAZONAS, PERÚ**

Autora: Bach. Rosmery Yakelini Ayala Tocto

**Asesores: Ph.D. Martha Steffany Calderón Ríos
Ph.D. Danilo Edson Bustamante Mostajo**

Registro:

CHACHAPOYAS - PERÚ

2022



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 6-H

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS DE MAestrÍA (X)/DOCTORADO () EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM

1. Datos de autor 1

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): Ayala Tacto Rosmery Yakelini
DNI N°: 74455811
Correo electrónico: rosmery.ayala.epg@untrm.edu.pe
Nombre de la Maestría (X) / Doctorado (): Gestión para el desarrollo sustentable

Datos de autor 2

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): _____
DNI N°: _____
Correo electrónico: _____
Nombre de la Maestría () / Doctorado (): _____

2. Título para obtener el grado académico de Maestro (X) / Doctor ()

Ecología microbiana de la fermentación del cacao fino de aroma de Amazonas, Perú.

3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: Ph.D. Calderón Ríos Martha Steffany
DNI, Pasaporte, C.E N°: 44890495
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) (<https://orcid.org/0000-0003-3611-140x>).

Datos de asesor 2

Apellidos y nombres: Ph.D. Ruestamante Mostajo Danilo Edson
DNI, Pasaporte, C.E N°: 43496105
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) (<https://orcid.org/0000-0002-5979-6993>).

4. Campo del conocimiento según Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos- OCDE (ejemplo: Ciencias médicas, Ciencias de la Salud-Medicina básica-Immunología)

https://catalogos.conytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html
1.06.01. Biología celular, Microbiología; 1.06.03. Bioquímica, Biología Molecular; 2.09.01. Biotecnología industrial; 2.09.02. Tecnologías de bioprocesamiento, fermentación.

5. Originalidad del Trabajo

Con la presentación de esta ficha, el(la) autor(a) o autores(as) señalan expresamente que la obra es original, ya que sus contenidos son producto de su directa contribución intelectual. Se reconoce también que todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal.

6. Autorización de publicación

El(los) titular(es) de los derechos de autor otorga a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), la autorización para la publicación del documento indicado en el punto 2, bajo la *Licencia creative commons* de tipo BY-NC: Licencia que permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial por lo que la Universidad deberá publicar la obra poniéndola en acceso libre en el repositorio institucional de la UNTRM y a su vez en el Registro Nacional de Trabajos de Investigación -RENATI, dejando constancia que el archivo digital que se está entregando, contiene la versión final del documento sustentado y aprobado por el Jurado Evaluador.

Chachapoyas, 12 de diciembre, 2022

Firma del autor 1

Firma del autor 2

Firma del Asesor 1

Firma del Asesor 2

Dedicatoria

A mi madre Mirtha Tocto Huaman por creer en mí, lo cual me demostró con su incondicional apoyo en los buenos y malos tiempos, a mi padre Jorge Ayala Chapoñan por la motivación constante, además de inculcarme buenos valores para llegar a ser una persona de bien.

Va para ustedes por lo que valen como personas y por todo lo que han hecho por mí hasta ahora.

A mis hermanos Joselin y Anghelo por el apoyo incondicional.

Agradecimiento

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por brindarme vida y salud, por guiarme por el camino correcto que permitió cumplir esta meta tan anhelada.

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, alma mater, que me permitió concluir mis estudios de maestría con éxito.

Agradezco a mis asesores Ph.D. Martha Steffany Calderón Ríos y Ph.D. Danilo Edson Bustamante Mostajo, por otorgarme su tiempo e incondicional apoyo para la materialización de la presente investigación.

Al Dr. Segundo Manuel Oliva Cruz por su aporte en esta investigación y apoyo logístico.

En especial al INDES-CES que a través el Subproyecto “Análisis metagenómico y técnicas cromatográficas para la obtención de un cultivo iniciador que mejore la calidad del chocolate a partir del cacao nativo fino de aroma en la zona Nor Oriental del Perú” –METACACAO/ N° 008-2020-FONDECYT-BM, por hacer posible la ejecución del presente trabajo de investigación a través del soporte científico, metodológico y la provisión de reactivos y materiales necesarios para su realización.

Autoridades de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza

Ph. D Jorge Luis Maicelo Quintana

RECTOR

Dr. Oscar Andrés Gamarra Torres

VICERRECTOR ACADÉMICO

Dra. María Nelly Luján Espinoza

VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN

Dr. Efraín Manuelito Castro Alayo

DIRECTOR DE LA ESCUELA DE POSGRADO

VISTO BUENO DE LOS ASESORES



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 6-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO (X)/ DOCTOR ()

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (X)/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Ecología microbiana de la fermentación del cacao fino de aroma de Amazonas, Perú.

cuyo autor Rosmery Yakelini Ayala Tocto. es estudiante del _____ ciclo/egresado (X) de la Escuela de Posgrado, Maestría (X) / Doctorado () en Gestión para el Desarrollo Sustentable, con correo electrónico institucional rosmery.ayala.epg@untrm.edu.pe



El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 27 de Octubre de 2022

Firma y nombre completo del Asesor

Martha Steffany Alderici Reis



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 6-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL
GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO (X)/ DOCTOR ()

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (X)/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Ecología microbiana de la fermentación del cacao fino de aroma de Amazonas, Perú.

cuyo autor Rosmery Yakelini Ayala Tocto es estudiante del _____ ciclo/egresado (X) de la Escuela de Posgrado, Maestría (X) / Doctorado () en Gestión para el Desarrollo Sustentable, con correo electrónico institucional rosmery.ayala.epg@untrm.edu.pe.



El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 27 de octubre de 2022

Firma y nombre completo del Asesor
Danilo Bustamante Mosteja

JURADO EVALUADOR DE LA TESIS



PhD. Ligia Magali García Rosero
Presidente



Mg. Aline Camila Caetano
Secretario



Mg. Segundo Grimaldo Chavez Quintana
Vocal

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 6-Q

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO (X) / DOCTOR ()

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

Ecología microbiana de la fermentación del cacao
fino de aroma de Amazonas, Perú.

presentada por el estudiante ()/egresado (X) Rosmery Yákelini Ayala Torco

de la Escuela de Posgrado, Maestría (X) / Doctorado () en Gestión para el

Desarrollo Sustentable

con correo electrónico institucional rosmery_ayala_esp@untrm.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- La citada Tesis tiene 11 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (X) / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- La citada Tesis tiene _____ % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.

Chachapoyas, 14 de noviembre del 2022

Aline Camila Cautano
SECRETARIO

[Firma]
PRESIDENTE

[Firma]
VOCAL

OBSERVACIONES:

.....
.....

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 6-S

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO (X) / DOCTOR ()

En la ciudad de Chachapoyas, el día 06 de diciembre del año 2022 siendo las 10:00 horas, el aspirante Bach. Rosmery Yakelini Ayala Tecto, Asesorado por PhD Martha S Calderón Ríos y PhD Danilo E. Bustamante defiende en sesión pública presencial (X) / a distancia () la Tesis titulada: Ecología Microbiana ^{Mosaja} de la Fermentación del Cacao Fino de Aroma de Amazonas, Perú

para obtener el Grado Académico de Maestro (X)/Doctor () en Gestión para el Desarrollo Sustentable, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, conformado por:

Presidente: Ligia Magali García Rosero

Secretario: Aline Camila Caetano

Vocal: Segundo Grimaldo Chávez Quintana

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y método, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis de Maestría (X)/Doctorado (), en términos de:

A probado (X) por Unanimidad (X)/Mayoría () Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 12:52 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Grado Académico de Maestro (X)/Doctor ().

Aline Camila Caetano
SECRETARIO

[Firma]
PRESIDENTE

[Firma]
VOCAL

OBSERVACIONES:
.....
.....

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	4
2.1. Área de estudio	4
2.2. Proceso metodológico	4
2.1.1. Caracterización fisicoquímica del proceso de fermentación cacao	4
2.1.2. Colecta de la muestra	5
2.1.3. Aislamiento de microorganismos	5
2.1.4. Caracterización morfológica de los microorganismos	5
2.1.5. Identificación molecular de microorganismos a partir de secuenciamiento Sanger (DNA barcoding)	6
2.1.6. Cálculo de índices de diversidad	7
2.1.7. Caracterización bioquímica de los microorganismos aislados	7
2.2. Análisis de datos	10
III. RESULTADOS	10
3.1. Caracterización las condiciones fisicoquímicas y ambientales del proceso de fermentación	10
3.1.1. En el fermento	10
3.1.2. En el ambiente	12
3.2. Identificación de los microorganismos aislados del proceso de fermentación	14
3.2.1. Caracterización morfológica	14
3.2.2. Caracterización molecular	14
3.2.4. Índices de diversidad	19
3.3. Caracterización de las propiedades bioquímicas de los microorganismos	20

IV. DISCUSIÓN	27
V. CONCLUSIONES	32
VI. RECOMENDACIONES	33
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS	44
Anexo 1. Tabla de la caracterización morfológica tanto macroscópica como microscópica de los microorganismos aislados.....	44
Anexo 2. Identificación molecular de las 220 muestras aisladas y comparadas con la base de datos de Genbank con un porcentaje de similitud del 98%.....	53
Anexo 3. Análisis de correlación de Pearson de los parámetros fisicoquímicos y el número de especies por hora de colecta.	59
Anexo 4. Resultados de las pruebas bioquímicas de los microorganismos aislados.	60
Anexo 5. Análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples de LSD de Fisher .	66
Anexo 6. Tablas de contingencia de la variable categórica (Gas)	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Composición del medio de cultivo MP5 y MP7	9
Tabla 2.	Composición de solución nutritiva	9
Tabla 3.	Matriz de correlación de Pearson entre las principales variables evaluadas durante el proceso de fermentación de cacao.	16
Tabla 4.	Índices de Shannon- Wiener y Simpson por hora de colecta	20
Tabla 5.	Test de LSD de Fisher de las cinco variables evaluadas.	23
Tabla 6.	Resultados de las seis variables evaluadas para las siete especies potenciales.	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flujograma de actividades desarrolladas en el estudio de investigación.....	4
Figura 2. Temperatura del fermento a cada hora de colecta.	11
Figura 3. pH del fermento a cada hora de colecta.....	12
Figura 4. Humedad relativa del fermento a cada hora de colecta.	12
Figura 5. Temperatura ambiental durante el proceso de fermentación.	13
Figura 6. Humedad relativa ambiental durante el proceso de fermentación.....	14
Figura 7. Número de especies identificadas por hora de colecta a lo largo del proceso de fermentación de cacao.	15
Figura 8. Mapa de calor de número de especies según grupo de microorganismos en el proceso de fermentación	17
Figura 9. Mapa de calor de los géneros del grupo fungi con respecto a las horas de colecta.....	18
Figura 10. Mapa de calor de los géneros del grupo de bacterias por horas de colecta.	19
Figura 11. Dendrograma del análisis de conglomerados de las pruebas bioquímicas de los microorganismos.....	22
Figura 12. Análisis de correspondencia múltiple de la variable categórica “presencia de gas” 24	
Figura 13. Colonias bacterianas con mayor actividad pectinolítica	26
Figura 14. Colonias de levaduras con mayor actividad pectinolítica	27

RESUMEN

El proceso de fermentación es un punto clave y esencial para obtener granos de cacao de alta calidad, ya que en esta etapa intervienen microorganismos que inician la formación de precursores de sabor y aroma, dándole al cacao características únicas. Actualmente, en el Perú aún no hay investigaciones que evalúen la diversidad de microorganismos presentes en la fermentación, por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar la ecología microbiana involucrada en el proceso de fermentación espontánea del cacao fino de aroma de Amazonas con el fin de dar a conocer la microbiota autóctona y así elaborar propuestas futuras de cultivos iniciadores mixtos que añadan características especiales al grano de cacao. Se identificaron 80 especies durante todo el proceso de fermentación, de los cuales 47 especies pertenecieron a bacterias esporogénicas, 14 a levaduras, 8 a bacterias ácido-lácticas (BAL), 7 bacterias ácido-acéticas (BAA) y 4 a hongos filamentosos. Los análisis bioquímicos de asimilación de carbohidratos, resistencia al etanol y actividad pectinolítica permitieron seleccionar siete microorganismos potenciales para la elaboración de un cultivo iniciador: *Acetobacter orientalis*, *Kodamaea ohmeri*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus*, ya que presentan un crecimiento promedio de 10.3 UFC/uL en un medio de asimilación de carbohidratos, 33.31 y 22.97 UFC/uL en concentraciones de 8 y 15% de etanol, respectivamente, y óptima actividad pectinolítica (índice DH/DC = 1.0 ;índice AH/AC = 1.87).

Palabras clave: Bacterias ácido-acéticas, bacterias ácido-lácticas, cacao fino de aroma de Amazonas, cultivo iniciador, identificación molecular, levaduras, potencial bioquímico.

ABSTRACT

The fermentation process is key and essential to obtain high quality cocoa beans, since this stage involves microorganisms that initiate the formation of flavor and aroma precursors, giving cocoa its unique characteristics. Currently, there is still no research in Peru that evaluates the diversity of microorganisms present in fermentation, so the objective of this study was to evaluate the native microbial ecology involved in the spontaneous fermentation process of fine aroma cacao from Amazonas in order to know the native microbiota and thus propose future alternatives of starter cultures that enhance special characteristics to the cacao bean. Eighty species were identified of which 47 species belonged to sporogenic bacteria, 14 to yeasts, 8 to lactic acid bacteria (LAB), 7 to acetic acid bacteria (AAB), and 4 to filamentous fungi. Biochemical analyses of carbohydrate assimilation, ethanol resistance and pectinolytic activity allowed selecting seven potential microorganisms for the elaboration of a starter culture: *Acetobacter orientalis*, *Kodamaea ohmeri*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus*; for presenting an average growth of 10.3 CFU/uL in a carbohydrate assimilation medium, 33.31 and 22.97 CFU/uL in concentrations of 8 and 15%, ethanol respectively, and optimal pectinolytic activity (DH/DC index = 1.0; AH/AC index = 1.87).

Key words: Acid-acetic bacteria, acid-lactic bacteria, fine aroma cocoa from Amazonas, starter culture, molecular identification, yeasts, biochemical potential.

I. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo de gran importancia para la industria chocolatera por ser la principal materia prima utilizada en la elaboración de chocolates (Beckett, 2009; Viesser et al., 2020a). Además, el público en general disfruta de los derivados del cacao por su sabor y beneficios nutricionales ya que tiene efectos protectores contra enfermedades cardiovasculares por su alta concentración de polifenoles y antioxidantes (Katz et al., 2011; Watson et al., 2013).

El cultivo de cacao es originario del continente americano y sólo se cultiva en la zona ecuatorial (Figuroa et al., 2019). Actualmente, los principales países productores de cacao son Costa de Marfil, Ghana, Indonesia y Nigeria, que producen más de 4.7 millones de toneladas al año (FAO, 2018). Europa es el continente que más cacao importa para su industrialización (Rojo et al., 2020).

Perú produce aproximadamente 82 mil toneladas de cacao por año, siendo San Martín, Junín, Cusco, Ucayali, Huánuco, Ayacucho y Amazonas las principales regiones para su cultivo (MINAGRI, 2016; INEI, 2019). Adicionalmente, el país se ubica como el segundo productor y exportador de cacao fino de aroma, almendras que se caracterizan por su sabor y aroma difíciles de replicar con otro tipo de grano (ICCO, 2014; MINAGRI, 2016). Este tipo de cacao se utiliza para elaborar chocolates oscuros gourmet que otorgan a los productos terminados características únicas de aroma y sabor (ICCO, 2014).

En la región Amazonas, según Ordenanza Regional N° 368 (2015), el cultivo de cacao obtuvo la denominación de origen “Cacao fino de aroma de Amazonas” debido a su sabor intenso único, siendo además producto de un ecosistema biodiverso y del manejo agroecológico que preserva las herencias de la cultura ancestral. Esto ha fomentado la producción de granos de cacao de alta calidad en la región, que son reconocidos a nivel nacional e internacional. También ha ayudado a avanzar en las técnicas de producción, fermentación y secado (MINAGRI, 2016).

Los granos deben someterse a un proceso de fermentación, secado y tostado para desarrollar su aroma y sabor característicos (Beckett, 2009; Thompson et al., 2014). Entre estos, la fermentación (espontánea) es considerada un proceso crítico ya que tiene como objetivo degradar el embrión de la semilla y evitar que los granos germinen, además permite eliminar la pulpa mucilaginosa que rodea a los granos de cacao (Afoakwa et al.,

2008). Adicionalmente, durante esta etapa se inicia la formación de precursores de sabor y aroma a través de la actividad sucesiva de microorganismos autóctonos del fermento (Reineccius, 2005).

El proceso de fermentación dura de 5 a 6 días y se divide en cuatro fases la primera involucra el crecimiento de levaduras (Dujon & Louis, 2017), quienes son favorecidos por la mayor concentración de glucosa, ácidos cítricos y baja disponibilidad de oxígeno, y a partir de ello producen dióxido de carbono, ácidos orgánicos y glicerol (Nielsen et al., 2005; Visintin et al., 2016). Además, las levaduras contribuyen a la degradación de la pectina en la pulpa del cacao y a la producción de precursores de compuestos aromáticos (Crafack et al., 2013). En la segunda etapa, aumenta la concentración de ácido láctico y, como consecuencia, aumentan las poblaciones de Bacterias Ácido Lácticas (BAL), convirtiendo el ácido cítrico y los carbohidratos residuales en ácido láctico, ácido acético y manitol (Camu et al., 2007; Schwan & Wheals, 2004). En la tercera fase aumenta la población de Bacterias Ácido Acéticas (BAA), la cual es responsable de la oxidación del etanol y la transformación de ácido láctico en ácido acético (Adler et al., 2014); éste último penetra el grano, matando el embrión. En la cuarta y última fase favorece la presencia de bacterias esporogénicas generalmente se encuentra el género *Bacillus* (Lefeber et al., 2011).

En general, las comunidades microbianas involucradas en la fermentación varían según la ubicación geográfica y el método de fermentación (Figuerola et al., 2019). Por ejemplo, un estudio en Malasia descubrió que las cepas de levaduras *Pichia kudriavzevii* y *Hanseniaspora thailandica* tienen el potencial para formar parte de un cultivo iniciador debido a sus características bioquímicas que promueven el aumento de la concentración de antioxidantes en grano de cacao (Ooi et al., 2020). Por otra parte, las principales especies de BAL identificadas en la fermentación de cacao de Costa de Marfil fueron *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum*, mientras que las especies de BAA fueron *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter ghanensis* y *Acetobacter senegalensis* (Lefeber et al., 2011). En Camerún, las BAL identificadas pertenecen a las especies *Lactobacillus fermentum*, *Weissella paramesenteroides* y *Lactobacillus paraplantarum*, mientras que las BAA encontradas fueron *Acetobacter syzygii* (Bortolini et al., 2016). De manera similar, en Ecuador, los análisis revelaron especies de levaduras

como *Hanseniaspora opuntiae* y *Saccharomyces cerevisiae*, BAL como *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus pentosus*, y BAA como *Acetobacter pasteurianus* durante un proceso de fermentación de 5 días (Papalexandratou et al., 2013), siendo éstas las especies microbianas más distintivas del fermento de cacao a nivel mundial y los que tienen un mayor potencial bioquímico para la elaboración de un cultivo iniciador.

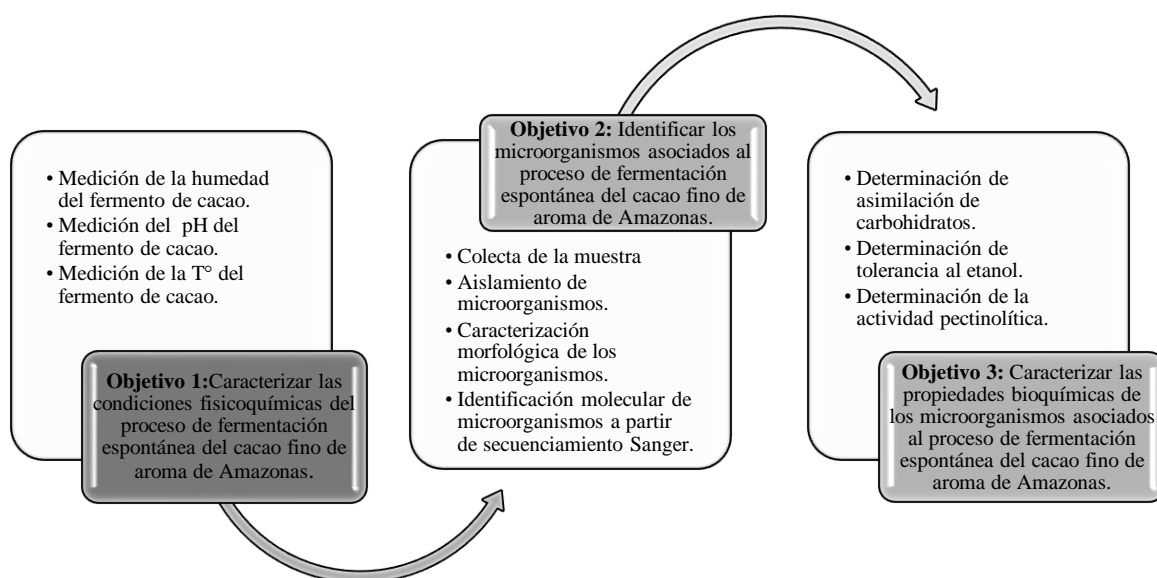
En este contexto, se han realizado numerosos estudios internacionales con el objetivo de identificar los microorganismos involucrados en la fermentación del cacao, explorar sus características bioquímicas y brindar recomendaciones para el desarrollo de cultivos iniciadores que mejoren la calidad del chocolate. Sin embargo, en Perú, la investigación sobre los microorganismos nativos presentes en el proceso de fermentación del cacao aún es limitada, razón por la cual el presente estudio tiene como objetivo evaluar la ecología microbiana involucrada en el proceso de fermentación espontánea del cacao fino de aroma de Amazonas con el fin de dar a conocer la microbiota autóctona y así elaborar propuestas futuras de cultivos iniciadores mixtos que añadan características especiales al grano de cacao. Para esto, se plantearon los siguientes objetivos específicos: i) caracterizar las condiciones fisicoquímicas y ambientales del proceso de fermentación espontánea del cacao fino de aroma de Amazonas, ii) identificar los microorganismos asociados al proceso de fermentación y, por último, iii) caracterizar las propiedades bioquímicas de los microorganismos asociados al proceso de fermentación.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A medida que se desarrolló la investigación se realizaron numerosas actividades con el fin de lograr cada uno de los objetivos específicos propuestos (Figura 1).

Figura 1

Flujograma de actividades desarrolladas en el estudio de investigación



Nota: Para el cumplimiento del objetivo de la investigación se ha planteado diversas actividades por cada objetivo específico.

2.1. Área de estudio

Las muestras de cacao fueron recolectadas en el distrito de Cajaruro (a una altitud de 490 m.s.n.m.), ubicado en la provincia de Utcubamba, región Amazonas. Limita por el Norte con la provincia de Bagua y Condorcanqui, al Sur con la provincia de Luya, al Este con la provincia de Bongará, y al Oeste con los distritos de Jamalca y Bagua Grande.

2.2. Proceso metodológico

2.2.1. Caracterización fisicoquímica del proceso de fermentación cacao

Para caracterizar las condiciones fisicoquímicas del fermento y las condiciones

ambientales durante el proceso de fermentación del cacao, se tomaron mediciones de humedad relativa y temperatura del ambiente *in situ* (utilizando higrómetro); así como medidas de temperatura, humedad relativa y pH en el fermento de cacao (utilizando termómetro, higrómetro y pH-metro portátil, respectivamente). Los datos se registraron en cada hora de colecta de las muestras para obtener una información más detallada del proceso de fermentación.

2.2.2. Colecta de la muestra

Para realizar el experimento se tomaron 100 gramos de cacao al inicio del proceso de fermentación (tiempo 0), y luego a las 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132 y 144 horas, con la finalidad de registrar la mayor diversidad de microorganismos durante todo el proceso (Ooi et al., 2020). Las muestras se extrajeron de la parte central del fermentador a una altura de 30 cm desde la superficie (Camu et al., 2007). Los granos fueron colocados en bolsas de plástico estériles y conservados en una cadena de frío a una temperatura de -20 °C (Ooi et al., 2016), para ser trasladadas al laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

2.2.3. Aislamiento de microorganismos

En el laboratorio se mezclaron 20 g de muestra con 180 ml de agua de peptona al 0.1% (p/v) y se agitó hasta obtener una muestra homogénea (Camu et al., 2007).

A continuación, se realizaron 10 diluciones en serie (1.0 ml) en agua de peptona al 0.1%, de las cuales se tomaron alícuotas (0.1 ml) y se sembraron en diferentes medios de agar selectivo: Agar extracto de malta más 100 mg/l de oxitetraciclina para levaduras y hongos filamentosos, Agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) más 400 mg/l de cicloheximida para BAL y Agar GYC (Glucose, yeast extract y calcium carbonate) más 400 mg/l de cicloheximida para BAA. Posteriormente, las placas se incubaron de 2 a 5 días a 37 °C hasta observar su crecimiento, y luego se realizaron los repiques y siembras para cada una de las colonias aisladas hasta que se obtuvieron cultivos axénicos o puros (Lefeber et al., 2012).

2.2.4. Caracterización morfológica de los microorganismos

- Caracterización macroscópica

Para la caracterización macroscópica de las colonias aisladas (bacterias, levaduras y

hongos filamentosos) se tomaron en consideración los siguientes parámetros: tamaño, forma, consistencia, textura, superficie, comportamiento con respecto a la luz, color y olor (Madigan et al., 2009).

- Caracterización microscópica

Para la caracterización microscópica de hongos (levaduras y hongos filamentosos) se realizaron tinciones con azul de lactofenol y se observaron en microscopio (objetivo de 100X); las características observadas fueron forma, presencia de filamentos y tipo de reproducción (Velasco, 2017).

Para la caracterización microscópica de bacterias se realizó la técnica de coloración Gram y se determinó su forma (Cocos, bacilos, espirilos y filamentos) (Nielsen et al., 2005).

2.2.5. Identificación molecular de microorganismos a partir de secuenciamiento Sanger (DNA barcoding)

La extracción de ADN se realizó usando el kit de extracción para microorganismos Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (ZymoBIOMICS™), con el principio de la columna de extracción a base de sílice, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la identificación de bacterias se utilizó el gen 16S rRNA (primers, 16S-GM3F: (5'-AGAGTTTGATCMTGGC-3'); 16S-GM4R: 5'-TACCTTGTTACGACTT-3'), y cuya amplificación (mediante PCR, Polymerase Chain Reaction) inició con una desnaturalización a 95°C durante 3 min, seguida de 35 ciclos (94 ° C durante 1 min, 50°C durante 1 min y 72 ° C durante 1 min), terminando con una extensión final a 72 ° C durante 5 min (Lechner et al., 1998). Para la identificación de las levaduras y hongos filamentosos se realizó la amplificación del gen ITS1-5.8S de ADN ribosomal (primers, ITS1 (5'-CGTAGGTGAACCTGCGG-3' e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), la cual se inició con una desnaturalización de 95 ° C durante 6 min, seguida de 40 ciclos (94 ° C durante 50 segundos, 55 ° C durante 50 segundos y 72 ° C durante 1 min) y terminando una extensión final a 72 ° C durante 10 min (Samagaci et al., 2016; Zarzoso et al., 1999). Los productos de PCR purificados fueron enviados a secuenciar de manera comercial en MacroGen (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias obtenidas fueron procesadas en el software Chromas v1.45 (McCarthy, 1998) y posterior a ello se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank utilizando el

algoritmo BLAST (Centro Nacional de Información Biotecnológica, Maryland, EE.UU.) con un porcentaje de similitud del 98% (barcode) (MacHuca et al., 2019).

2.2.6. Cálculo de índices de diversidad

Se calcularon índices de diversidad microbiana para medir riqueza y dominancia de especies en las horas de colecta del fermento. Se utilizó el índice de Shannon-Wiener, ya que es uno de los índices más utilizados para calcular diversidad, para medir la heterogeneidad de una comunidad en base al número de especies y su abundancia relativa (Pla, 2006). Se calculó la mediante la fórmula (Shannon & Weiner, 1949):

$$H = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$$

Donde: i = cada especie

S = n° total de especies

P_i = abundancia relativa de cada especie en la comunidad (n° individuos de la especie i / n° total de individuos).

También se utilizó el índice de Simpson, el cual representa la probabilidad de que dos individuos elegidos al azar pertenezcan a la misma especie, es decir indica la relación entre número de especies y abundancia. El cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula (Bouza & Covarrubias, 2005):

$$D = 1 - \sum_{i=1}^S P_i^2$$

Donde: i = cada especie

S = n° total de especies

P_i = abundancia relativa de cada especie en la comunidad (n° individuos de la especie i / n° total de individuos).

2.2.7. Caracterización bioquímica de los microorganismos aislados

Esta caracterización se realizó con el fin de generar información del potencial bioquímico de cada microorganismo para futuras propuestas de cultivo iniciador, teniendo en cuenta los siguientes criterios (cada uno de ellos se evaluó por triplicado):

a. Determinación de asimilación de carbohidratos

El análisis de asimilación de carbohidratos se realizó mediante el método descrito por Wickerham (1951). Los microorganismos se cultivaron en caldo de extracto de malta al 0.3% durante 24 h a 30 ° C, luego se utilizaron 10 ul de cada cultivo para inocular 10 ml de medio estéril de extracto de levadura al 0.5% suplementado con 1% de sacarosa, 1% de glucosa, 1% de lactosa y 0.5% de inositol. A continuación, se incubó a 30 ° C por 72 h y se evaluó la presencia de gas en los tubos, así como el crecimiento de las colonias en UFC / uL (Unidades formadoras de colonia por microlitro) mediante un espectrofotómetro, lo que indicó el crecimiento fermentativo con producción de CO₂.

b. Determinación de tolerancia al etanol

Para determinar la tolerancia al etanol, se cultivaron 100 ul de microorganismos en medio de cultivo YNB (Yeast Nitrogen Base, pH 5) con concentraciones de etanol de 8 y 15% (v/v), luego se incubaron a 30°C por 72 h y se evaluó el crecimiento de las colonias mediante el conteo en placa de UFC/ uL (Samagaci et al., 2016).

c. Determinación de la actividad pectinolítica

La actividad pectinolítica se determinó utilizando el métodos descrito por Soares et al., (1999). Levaduras, hongos filamentosos y bacterias se cultivaron en placas que contenían los medios de cultivo MP5 (con ácido poligalacturónico) y MP7 (con pectina) (Tabla 1 y 2) y se incubaron a 30°C durante 72 horas.

Este parámetro se evaluó a través de la formación de un halo claro o transparente después de realizar un lavado con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) al 1%; para ello se tomaron medidas de diámetro de halo (DH), diámetro de colonia (DC), área de halo (AH) y área de colonia (AC) utilizando el software Image J. Con estos valores se calcularon los índices de relación de DH/DC y AH/AC (Silva et al., 2013).

Tabla 1*Composición del medio de cultivo MP5 y MP7*

Medio de cultivo MP5 y MP7	
Insumos	Cantidad por litro
Glucosa	5 g
Ácido poligalacturónico o pectina	5 g
Fosfato dipotásico	6 g
Sulfato de amonio	2 g
Extracto de levadura	1 g
Agar	15 g
Solución nutritiva (Tabla 2)	100 ul
pH 5.5	

Nota: Para la evaluación de la actividad pectinolítica se utilizaron dos medios de cultivo que se prepararon con distintos insumos.

Tabla 2*Composición de solución nutritiva*

Solución Nutritiva	
Insumos	Cantidad por litro
Sulfato de fierro	0.1 g
Sulfato de magnesio	20 g
Cloruro de calcio	0.1 g
Ácido bórico	0.2 g
Sulfato de manganeso	0.2 g
Sulfato de zinc	1.4 g
Sulfato de cobre	1 g
Oxido de molibdeno	0.2 g

Nota: Insumos para la preparación de la solución nutritiva utilizada en los medios de

cultivos MP5 y MP7.

2.3. Análisis de datos

Para determinar la diversidad microbiana (abundancia y riqueza en cada una de las horas de colecta del fermento) involucrados en el proceso de fermentación de cacao se utilizaron los índices de Simpson y Shannon-Wiener (Agyirifo et al., 2019). Además, con el fin de cuantificar el número y tipo de microorganismo en cada una de las horas de colecta del fermento se realizaron mapas de calor (Zhao et al., 2014) y un análisis de correlación de Pearson entre los parámetros fisicoquímicos del fermento (temperatura, pH, humedad relativa) y el número de especies por hora de colecta (Dagnino, 2014). Para todos estos análisis se utilizó el software Rstudio v4.1.2 (Boccardo & Ruiz, 2019). Para identificar el grupo de microorganismos con mayor potencial bioquímico se aplicó un análisis multivariado mediante el software *Infostat* versión 2020. En primera instancia, se realizó un análisis de conglomerados con las variables numéricas y categóricas, con el método de Ward y la distancia de Gower. A continuación, para determinar la influencia de los datos numéricos en la formación de grupos se realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de LSD de Fisher. Finalmente, para los datos categóricos se realizaron tablas de contingencia y un análisis de correspondencias múltiples.

III. RESULTADOS

3.1. Caracterización las condiciones fisicoquímicas y ambientales del proceso de fermentación

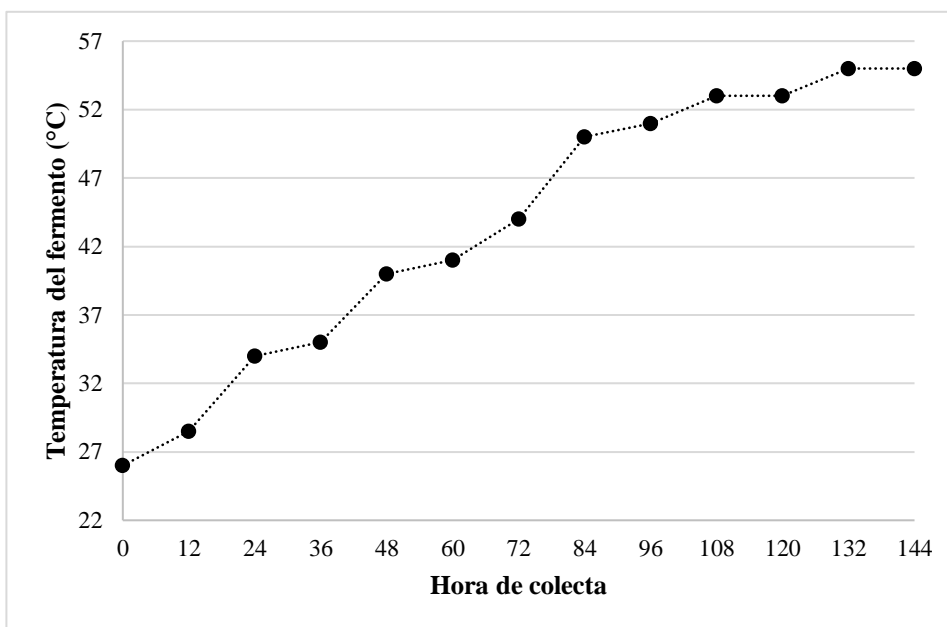
En total se colectaron 13 muestras de fermento de cacao, cada 12 horas después de iniciado el proceso de fermentación (desde las 0 horas hasta las 144 horas). Los resultados de los distintos parámetros evaluados en el fermento y en el ambiente *in situ* se describen a continuación:

3.1.1. En el fermento

Dado que la temperatura, el pH y la humedad relativa son variables directamente relacionadas con el crecimiento de los microorganismos, se realizaron mediciones de estas variables (John et al., 2019). En el caso de temperatura, se observó que ésta aumenta mientras avanza el proceso de fermentación (Figura 2).

Figura 2

Temperatura del fermento a cada hora de colecta

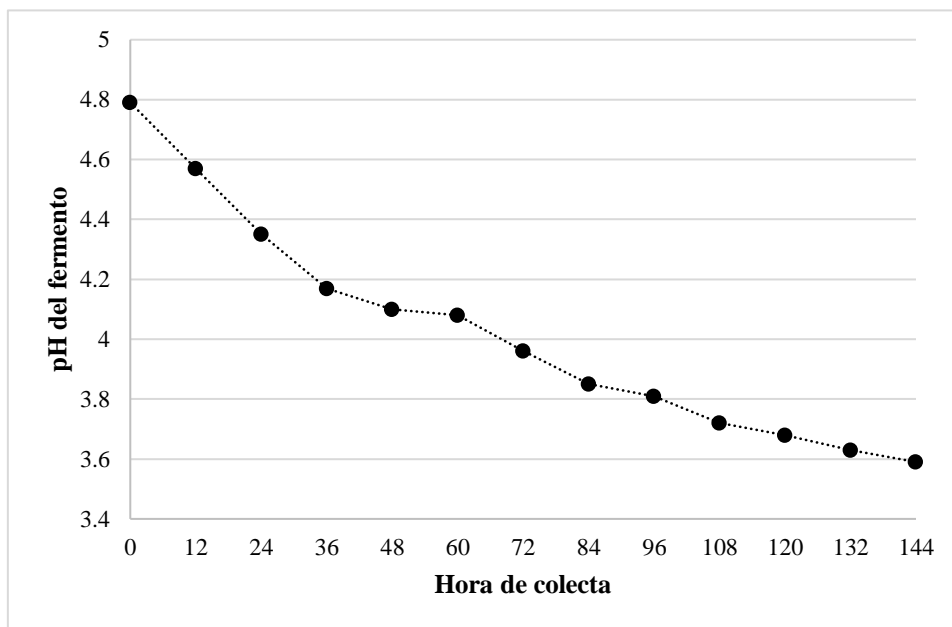


Nota: Cada 12 horas se tomaron medidas de temperatura en el fermento de cacao.

En el caso del pH, se observó que éste se vuelve más ácido en el transcurso del proceso de fermentación, comenzando en un pH de 4.79 y finalizando en un pH de 3.59 (Figura 3). De igual forma, en el caso de humedad relativa, se observó que disminuye durante el proceso de fermentado de 75% a 41.85% (Figura 4).

Figura 3

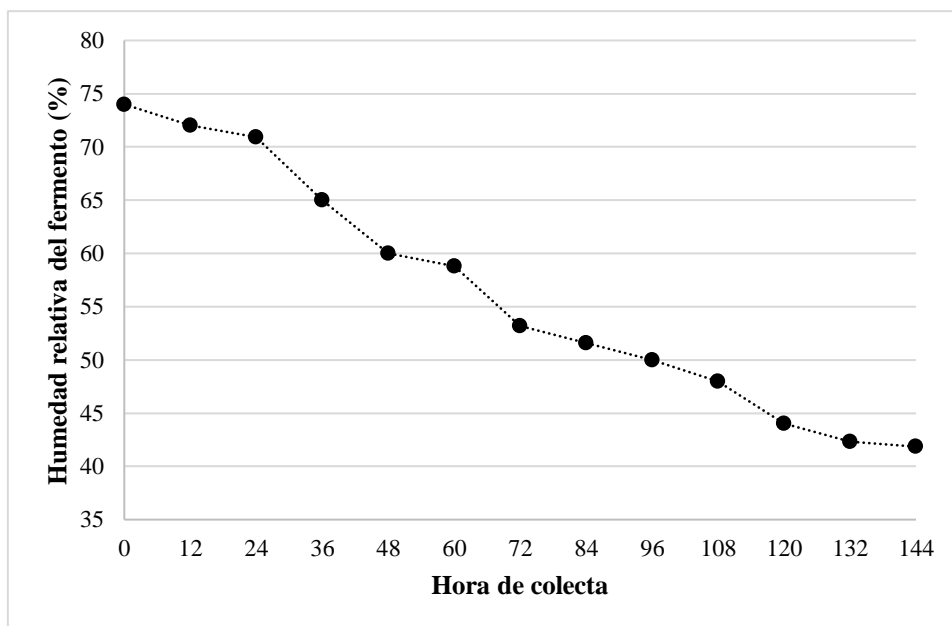
pH del fermento a cada hora de colecta



Nota: Cada 12 horas se tomaron medidas de pH en el fermento de cacao.

Figura 4

Humedad relativa del fermento a cada hora de colecta



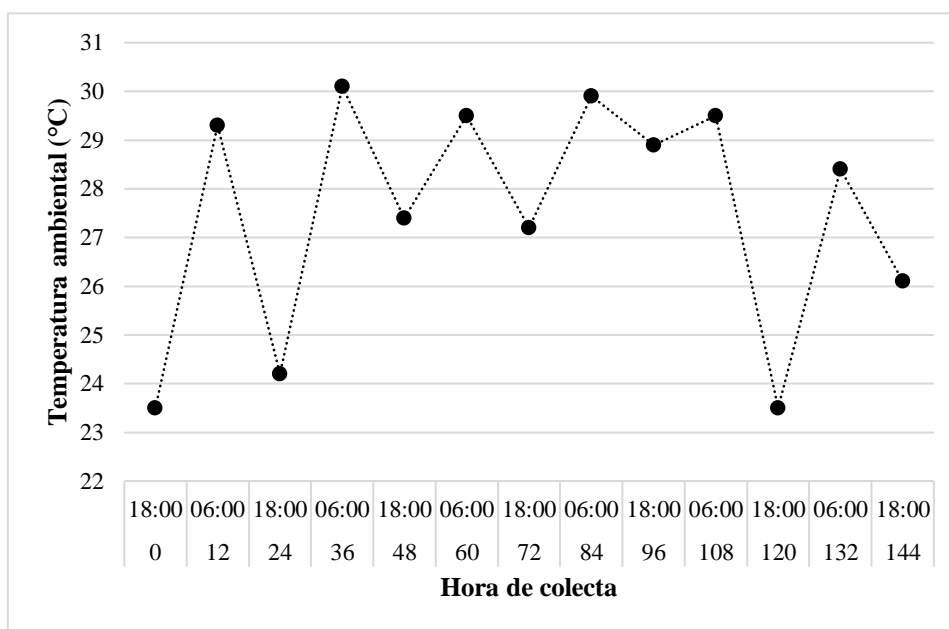
Nota: Cada 12 horas se tomaron medidas de humedad relativa en el fermento de cacao.

3.1.2. En el ambiente

Las mediciones de temperatura y humedad en el ambiente donde se llevó a cabo el proceso de fermentación revelaron que la temperatura (Figura 5) es más alta en las mañanas, pero no tuvo efecto sobre la temperatura del fermento. La humedad relativa en este caso fluctuó entre 60,3% y 88,4%, con valores más altos en la tarde (Figura 6).

Figura 5

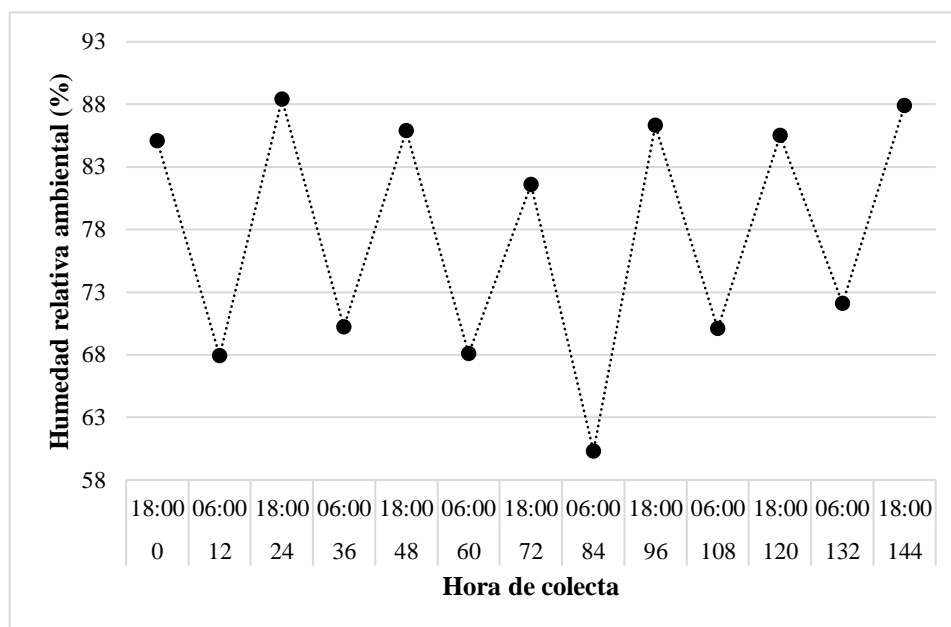
Temperatura ambiental durante el proceso de fermentación



Nota: Cada 12 horas se tomaron medidas de temperatura en el ambiente en el que se desarrolló el proceso de fermentación.

Figura 6

Humedad relativa ambiental durante el proceso de fermentación



Nota: Cada 12 horas se tomaron medidas de humedad relativa en el ambiente en el que se desarrolló el proceso de fermentación.

3.2. Identificación de los microorganismos aislados del proceso de fermentación

3.2.1. Caracterización morfológica

Se obtuvieron un total de 220 colonias (hongos filamentosos, levaduras y bacterias), aisladas de 13 muestras de fermentos de cacao recolectadas en campo. Cada una de las colonias mostró distinta morfología (macroscópica y microscópica) (Ver Anexo 01).

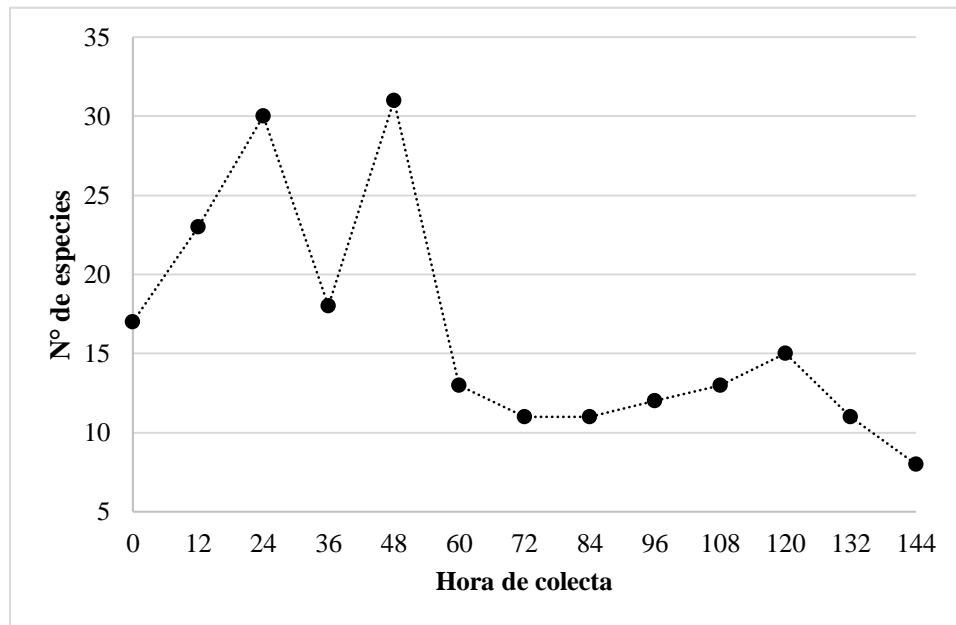
3.2.2. Caracterización molecular

Para la identificación molecular de las 220 colonias aisladas se compararon las secuencias obtenidas de los marcadores 16S (bacterias) e ITS (hongos) con las depositadas en la base de datos GenBank (algoritmo BLAST), considerando un porcentaje de similitud del 98%. Como resultado, se identificaron 80 especies diferentes a lo largo de todo el proceso de fermentación (Anexo 2); no obstante, el número de especies por hora varía, tal como se puede observar en la Figura 7. Las horas 24 y 48 presentaron un mayor número de especies aisladas, siendo 30 y 31

especies, respectivamente. Además, se observó que a partir de las 60 horas de iniciado el proceso de fermentación hay un declive en el número de especies.

Figura 7

Número de especies identificadas por hora de colecta



Nota: A lo largo del proceso de fermentación de cacao se evaluó el número de especies de acuerdo con cada una de las horas de colecta de la muestra.

Se realizó un análisis de correlación de Pearson utilizando las variables examinadas previamente, incluido el número de especies, la hora de colecta, la temperatura de fermentación, el pH de fermentación y la humedad de fermentación, para determinar el grado de asociación entre las variables. Según la Tabla 3, que corresponde a la matriz de correlación, se observó que la variable número de especies tuvo correlación positiva con el pH (0.59) y humedad de fermento (0.68); y una correlación negativa con la temperatura del fermento (-0.63) y hora de colecta (-0.67). Así mismo, la hora de colecta tuvo correlación positiva con la temperatura del fermento (0.98) y una correlación negativa con el pH (-0.96) y humedad de fermento (-0.99).

Tabla 3

Matriz de correlación de Pearson entre las principales variables evaluadas durante el proceso de fermentación de cacao

	N° de especies	Hora de colecta	pH del fermento	T° del fermento	Humedad del fermento
N° de especies	1				
Hora de colecta	-0.67	1			
pH del fermento	0.59	-0.96	1		
T° del fermento	-0.63	0.98	-0.98	1	
Humedad del fermento	0.68	-0.99	0.97	-0.98	1

Nota: Todas las variables son significativas ($p < 0.05$).

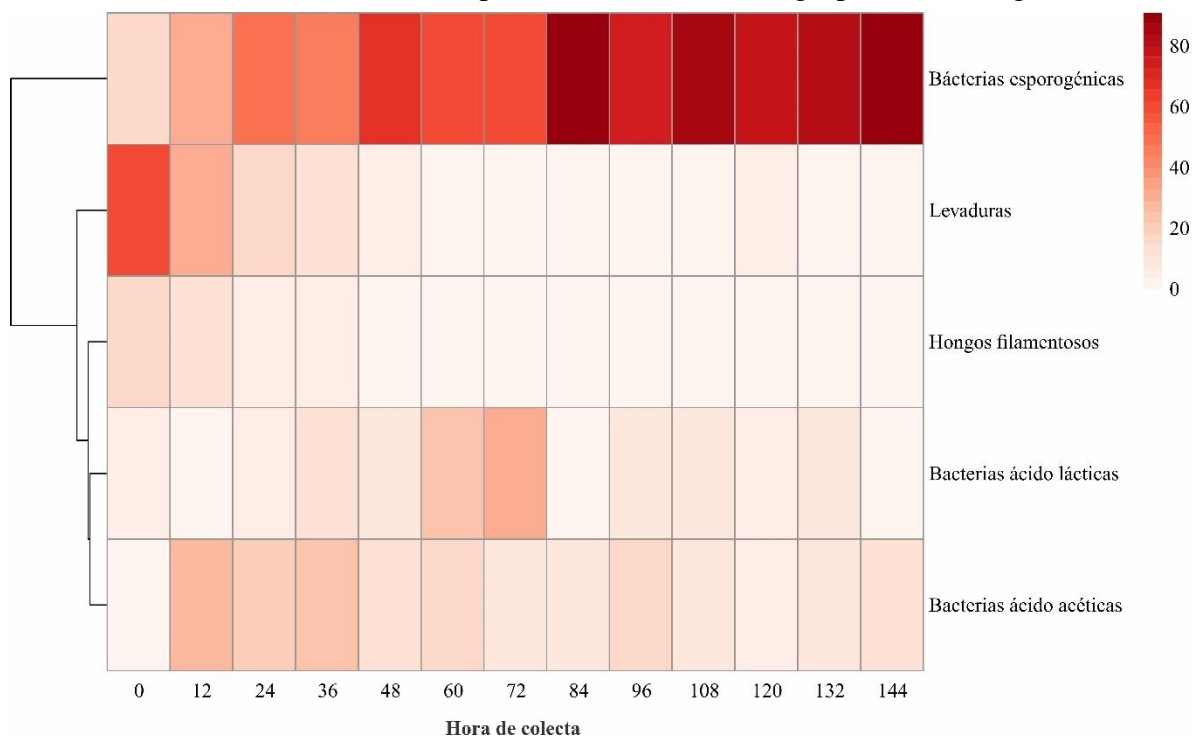
3.2.3. Microorganismos identificados en el proceso de fermentación

Del total de especies identificadas, 47 especies (58.75%) corresponden a bacterias esporogénicas, 14 especies (17.5%) a levaduras, 8 especies (10%) a bacterias ácido-lácticas (BAL), 7 especies (8.75%) a bacterias ácido-acéticas (BAA) y 4 especies (5%) a hongos filamentosos. Cada grupo mostró distinta predominancia a lo largo del proceso de fermentación. Las bacterias esporogénicas, quienes forman endosporas para darles resistencia en ambientes con condiciones extremas (Sonenshein, 2014), fueron las más predominantes durante todo el proceso, alcanzando su punto máximo al final de la fermentación (120 horas, 12 especies), mientras que los hongos filamentosos fueron los menos frecuentes (4 especies en todo el proceso). Por otro lado, las BAL presentaron una mayor población a la mitad de proceso de fermentación (60 horas= 3 especies) y las BAA al inicio (12 horas= 6 especies) (Figura 8).

Figura 8

Mapa de calor de número de especies según grupo de microorganismos en el proceso de fermentación

Nota: Se realizó una clasificación de las especies de acuerdo con el grupo de microorganismo



al que pertenezca para ver su comportamiento durante el proceso de fermentación.

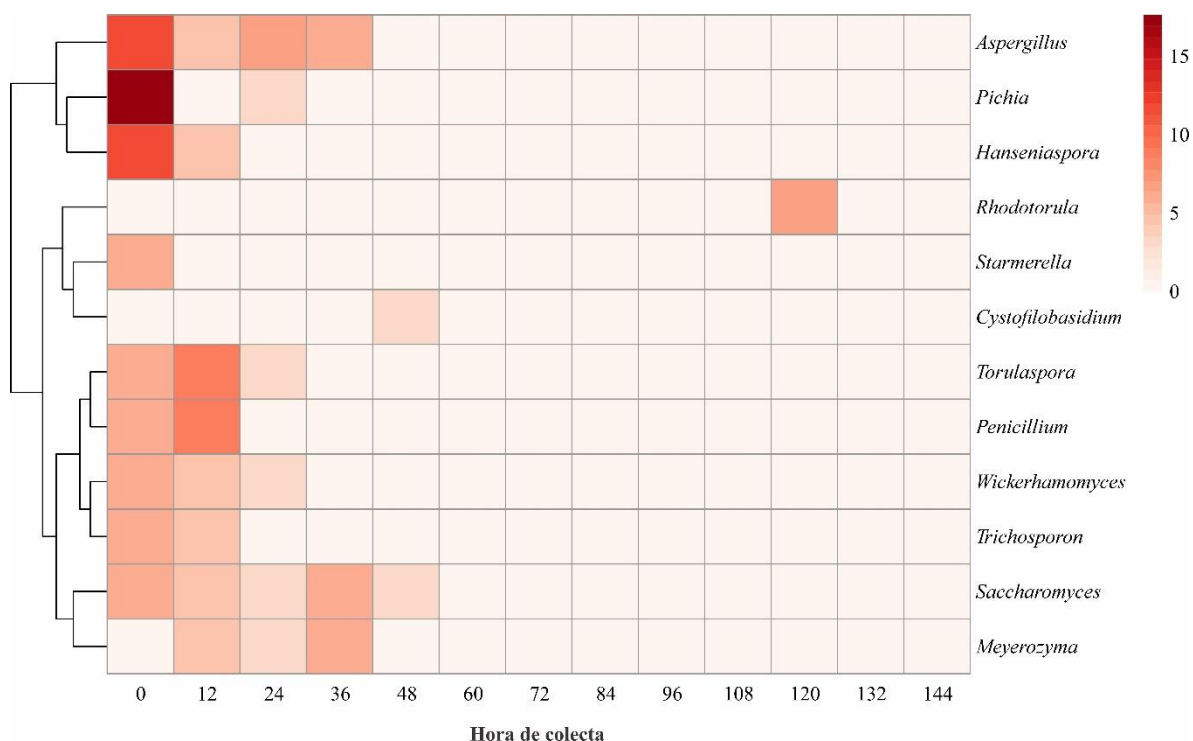
3.2.3.1. Grupo fungi

Dentro de este grupo se encontraron levaduras y los hongos filamentosos, y se identificaron 10 y 2 géneros, respectivamente. Los géneros de levadura que se identificaron fueron *Pichia*, *Torulaspota*, *Wickerhamomyces*, *Hanseniaspora*, *Starmerella*, *Trichosporon*, *Saccharomyces*, *Meyerozyma*, *Cystofilobasidium*, *Rhodotorula*. De acuerdo con el mapa de calor (Figura 9), se observó que los géneros *Pichia*, *Hanseniaspora* y *Torulaspota* fueron los géneros con mayor abundancia en la primera hora de colecta.

Los géneros de hongos presentes en este proceso de fermentación fueron *Penicillium* y *Aspergillus*, siendo este último el más abundante.

Figura 9

Mapa de calor de los géneros del grupo fungi con respecto a las horas de colecta



Nota: Esta figura muestra los porcentajes de especies por cada género que se encuentran dentro del grupo fungi.

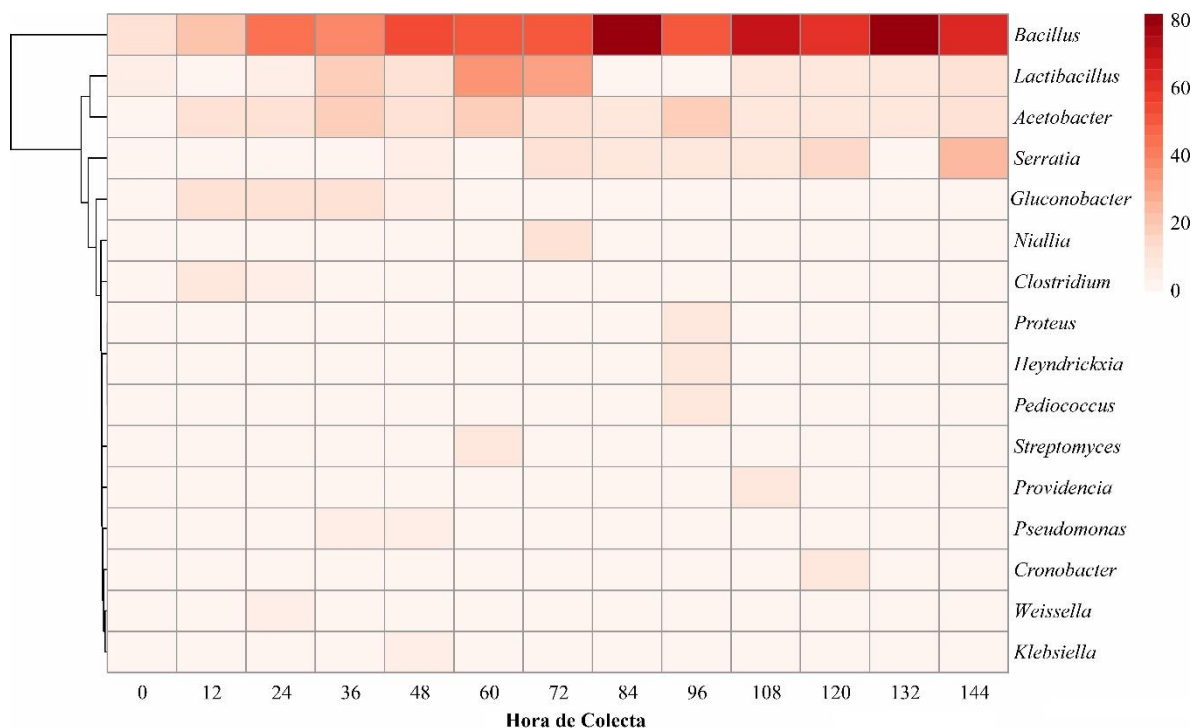
3.2.3.2. Grupo de bacterias

Se identificaron 16 géneros de bacterias, de los cuales 11 pertenecieron al subgrupo de bacterias esporogénicas: *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Streptomyces*, *Niallia*, *Heyndrickxia*, *Proteus*, *Providencia* y *Cronobacter*. Como se observa en el mapa de calor (Figura 10), el género *Bacillus* fue el más abundante de todo el grupo de bacterias. En el subgrupo de las BAL, se identificaron 3 géneros, *Lactibacillus*, *Weissella* *Pediococcus*, siendo el género *Lactibacillus* el de mayor presencia en las horas de muestreo.

Finalmente, en el subgrupo de las BAA sólo se identificaron dos géneros, *Gluconobacter* y *Acetobacter*.

Figura 10

Mapa de calor de los géneros del grupo de bacterias por horas de colecta



Nota: Esta figura muestra los porcentajes de especies por cada género que se encuentran dentro del grupo de bacterias.

3.2.4. Índices de diversidad

Se utilizaron dos índices de biodiversidad con el fin de calcular la diversidad o riqueza de especies (índice de Shannon) y dominancia de especies (índice de Simpson).

Respecto a la diversidad de especies, los valores más altos del índice de Shannon (índice que oscila entre 0 y 5) se obtuvieron a las 12 (3.02), 24 (3.05) y 48 (3.08) horas (Tabla 4), mostrando que la mayor diversidad de especies se registró en la primera etapa de la fermentación.

Por otro lado, el análisis de dominancia mostró que el índice de Simpson (índice que oscila entre 0 y 1) tuvo un valor más elevado a las 12 (0.95) y 48 (0.94) horas.

Tabla 4*Índices de Shannon- Wiener y Simpson por hora de colecta*

Hora de colecta	Índice de Shannon- Wiener	Índice de Simpson
0	2.74	0.93
12	3.02	0.95
24	3.05	0.93
36	2.72	0.92
48	3.08	0.94
60	2.42	0.91
72	2.19	0.88
84	2.22	0.87
96	2.36	0.89
108	2.52	0.92
120	2.43	0.90
132	2.34	0.90
144	1.89	0.84

Nota: Los valores de los índices fueron calculados para evaluar la diversidad y dominancia en cada una de las horas de colecta.

3.3. Caracterización de las propiedades bioquímicas de los microorganismos

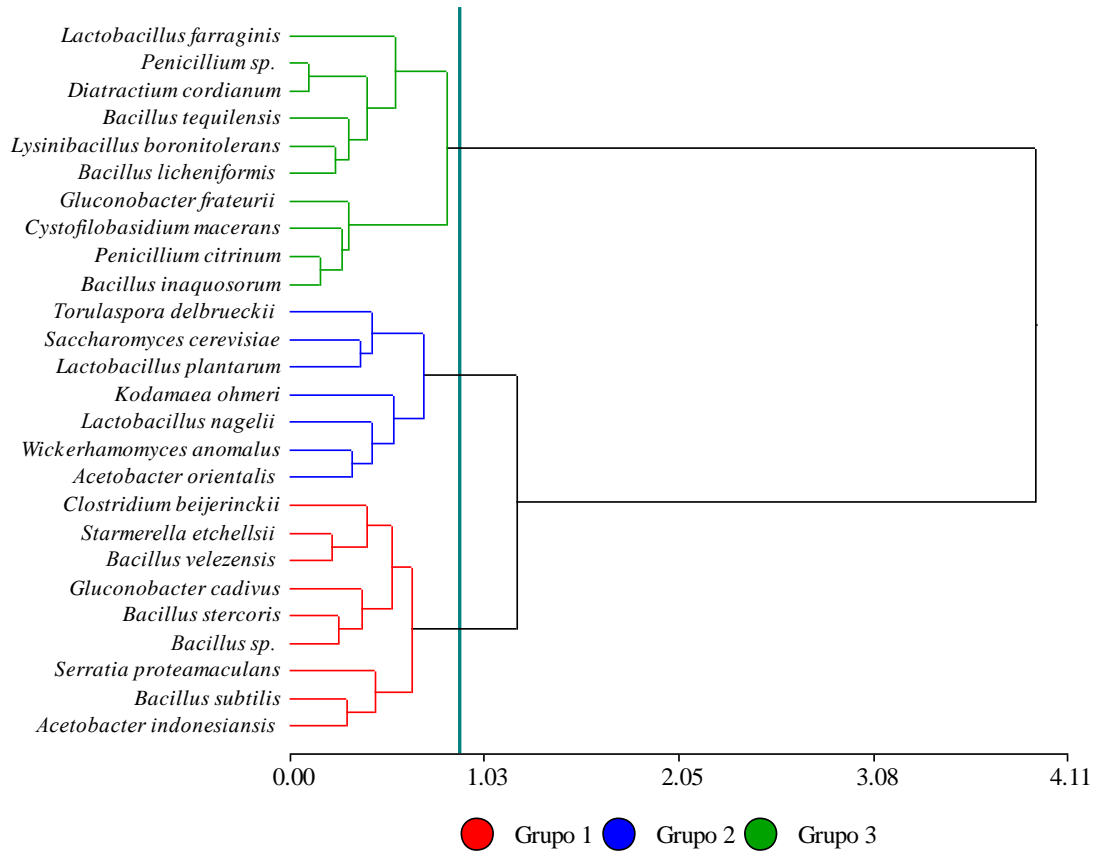
Con la finalidad de identificar microorganismos potenciales para formar parte de un cultivo iniciador de fermentación de cacao se evaluaron tres parámetros bioquímicos por triplicado. El valor promedio de asimilación de carbohidratos fue 8.06 ± 5.71 UFC/uL, siendo 1.06 y 23.67 UFC/uL los valores mínimos y máximos, respectivamente (Anexo 5). La prueba de resistencia al etanol mostró un crecimiento promedio de 13.27 ± 14.64 UFC/uL (mínimo= 0.10 UFC/uL; máximo = 61.09 UFC/uL) y 6.92 ± 10.63 (mínimo= 0.5 UFC/uL; máximo = 35.2 UFC/uL) a 8 y 15% de etanol, respectivamente (Anexo 5).

El análisis de actividad pectinolítica mostró formación de halos transparentes en 27 especies, y promedio de 0.91 ± 0.69 del índice DH/DC (mínimo= 0.1; máximo= 2.42) y 1.54 ± 1.32 del índice AH/AC (mínimo= 6.26; máximo = 1.05) (Anexo 5).

A partir de ello se realizó un análisis de conglomerados en el cual se formaron tres principales grupos (Figura 11), en el cual el grupo 2 presentó un potencial bioquímico alto y estuvo conformado por las especies *Acetobacter orientalis*, *Kodamaea ohmeri*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus*; el grupo 1 mostró un potencial bioquímico medio, conformado por las especies *Acetobacter indonesiansis*, *Bacillus* sp. *Bacillus stercoris*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis*, *Clostridium beijerinckii*, *Gluconobacter cadivus*, *Serratia proteamaculans*, *Starmerella etchellsii*; y por último con un potencial bioquímico bajo conformado por las especies *Bacillus inaquosorum*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus tequilensis*, *Cystofilobasidium macerans*, *Diatractium cordianum*, *Gluconobacter frateurii*, *Lactobacillus farraginis*, *Lysinibacillus boronitolerans*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium* sp. quienes pertenecieron al grupo 1.

Figura 11

Dendrograma del análisis de conglomerados de las pruebas bioquímicas de los microorganismos



Nota: El análisis de conglomerados nos clasifico 3 grupos de microorganismos según su potencial bioquímico (Grupo 1= potencial bioquímico medio; Grupo 2 = potencial bioquímico alto; Grupo 3 = potencial bioquímico bajo) utilizando el método de Ward (distancia de Gower = 0.9).

Para determinar la importancia de las variables numéricas en la formación de los grupos se realizaron los análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples de LSD de Fisher (Tabla 5). El análisis de varianza determinó que cuatro de las cinco variables numéricas (relación AH/AC, crecimiento en etanol al 8%, crecimiento en etanol al 15% y crecimiento en medio de carbohidratos) influenciaron en la formación de los grupos tres grupos. Respecto a las variables relación AH/AC y crecimiento en medio de carbohidratos, los grupos 1 y 2 obtuvieron valores mayores; en cambio en las variables de crecimiento en etanol al 8% y 15%, el grupo 2 fue el que reportó el mayor valor, diferenciándose significativamente de los grupos 1 y 3, con valores de crecimiento medio de 33.31 y 22.97 UFC/uL, respectivamente. Por tanto, el grupo 2 fue quien obtuvo mejores resultados en todas las variables evaluadas, independiente de la variable relación DH/DC que tuvo un comportamiento no significativo al no influir en la formación de los grupos.

Tabla 5

Test de LSD de Fisher de las cinco variables evaluadas

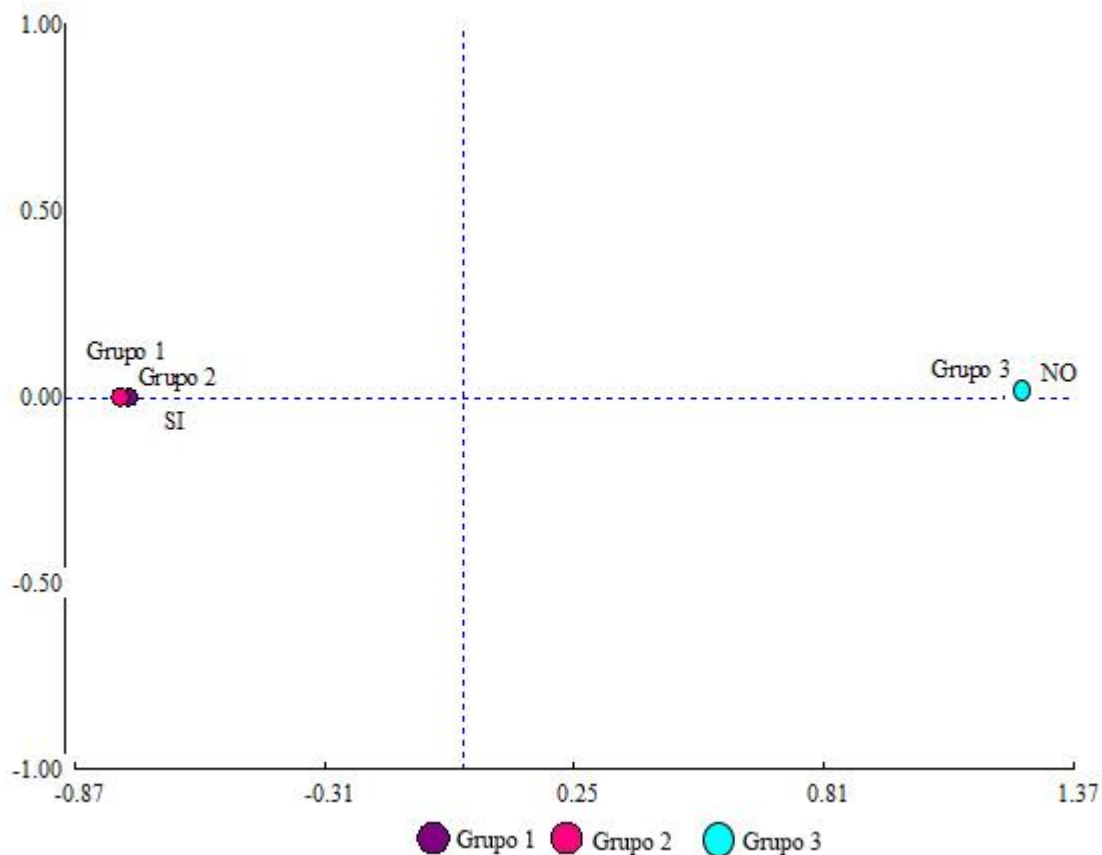
Grupo	Relación DH/DC	Relación AH/AC	Crecimiento en etanol al 8%	Crecimiento en etanol al 15%	Crecimiento en medio de carbohidratos
1	1.00 ^a	1.78 ^{ab}	6.81 ^a	1.06 ^a	11.83 ^b
2	1.07 ^a	1.87 ^{b*}	33.31 ^{b*}	22.97 ^{b*}	10.3 ^b
3	0.73 ^a	1.12 ^a	6.36 ^a	1.63 ^a	3.79 ^{a*}

Nota: * Variables con un valor de significancia $p < 0.05$; ^a y ^b corresponden a factores de formación de grupos.

Para los datos categóricos obtenidos de la variable presencia de gas, se realizaron tablas de contingencia y un análisis de correspondencias múltiples para ver su asociación con la formación de los grupos. A partir de los resultados obtenidos, se pudo observar que esta variable si tuvo un comportamiento significativo en la formación de grupos, mostrando presencia de gas en los grupos 1 y 2 (Figura 12).

Figura 12

Análisis de correspondencia múltiple de la variable categórica “presencia de gas”



Nota: Se realizó el análisis de correspondencia múltiple para la variable de presencia de gas que se evaluó para la prueba bioquímica de asimilación de carbohidratos.

A partir de los análisis estadísticos realizados a las seis variables, se puede decir que el grupo 2 de microorganismos son los que presentan mayor potencial bioquímico para la elaboración de un cultivo iniciador. Dentro de este grupo se encontraron siete especies: *Acetobacter orientalis*, *Kodamaea ohmeri*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulasporea delbrueckii* y *Wickerhamomyces anomalus*. A continuación (Tabla 6), se muestra un resumen de los resultados obtenidos para el grupo 2:

Tabla 6

Resultados de las seis variables evaluadas para las siete especies potenciales

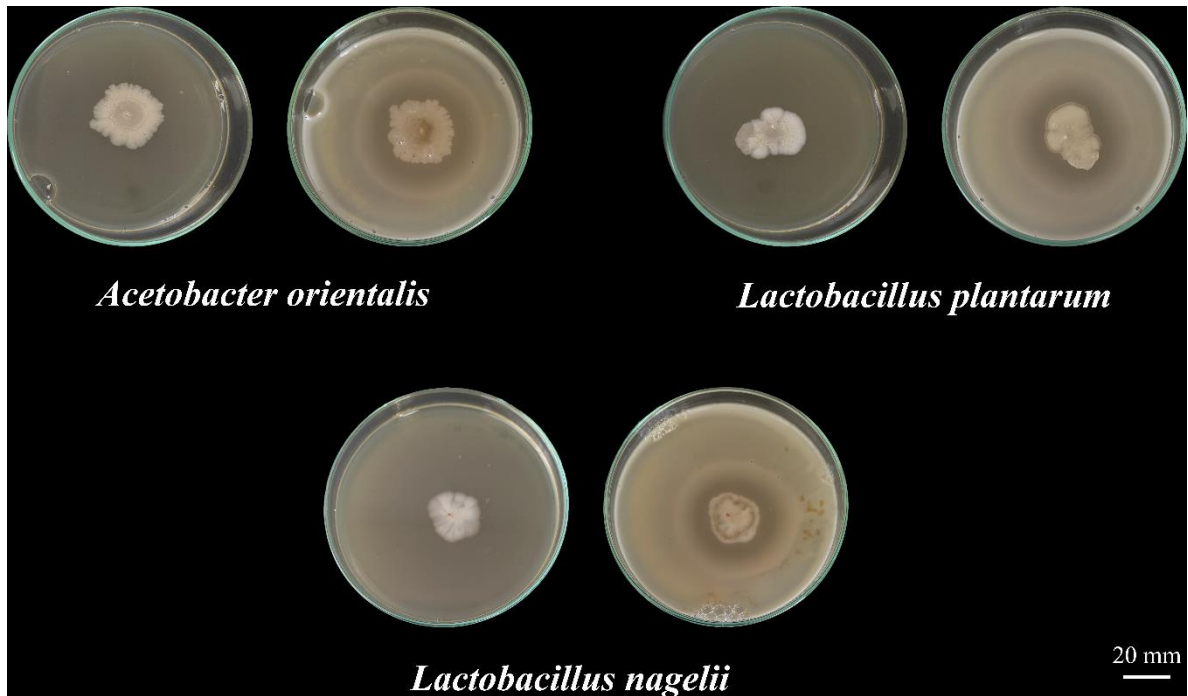
	Relación DH/DC	Relación AH/AC	Crecimiento en etanol al 8% (UFC/uL)	Crecimiento en etanol al 15% (UFC/uL)	Crecimiento en medio de carbohidratos (UFC/uL)	Presencia de gas
Levaduras						
<i>Kodamaea ohmeri</i>	1.28	1.89	56.06	34.23	4.24	Si
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.36	2.53	41.57	29.11	4.33	Si
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	1.88	2.34	25.93	21.77	13.13	Si
<i>Wickerhamomyces anomalous</i>	1.71	5.21	15.32	12.91	11.35	Si
Bacterias ácido-láctica						
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1.41	2.84	41.13	24.97	18.23	Si
<i>Lactobacillus nagelii</i>	1.36	2.45	25.93	25.98	13.86	Si
Bacterias ácido-acéticas						
<i>Acetobacter orientalis</i>	1.30	2.25	27.26	11.80	6.98	Si

Nota: Resultados de las pruebas bioquímicas de las 7 especies con alto potencial bioquímico.

En la evaluación de la actividad pectinolítica se observó la formación de halos claros o transparentes alrededor de la colonia como indicador de actividad pectinolítica (Figura 13 y 14).

Figura 13

Colonias bacterianas con mayor actividad pectinolítica



Nota: En las fotografías se muestra el antes y después de precipitar CTAB. Las placas ubicadas a lado izquierdo son colonias sin CTAB, mientras que las ubicadas a la derecha mostraron formación de halos alrededor de las colonias luego de la precipitación del CTAB.

Figura 14

Colonias de levaduras con mayor actividad pectinolítica



Nota: En las fotografías se muestra el antes y después de precipitar CTAB. Las placas ubicadas a lado izquierdo son colonias sin CTAB, mientras que las ubicadas a la derecha mostraron formación de halos alrededor de las colonias luego de precipitar la precipitación del CTAB.

IV. DISCUSIÓN

En esta investigación se evaluó la comunidad microbiana autóctona presente en todo el proceso de fermentación del cacao nativo fino de aroma de Amazonas utilizando técnicas de microbiología clásica (aislamiento, cultivo y caracterización bioquímica) y de biología molecular (DNA barcoding y secuenciamiento Sanger). Adicionalmente, se evaluaron las características fisicoquímicas durante el proceso de fermentación, pues la temperatura y pH son parámetros importantes que influyen en el crecimiento de los microorganismos (John et al., 2019; Ma et al., 2022).

El número máximo de especies de microorganismos se registró a las 48 horas de iniciada la fermentación (31 especies), además, se observó una tendencia de aumento de temperatura y disminución del pH (del fermento) conforme avanzó el proceso de fermentación.

El fuerte aumento de temperatura puede deberse a la generación de calor durante la degradación de materia orgánica por los microorganismos (Samagaci et al., 2016; Ordoñez et al., 2020), mientras que la disminución de pH, a la aparición de ácidos (láctico y acético) producto de la actividad microbiana durante el proceso de fermentación (De Vuyst & Leroy, 2020). Es importante mencionar que, cuando la temperatura alcanzó los 40°C y el pH bajó a menos de 4 (a las 60 horas del proceso de fermentación), el número de especies de microorganismos disminuyó abruptamente, ya que son pocas las especies tolerantes a estas condiciones (García et al., 2019). Esto se corroboró con el análisis de biodiversidad mediante el índice de Shannon-Wiener, el cual mostró un aumento de la diversidad en las primeras 48 horas del proceso de fermentación, mientras que la dominancia se mantuvo con valores cercanos a uno, lo que indicó que se tiene una alta riqueza y abundancia de especies en las primeras horas de fermentación.

La técnica de DNA barcoding utilizando los marcadores moleculares 16S e ITS para la identificación de bacterias y hongos, respectivamente, permitió la identificación de 80 especies de microorganismos durante todo el proceso de fermentación. Las levaduras conformaron la población dominante durante las primeras 36 horas, ya que se vieron favorecidas por la mayor concentración de glucosa, ácido cítrico y bajo nivel de oxígeno al inicio del proceso de fermentación (Mota et al., 2018; Papalexandratou et al., 2011). Las levaduras son las encargadas de degradar la pectina de la pulpa del cacao y dar inicio a la formación de compuestos aromáticos (Díaz & De Vuyst, 2022; De Vuyst & Leroy, 2020;

Ho et al., 2014). Las especies de levaduras que se lograron aislar en esta investigación fueron *Hanseniaspora meyeri*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Kodamaea ohmeri*, *Meyerozyma smithsonii*, *Pichia kluyveri*, *Pichia fermentans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulasporea delbruecki* y *Wickerhamomyces anomalus*; especies ya reportadas en investigaciones de cacao desarrolladas a nivel mundial, tales como en Ghana (Daniel et al., 2009), Costa de Marfil (Koné et al., 2016), Malasia (Ooi et al., 2020) y Brasil (Chagas et al., 2021). También se aislaron especies de levaduras como *Cystofilobasidium macerans*, *Starmerella etchellsii* y *Trichosporon coremiiforme*, especies fermentativas que aún no han sido reportadas en un proceso de fermentación de cacao.

Respecto a las bacterias ácido-lácticas, éstas tuvieron mayor predominancia en la hora 60 y 72 del proceso de fermentación, pues tras la acción de las levaduras hay mayor concentración de etanol y la pulpa, al escurrirse, que permite la entrada de aire, generando mejores condiciones para el crecimiento de las bacterias (De Vuyst & Leroy, 2020; Lefeber et al., 2011). La actividad principal de las BAL es degradar los carbohidratos residuales (glucosa y fructuosa) para convertirlos en ácido láctico (De Vuyst & Weckx, 2016; Mozzi et al., 2016; Ho et al., 2015). Dentro de este grupo se identificaron las especies *Lactobacillus plantarum*, *Lactiplantibacillus pentosus*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactiplantibacillus argenteratensis*, *Lactobacillus farraginis*, *Weissella cibaria*, *Pediococcus acidilactici*, especies que ya han sido reportadas anteriormente en fermentos de cacao por Nielsen et al., (2007) en Ghana, Kostinek et al.(2008) en Nigeria, Papalexandratou, et al. (2011) en Costa de Marfil, Illegghems et al. (2015) en Bélgica, Fanche et al. (2020) en Camerún, Viesser et al. (2020b) y Chagas et al. (2022) en Brasil.

Las bacterias ácido-acéticas presentaron un crecimiento de menor proporción desde las 12 horas del proceso de fermentación hasta el final. Este grupo de microorganismos es el encargado de convertir el etanol producido por las levaduras en ácido acético (Ouattara et al., 2017). Este proceso genera una reacción exotérmica (incremento de temperatura), la cual junto con el ácido acético presente producen la muerte del embrión (De Vuyst & Leroy, 2020; Ho et al., 2018; Lefeber et al., 2010). Dentro de este grupo se aislaron especies como: *Acetobacter orientalis*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter frateurii*, *Gluconobacter oxydans*; especies reportadas anteriormente en fermentos de cacao en Brasil (Cruz et al., 2017), Costa de Marfil (Soumahoro et al., 2020), Bélgica (Moens et al., 2014), Ghana

(Cleenwerck et al., 2007), Ecuador (Papalexandratou, Camu, et al., 2011) y Malasia (Papalexandratou et al., 2013). También se aislaron las especies *Gluconobacter cadivus*, *Acetobacter cerevisiae* y *Acetobacter indonesiansis*, quienes aún no han sido reportadas en estudios de fermento de cacao.

Las bacterias esporogénicas, o formadoras de espora, fueron encontradas durante todo el proceso de fermentación; sin embargo, en la etapa final se registró un aumento de su población, ya que las condiciones de bajo pH (3.85) y alta temperatura (por encima de los 50°C) favorecen el crecimiento de este grupo de bacterias (Sonenshein, 2014). Sin embargo, algunas de estas bacterias aparecen en el fermento de cacao por las condiciones de manejo y manipulación (Pereira & Santa Ana, 2018; Schwan, 1998) y producen compuestos químicos y proteínas proteolíticas que proporcionan acidez y sabores y olores desagradables al grano de cacao (Sarbu & Csutak, 2019). Otros estudios reportan que las bacterias esporogénicas también podrían aportar en el sabor produciendo compuestos saborizantes, como 2,3-butanodiol y ácidos orgánicos (Ouattara et al., 2008). Se aislaron 47 especies dentro de este grupo de bacterias pertenecientes en su mayoría al género *Bacillus*, y otra menor proporción a los géneros *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Niallia*, *Heyndrickxia*, *Pediococcus*, *Proteus*, *Providencia* y *Cronobacter*.

El grupo de microorganismos con menor población fue el de hongos filamentosos, ya que solo se aislaron las especies *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium citrinum* y cuyo crecimiento se dio en las primeras horas del proceso de fermentación pues tienden a desarrollarse en ambientes más fríos y en la superficie del fermento (Sarbu & Csutak, 2019). La presencia de este grupo se asocia a la contaminación por un mal manejo o una mala manipulación (Pereira & Santa Ana, 2018).

De las 80 especies de microorganismos aisladas, 27 tuvieron resultados positivos a las tres pruebas bioquímicas aplicadas. De este número, se seleccionaron siete especies por tener los mejores resultados, lo que significa que poseen mayor potencial bioquímico para formar parte de un cultivo iniciador. Se evaluó la capacidad de degradación la pectina (actividad pectinolítica) y asimilación de carbohidratos, ya que la pulpa de cacao está compuesta por pectina y otros carbohidratos simples (glucosa, fructosa, sacarosa), y se priorizó la selección de microorganismos con capacidad para para acelerar el tiempo de fermentación y eliminar la pulpa mucilaginoso (Ouattara et al., 2008; Silva et al., 2013). Además, se evaluó su

resistencia en concentraciones de etanol porque en las primeras horas de la fermentación las concentraciones de etanol son altas (Mota et al., 2018; Ordoñez et al., 2020), y lo que se busca es que estos microorganismos sobrevivan en estas condiciones.

Dentro del grupo de microorganismos con potencial bioquímico para ser parte de un cultivo iniciador se encuentran cuatro especies de levaduras, dos especies de BAL y una especie de BAA. Dentro de las levaduras se obtuvo a las especies *Torulaspota delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus* y *Kodamaea ohmeri*, levaduras con actividad fermentativa y que pueden contribuir a la formación de compuestos aromáticos (Mota et al., 2018). *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* fueron parte de un mix de cultivo iniciador en un estudio en Brasil, el cual generó buenos resultados al mejorar el sabor del chocolate (Visintin et al., 2017). *Lactobacillus plantarum*, y *Lactobacillus nagelii* son bacterias ácido-lácticas que tienen un mecanismo fermentativo que degrada carbohidratos presentes en el cacao (Illegghems et al., 2015), mientras que *Acetobacter orientalis*, bacteria ácido acética, también presenta propiedades fermentativas, pero que aún no ha sido estudiada como parte de un cultivo iniciador.

Con este estudio se busca proponer especies potenciales para la elaboración de un cultivo iniciador, y así, contribuir con el desarrollo sostenible de la producción de cacao, pues se enfoca en generar beneficios económicos, sociales y ambientales para las familias productoras. El principal beneficio económico es la propuesta de una alternativa que busca incrementar la calidad del cacao con fines de exportación (Figuroa et al., 2019), convirtiéndolo en un producto competitivo a nivel nacional y mundial, y con ello se incrementaría el costo del cacao y a su vez el nivel de ingresos de los agricultores. El uso de un cultivo iniciador también generará beneficios sociales y ambientales, ya que los agricultores mejoraran sus condiciones de vida (Gori et al., 2021; Liu et al., 2017) y se utilizará una herramienta biotecnológica (basada en microorganismos autóctonos) que no generará contaminación de suelo y agua. Finalmente, este estudio se enmarca en los siguientes objetivos de desarrollo sustentable como: ODS 1 “Fin de la Pobreza”, ODS 2 “Hambre Cero” y ODS 8 “Promover el crecimiento económico inclusivo y sostenible, el empleo y el trabajo decente para todos” (FAO, 2019).

V. CONCLUSIONES

- La caracterización fisicoquímica del fermento de cacao mostró que el pH disminuyó de 4.79 a 3.59, la temperatura aumentó de 26°C a 55°C, y la humedad relativa disminuyó de 74% a 41.85% durante todo el proceso de fermentación; estos valores no se vieron influenciados por la temperatura y humedad del ambiente donde se desarrolló este proceso.
- Los resultados mostraron un alto crecimiento de colonias durante las primeras 48 horas de fermentación, mientras que a partir de las 60 horas el número de especies de microorganismos declinó; esto debido a que la temperatura alcanzó los 40°C y el pH bajó a menos de 4, convirtiéndose en condiciones extremas en el que son pocos los microorganismos que pueden sobrevivir.
- A lo largo del proceso de fermentación se identificaron 80 especies, siendo las horas 24 y 48, las que presentaron mayor número de especies (31 y 30 especies, respectivamente). Del total de especies, se obtuvieron 47 especies pertenecieron a bacterias esporogénicas, 14 a levaduras, 8 a BAL, 7a BAA y 4 a hongos filamentosos. El grupo de las bacterias esporogénicas predominó en la hora 84, las levaduras y hongos filamentosos a las 0 horas, las BAL en la hora 72, y, por último, las BAA a las 36 horas.
- Las bacterias esporogénicas son grupo de microorganismos más predominantes durante el proceso de fermentación, puesto que en una fermentación espontánea no se tiene un control estricto de asepsia.
- Se identificaron tres especies de levaduras (*Cystofilobasidium macerans*, *Starmerella etchellsii*, *Trichosporon coremiiforme*) y tres especies de bacterias ácidos acéticas (*Acetobacter cerevisiae*, *Acetobacter indonesiansis* y *Gluconobacter cadivus*) que aún no han sido reportadas en estudios de fermento de cacao.
- Los análisis bioquímicos aplicados a los microorganismos (resistencia al etanol, asimilación de carbohidratos y actividad pectinolítica) identificaron siete especies con alto potencial bioquímico para mejorar el proceso de fermentación del cacao (4 levaduras, 2 BAL y 1 BAA): *Acetobacter orientalis*, *Kodamaea ohmeri*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus*.

VI. RECOMENDACIONES

- A partir de la identificación de las siete especies de microorganismos con alto potencial bioquímico para mejorar el proceso de fermentación del cacao, se deberían realizar análisis posteriores para evaluar su compatibilidad y co-crecimiento entre especies (pruebas de antagonismo), con el fin de elaborar un cultivo iniciador idóneo en el que los microorganismos no compitan entre sí.
- Este estudio podría ser usado también para evaluar las concentraciones óptimas de cada especie que podría conformar un cultivo iniciador y la dosificación ideal de aplicación del cultivo en los fermentos de cacao para obtener mejores resultados. Adicionalmente, se recomienda considerar evaluar el tiempo de fermentación adecuado cuando se busque aplicar el cultivo iniciador.
- Elaborar un protocolo de conservación de estos microorganismos para obtener una presentación más accesible para los productores.
- Replicar el estudio en otros lugares para ampliar el número de especies potenciales para cultivos iniciadores en nuestro país.
- Evaluar cuál es el efecto de las bacterias esporogénicas en el fermento de cacao, haciendo una comparación del puntaje de catación con el crecimiento de este grupo de microorganismos dentro del fermento de cacao.
- Proponer la creación de centros o bancos de conservación de microorganismos con potencial agronómico e industrial.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, P., Frey, L., Berger, A., Bolten, C., Hansen, C. E., & Wittmann, C. (2014). The key to acetate: Metabolic fluxes of acetic acid bacteria under cocoa pulp fermentation-simulating conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(15), 4702–4716. <https://doi.org/10.1128/AEM.01048-14>
- Afoakwa, E., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(9), 840–857. <https://doi.org/10.1080/10408390701719272>
- Agyirifo, D., Wamalwa, M., Otwe, E., Galyuon, I., Runo, S., Takrama, J., & Ngeranwa, J. (2019). Metagenomics analysis of cocoa bean fermentation microbiome identifying species diversity and putative functional capabilities. *Heliyon*, 5(7), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02170>
- Beckett, S. T. (2009). Industrial Chocolate Manufacture and Use: Fourth Edition. In *Industrial Chocolate Manufacture and Use: Fourth Edition*. <https://doi.org/10.1002/9781444301588>
- Boccardo, G., & Ruiz, F. (2019). RStudio para Estadística Descriptiva en Ciencias Sociales. *Manual de Apoyo Docente Para La Asignatura Estadística Descriptiva. Carrera de Sociología, Universidad de Chile, segunda*, 1–127. https://www.researchgate.net/profile/Felipe-Ruiz-13/publication/334308025_RStudio_para_Estadistica_Descriptiva_en_Ciencias_Sociales_Manual_de_apoyo_docente_para_la_asignatura_Estadistica_Descriptiva_Carrera_de_Sociologia_Universidad_de_Chile_segunda_edici
- Bortolini, C., Patrone, V., Puglisi, E., & Morelli, L. (2016). Detailed analyses of the bacterial populations in processed cocoa beans of different geographic origin, subject to varied fermentation conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 236, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.004>
- Bouza, C. N., & Covarrubias, D. (2005). Estimación del índice de diversidad de Simpson en M sitios de muestreo. *Revista Investigación Operacional*, 26(2), 187–197.
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J., Vancanneyt, M., & De Vuyst, L. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of

- lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1809–1824. <https://doi.org/10.1128/AEM.02189-06>
- Chagas, G., Ferreira, N., Gloria, M., Gobira, R., Maia, F., & Lopes, A. (2022). Identification of Lactic Acid Bacteria on Raw Material for Cocoa Bean Fermentation in the Brazilian Amazon. *Fermentation*, 8(5), 2–7. <https://doi.org/10.3390/fermentation8050199>
- Chagas, G., Ferreira, N., & Lopes, A. (2021). The microbiota diversity identified during the cocoa fermentation and the benefits of the starter cultures use: an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 544–552. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14740>
- Cleenwerck, I., Camu, N., Engelbeen, K., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., De Vos, P., & De Vuyst, L. (2007). *Acetobacter ghanensis* sp. nov., a novel acetic acid bacterium isolated from traditional heap fermentations of Ghanaian cocoa beans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(7), 1647–1652. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64840-0>
- Crafack, M., Mikkelsen, M., Saerens, S., Knudsen, M., Blennow, A., Lowor, S., Takrama, J., Swiegers, J., Petersen, G., Heimdal, H., & Nielsen, D. (2013). Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 103–116. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.024>
- Cruz, M., Castro, L., Efraim, P., Santos, C., Lima, N., & Schwan, R. F. (2017). Cocoa fermentation: Microbial identification by MALDI-TOF MS, and sensory evaluation of produced chocolate. *Lwt*, 77, 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.076>
- Dagnino, J. (2014). Correlación. *Revista Chilena de Anestesia*, 43(2), 150–153. http://www.sachile.cl/upfiles/revistas/54e63a1a778ff_15_correlacion-2-2014_edit.pdf
- Daniel, H., Vrancken, G., Takrama, J., Camu, N., De Vos, P., & De Vuyst, L. (2009). Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Research*, 9(5), 774–783. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00520.x>
- De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 5–17.

<https://doi.org/10.1111/jam.13045>

- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2020). Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(4), 432–453. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa014>
- Díaz, C., & De Vuyst, L. (2022). Functional yeast starter cultures for cocoa fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 133(1), 39–66. <https://doi.org/10.1111/jam.15312>
- Dujon, B., & Louis, E. (2017). Genome diversity and evolution in the budding yeasts (*Saccharomycotina*). *Genetics*, 206(2), 717–750. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.199216>
- Fanche, S., Tchokonthe, A., Diguta, C., Kamdem, S., Israel, F., Matei, F., & Ngang, J. (2020). Antifungal properties of lactic acid bacteria isolated from cocoa beans fermentation in the centre region of Cameroon. *Romanian Biotechnological Letters*, 25(2), 1407–1417. <https://doi.org/10.25083/rbl/25.2/1407.1417>
- FAO. (2019). El apoyo de la FAO para alcanzar los Objetivos del Desarrollo Sostenible en América del Sur-Panorama. Panorama actual. In *Fao*. <https://www.fao.org/3/ca3884es/CA3884ES.pdf>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2018). *FAOSTAT - Base de datos*. Production Quantities of Cocoa, Beans by Country. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Figuerola, C., Mota, J., Ferrocino, I., Hernández, Z. J., González, O., Cocolin, L., & Suárez, M. L. (2019). The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 301, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.002>
- García, E., Serna, A., Córdoba, D., Marín, J., Montalvo, C., & Ordoñez, G. (2019). Estudio de la fermentación espontánea de cacao (*Theobroma Cacao* L.) y evaluación de la calidad de los granos en una unidad productiva a pequeña escala. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 6(1), 41–51.
- Gori, A., Burney, J., Martínez, J., & Cesano, D. (2021). Improving production and quality of life for smallholder farmers through a climate resilience program: An experience in the Brazilian Sertão. *PLoS ONE*, 16(5 May), 1–20.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251531>

- Ho, V., Fleet, G., & Zhao, J. (2018). Unravelling the contribution of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria to cocoa fermentation using inoculated organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 279, 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.040>
- Ho, V., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 72–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014>
- Ho, V., Zhao, J., & Fleet, G. (2015). The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 54–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.031>
- ICCO (Organización Internacional. (2014). *Reporte Anual 2014/2015*. 53.
- Illegghems, K., De Vuyst, L., & Weckx, S. (2015). Comparative genome analysis of the candidate functional starter culture strains *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus plantarum* 80 for controlled cocoa bean fermentation processes. *BMC Genomics*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1927-0>
- INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática). (2019). *Producción de cacao se expandió 33,3% en enero de presente año, Perú*. <http://m.inei.gob.pe/prensa/noticias/produccion-de-cacao-se-expandio-333-en-enero-de-presente-ano-11468/>
- John, W., Böttcher, N., Aßkamp, M., Bergounhou, A., Kumari, N., Ho, P. W., D’Souza, R., Nevoigt, E., & Ullrich, M. (2019). Forcing fermentation: Profiling proteins, peptides and polyphenols in lab-scale cocoa bean fermentation. *Food Chemistry*, 278, 786–794. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.108>
- Katz, D., Doughty, K., & Ali, A. (2011). Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15(10), 2779–2811. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3697>
- Koné, M. K., Guéhi, S. T., Durand, N., Ban-Koffi, L., Berthiot, L., Tachon, A. F., Brou, K., Boulanger, R., & Montet, D. (2016). Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Research*

- International*, 89, 910–917. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.010>
- Kostinek, M., Ban, L., Ottah, M., Teniola, D., Schillinger, U., Holzappel, W., & Franz, C. M. (2008). Diversity of predominant lactic acid bacteria associated with cocoa fermentation in Nigeria. *Current Microbiology*, 56(4), 306–314. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9097-9>
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K., Prüß, B., Kaplan, T., Wiebner, E., Stewart, G. , & Scherer, S. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(4), 1373–1382. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1373>
- Lefeber, T., Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N., & De Vuyst, L. (2011). Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Food Microbiology*, 28(3), 457–464. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.010>
- Lefeber, T., Janssens, M., Camu, N., & De Vuyst, L. (2010). Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), 7708–7716. <https://doi.org/10.1128/AEM.01206-10>
- Lefeber, T., Papalexandratou, Z., Gobert, W., Camu, N., & De Vuyst, L. (2012). On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. *Food Microbiology*, 30(2), 379–392. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.021>
- Liu, X., Gu, S., Duan, S., Wu, Y., Ye, C., Wang, J., & Dong, H. (2017). Comparative Study on Health-Related Quality of Life of Farmers and Workers. *Value in Health Regional Issues*, 12, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.vhri.2017.03.006>
- Ma, S., Luo, H., Zhao, D., Qiao, Z., Zheng, J., An, M., & Huang, D. (2022). Environmental factors and interactions among microorganisms drive microbial community succession during fermentation of Nongxiangxing daqu. *Bioresource Technology*, 345(October 2021), 126549. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126549>
- Machuca, J., Suárez, E., Darricau, E., & Mialhe, E. (2019). Molecular characterization of

- microorganisms during cocoa-bean fermentation process (*Theobroma cacao*). *Revista Peruana de Biología*, 26(4), 535–542. <https://doi.org/10.15381/rpb.v26i4.17220>
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., & Clark, D. (2009). *Biología de los microorganismos*. In Pearson (Ed.), *Biología de los microorganismos* (12th ed.).
- McCarthy, C. (1998). *Chromas* (version 1.45.). School of Health Science. Griffith University. Southport (Australia). <http://technelysium.com.au/wp/chromas/>
- MINAGRI (Ministerio de Agricultura y Riego). (2016). *Estudio del Cacao en el Perú y el Mundo, Un análisis de la producción y el comercio*. <https://bibliotecavirtual.minagri.gob.pe/index.php/analisis-economicos/estudios/2016/21-estudio-del-cacao-en-el-peru-y-en-el-mundo/file>
- Moens, F., Lefeber, T., & De Vuyst, L. (2014). Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(6), 1848–1857. <https://doi.org/10.1128/AEM.03344-13>
- Mota, J., Botta, C., Ferrocino, I., Giordano, M., Bertolino, M., Dolci, P., Cannoni, M., & Cocolin, L. (2018). Dynamics and biodiversity of bacterial and yeast communities during fermentation of cocoa beans. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19). <https://doi.org/10.1128/AEM.01164-18>
- Mozzi, F., Raya, R. R., Vignolo, G. M., De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications, Second Edition. Edited The Functional Role of Lactic Acid Bacteria in Cocoa Bean Fermentation Chapter 16 16.1. Introduction*. www.tomsekstra.dk;
- Nielsen, D. S., Hønholt, S., Tano-Debrah, K., & Jespersen, L. (2005). Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast*, 22(4), 271–284. <https://doi.org/10.1002/yea.1207>
- Nielsen, D., Schillinger, U., Franz, C., Bresciani, J., Amoa, W., Holzappel, W., & Jakobsen, M. (2007). *Lactobacillus ghanensis* sp. nov., a motile lactic acid bacterium isolated from Ghanaian cocoa fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(7), 1468–1472. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.64811-0>
- Ooi, T., Sepiah, M., & Khairul, S. (2016). Effect of Yeast Species on Total Soluble Solids ,

- Total Polyphenol Content and Fermentation Index during Simulation Study of Cocoa Fermentation. *International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology*, 3(7), 477–483.
- Ooi, T., Ting, A., & Siow, L. (2020). Influence of selected native yeast starter cultures on the antioxidant activities, fermentation index and total soluble solids of Malaysia cocoa beans: A simulation study. *LWT -Food Science and Technology*, 122. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108977>
- Ordenanza Regional N°368. (n.d.). *Gobierno Regional Amazonas/CR*. Diario oficial El Peruano.
- Ordoñez, R., Landines, E., Urresto, J., & Caicedo, C. (2020). Microorganisms during cocoa fermentation: Systematic review. *Foods and Raw Materials*, 8(1), 155–162. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-1-155-162>
- Ouattara, H., Ouattara, H., Droux, M., Reverchon, S., Nasser, W., & Niamke, S. (2017). Lactic acid bacteria involved in cocoa beans fermentation from Ivory Coast: Species diversity and citrate lyase production. *International Journal of Food Microbiology*, 256, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.008>
- Ouattara, H., Koffi, B., Karou, G., Sangaré, A., Niamke, S., & Diopoh, J. (2008). Implication of *Bacillus* sp. in the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1753–1760. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9683-9>
- Papalexandratou, Z., Camu, N., Falony, G., & De Vuyst, L. (2011). Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. *Food Microbiology*, 28(5), 964–973. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.01.010>
- Papalexandratou, Z., Falony, G., Romanens, E., Jimenez, J. C., Amores, F., Daniel, H. M., & De Vuyst, L. (2011). Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7698–7714. <https://doi.org/10.1128/AEM.05523-11>
- Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O. S., Daniel, H. M., & De Vuyst, L.

- (2013). *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa . *Food Microbiology*, 35(2), 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.02.015>
- Pereira, A., & Santa Ana, A. (2018). Diversity and fate of spore forming bacteria in cocoa powder, milk powder, starch and sugar during processing: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 76, 101–118. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.005>
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: inferencia basada en el índice de shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31(8), 583–585. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33911906.pdf>
- Reineccius, G. (2005). Flavor Chemistry and Technology. In *Flavor Chemistry and Technology*. <https://doi.org/10.1201/9780203485347>
- Rojo, O., Barbosa, L., Zeppa, G., & Stévigny, C. (2020). Cocoa bean shell—a by-product with nutritional properties and biofunctional potential. *Nutrients*, 12(4), 1–29. <https://doi.org/10.3390/nu12041123>
- Samagaci, L., Ouattara, H., Niamké, S., & Lemaire, M. (2016). *Pichia kudrazevii* and *Candida nitrativorans* are the most well-adapted and relevant yeast species fermenting cocoa in Agneby-Tiassa, a local Ivorian cocoa producing region. *Food Research International*, 89, 773–780. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.007>
- Sarbu, I., & Csutak, O. (2019). The microbiology of cocoa fermentation. In *Caffeinated and Cocoa Based Beverages: Volume 8. The Science of Beverages*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815864-7.00013-1>
- Schwan, R. (1998). Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4), 1477–1483. <https://doi.org/10.1128/aem.64.4.1477-1483.1998>
- Schwan, R., & Wheals, A. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 205–221. <https://doi.org/10.1080/10408690490464104>
- Shannon, C., & Weiner, W. (1949). The Theory of Mathematical Communication. *International Business*, 131.

https://pure.mpg.de/rest/items/item_2383164_3/component/file_2383163/content

- Silva, C., Vilela, D., De Souza, C., Duarte, W., Dias, D., & Schwan, R. (2013). Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(2), 235–247. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1175-2>
- Soares, M., Da Silva, R., & Gomes, E. (1999). Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: Characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia*. <https://doi.org/10.1590/S0001-37141999000400002>
- Sonenshein, A. (2014). Endospore-Forming Bacteria: an Overview. *Prokaryotic Development*, 131–150. <https://doi.org/10.1128/9781555818166.ch6>
- Soumahoro, S., Ouattara, H., Droux, M., Nasser, W., Niamke, S., & Reverchon, S. (2020). Acetic acid bacteria (AAB) involved in cocoa fermentation from Ivory Coast: species diversity and performance in acetic acid production. *Journal of Food Science and Technology*, 57(5), 1904–1916. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04226-2>
- Thompson, S., Miller, K., Lopez, A., & Camu, N. (2014). Cocoa and Coffee. In *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch35>
- Velasco, S. (2017). *Caracterización de microorganismos con capacidad fermentativa en el proceso de elaboración de la chicha de uva*. Repositorio Digital UTE.
- Viesser, J., De Melo, G., De Carvalho, D., Vandenberghe, L., Azevedo, V., Brenig, B., Rogez, H., Góes, A., & Soccol, C. (2020a). Exploring the contribution of fructophilic lactic acid bacteria to cocoa beans fermentation: Isolation, selection and evaluation. *Food Research International*, 136(April), 109478. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109478>
- Viesser, J., De Melo, G., De Carvalho, D., Vandenberghe, L., Azevedo, V., Brenig, B., Rogez, H., Góes, A., & Soccol, C. (2020b). Exploring the contribution of fructophilic lactic acid bacteria to cocoa beans fermentation: Isolation, selection and evaluation. *Food Research International*, 136(June), 109478. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109478>
- Visintin, S., Alessandria, V., Valente, A., Dolci, P., & Cocolin, L. (2016). Molecular identification and physiological characterization of yeasts, lactic acid bacteria and acetic

acid bacteria isolated from heap and box cocoa bean fermentations in West Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 216, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.004>

Visintin, S., Ramos, L., Batista, N., Dolci, P., Schwan, F., & Cocolin, L. (2017). Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 257(2016), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.004>

Wickerham, L. (1951). Taxonomy of Yeasts. *Department of Agriculture, Nature*, 1029, 1–51.

Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(1), 329–337. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-329>

Zhao, S., Guo, Y., Sheng, Q., & Shyr, Y. (2014). Advanced Heat Map and Clustering Analysis Using Heatmap3. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/986048>

ANEXOS

Anexo 1. Tabla de la caracterización morfológica tanto macroscópica como microscópica de los microorganismos aislados.

Código de aislamiento	Hora de colecta	Medio de cultivo	Tipo de organismo	Tamaño	Forma	Consistencia	Textura	Elevación	Color	Olor	Borde	Comportamiento respecto a la luz	Bacterias		Hongos	
													Gram	Forma	Forma	Tipo de reproducción
F1	0	PDA	Bacteria	Mediana	Circular	Mucoide	Lisa	Convexa	Blanco	Frutado	Entero	Brillante	Positiva	Bacilos		
F2	0	PDA	Bacteria	Mediana	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
F3	0	AEM	Levadura	Grande	Irregular	Dura	Lisa	Plana	Blanco	Frutado	Ondulado	Opaco			Ovoide	Gemación
F5	0	AEM	Levadura	Pequeña	Puntiforme	Pulverulenta	Lisa	Convexo	Blanco	Frutado	Ondulado	Opaco			Esférica	Ascosporas
F7	0	AEM	Levadura	Pequeño	Irregular	Pulverulenta	Lisa	Umbonada	Crema	Frutado	Ondulado	Traslucido			Elíptica	Ascosporas
F8	0	AEM	Levadura	Grande	Irregular	Mucoide	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Ondulado	Opaco			Esférica	Gemación
F9	0	AEM	Levadura	Mediana	Circular	Mucoide	Lisa	Convexa	Blanco	Frutado	Entero	Brillante			Ovoide	Gemación
F10	0	AEM	Levadura	Mediana	Circular	Cremosa	Lisa	Convexa	Blanco	Frutado	Entero	Opaco			Ovoide	Gemación
F11	0	AEM	Levadura	Pequeña	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Blanco	Frutado	Entero	Traslucido			Ovoide	Bipartición
F12	0	PDA	Bacteria	Grande	Irregular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
F13	0	AEM	Levadura	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Convexa	Blanco	Frutado	Entero	Traslucido			Ovoide	Ascosporas
F15	0	AEM	Hongo	Mediana	Radial		Pulverulenta		Verde y Blanco						Con Hifas	Conidios
F16	0	AEM	Levadura	Mediana	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Traslucido			Ovoide	Bipartición
F17	0	AEM	Levadura	Mediana	Irregular	Cremosa	Rugosa	Convexa	Amarillo	Frutado	Ondulado	Opaco			Ovoide	Gemación
F18	0	AEM	Hongo	Grande	Radial		Aterciopelado		Verde petróleo						Con Hifas	Conidios
F19	0	AEM	Hongo	Grande	Radial		Aterciopelado		Plomo						Con Hifas	Conidios
F22	0	PDA	Bacteria	Mediano	Irregular	Mucoide	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Ondulado	Brillante	Positiva	Bacilos		

D21	12	AEM	Levadura	Mediana	Circular	Cremosa	Lisa	Plana	Blanco	Frutado	Entero	Opaco			Elíptica	Gemación
D22	12	AEM	Levadura	Mediana	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexo	Blanco	Frutado	Ondulado	Opaco			Esférica	Ascosporas
D24	12	PDA	Bacteria	Mediana	Irregular	Rugosa	Lisa	Plana	Crema	Sin Olor	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
D25	12	PDA	Bacteria	Mediana	Irregular	Cremosa	Rugosa	Plana	Blanco	Sin Olor	Lobulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
D26	12	PDA	Bacteria	Pequeña	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Putrefacto	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
D27	12	PDA	Bacteria	Mediana	Irregular	Membranosa	Plegada	Plana	Crema	Putrefacto	Ondulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
D28	12	PDA	Bacteria	Pequeña	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Putrefacto	Entero	Transparente	Positiva	Bacilos		
D29	12	PDA	Bacteria	Grande	Irregular	Mucoide	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Negativa	Cocobacilos		
D1	12	PDA	Bacteria	Mediana	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
D2	12	PDA	Bacteria	Grande	Irregular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
D3	12	PDA	Hongo	Mediano	Rugoso		Algodonoso		Blanco	Terroso					Hifas	Conidios
D4	12	PDA	Hongo	Mediana	Radial		Pulverulenta		Verde Y Blanco	Tierra					Hifas	Conidios
D6	12	AEM	Levadura	Mediana	Irregular	Cremosa	Rugosa	Convexa	Amarillo	Frutado	Ondulado	Opaco			Ovoide	Gemación
D7	12	AEM	Levadura	Mediana	Circular	Mucoide	Lisa	Convexa	Blanco	Frutado	Entero	Brilloso			Ovoide	Gemación
D8	12	YGC	Bacteria	Mediano	Puntiforme	Cremosa	Rugosa	Plana	Crema	Frutado	Ondulado	Opaco	Negativo	Bacilos		
D13	12	PDA	Levadura	Mediano	Rugoso	Pulverulenta	Lisa	Convexo	Blanco	Frutado	Ondulado	Opaco			Esférica	Ascosporas
D14	12	PDA	Bacteria	Pequeñas	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Negativa	Cocobacilos		
D15	12	PDA	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Sin Olor	Entero	Opaco	Negativa	Bacilos		
D16	12	AEM	Levadura	Mediana	Circular	Cremosa	Lisa	Convexa	Blanco	Frutado	Entero	Opaco			Ovoide	Gemación
D17	12	AEM	Levadura	Mediana	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Traslucido			Ovoide	Bipartición
D18	12	YGC	Bacteria	Mediano	Irregular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Ondulado	Opaco	Negativa	Bacilos		
D19	12	YGC	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Marrón	Frutado	Ondulado	Brilloso	Negativa	Bacilos		
D11	12	AEM	Hongo	Grande	Radial		Aterciopelado		Verde petróleo	Sin Olor					Hifas	Conidios
G1	24	PDA	Levadura	Mediana	Circular	Cremosa	Lisa	Convexa	Blanco	Frutado	Entero	Opaco			Ovoide	Gemación

G2	24	YGC	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Pulverulenta	Lisa	Plana	Marrón	Frutado	Ondulado	Brilloso	Negativa	Bacilos		
G3	24	AEM	Levadura	Grande	Irregular	Mucoide	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Ondulado	Opaco			Esférica	Gemación
G10	24	AEM	Levadura	Mediana	Circular	Mucoide	Lisa	Convexa	Blanco	Frutado	Entero	Brilloso			Ovoide	Gemación
G4	24	YGC	Bacteria	Mediano	Puntiforme	Cremosa	Rugosa	Plana	Crema	Frutado	Ondulado	Opaco	Negativo	Bacilos		
G5	24	PDA	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Sin Olor	Entero	Opaco	Negativa	Bacilos		
G6	24	YGC	Bacteria	Mediano	Irregular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Ondulado	Opaco	Negativa	Bacilos		
G8	24	PDA	Bacteria	Pequeña	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Putrefacto	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
G11	24	AEM	Hongo	Grande	Radial		Aterciopelado		Verde petróleo	Sin Olor					Hifas	Conidios
G12	24	AEM	Levadura	Mediana	Circular	Cremosa	Lisa	Plana	Blanco	Frutado	Entero	Opaco			Elíptica	Gemación
G13	24	MRS	Bacteria	Mediano	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Convexa	Amarillo	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
G14	24	MRS	Bacteria	Mediano	Irregular	Cremosa	Rugosa	Convexa	Blanco	Putrefacto	Ondulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
G15	24	MRS	Bacteria	Mediana	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Cocobacilos		
G16	24	MRS	Bacteria	Mediana	Circular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Sin Olor	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
G17	24	MRS	Bacteria	Mediana	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
G18	24	MRS	Bacteria	Mediano	Irregular	Mucoide	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Ondulado	Brilloso	Positiva	Bacilos		
G20	24	MRS	Bacteria	Grande	Irregular	Cremosa	Plegada	Plana	Crema	Frutado	Lobulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
G21	24	MRS	Bacteria	Mediana	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
G23	24	MRS	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
G24	24	MRS	Bacteria	Mediano	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
G25	24	MRS	Bacteria	Grande	Irregular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
G26	24	PDA	Levadura	Grande	Rizoide	Cremosa	Lisa	Convexo	Blanco	Frutado	Ondulado	Opaco			Esférica	Ascosporas
G27	24	MRS	Bacteria	Pequeñas	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Negativa	Cocobacilos		
G28	24	PDA	Bacteria	Mediana	Irregular	Membrana	Plegada	Plana	Crema	Putrefacto	Ondulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
G19	24	PDA	Bacteria	Mediana	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Ondulado	Brilloso	Positiva	Bacilos		
G33	24	AEM	Hongo	Mediana	Radial		Aterciopelada		Verde Con Blanco	Tierra					Hifas	Conidios
G36	24	YGC	Bacteria	Mediano	Irregular	Cremosa	Lisa	Elevada	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		

G39	24	YGC	Bacteria	Grande	Irregular	Mucoide	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Negativa	Cocobacilos		
G40	24	YGC	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
G41	24	YGC	Bacteria	Grande	Rizoide	Cremosa	Rugosa	Plana	Marrón	Frutado	Lobulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
C1	36	MRS	Bacteria	Mediano	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Convexa	Amarillo	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
C3	36	YGC	Bacteria	Mediano	Irregular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Ondulado	Opaco	Negativa	Bacilos		
C4	36	YGC	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Marrón	Frutado	Ondulado	Brilloso	Negativa	Bacilos		
C5	36	MRS	Bacteria	Grande	Irregular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Lobulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
C6	36	MRS	Bacteria	Mediano	Irregular	Mucoide	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Ondulado	Brilloso	Positiva	Bacilos		
C7	36	MRS	Bacteria	Mediana	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
C11	36	MRS	Bacteria	Pequeñas	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Negativa	Cocobacilos		
C12	36	PDA	Bacteria	Mediana	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Convexa	Blanco	Frutado	Ondulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
C13	36	PDA	Hongo	Grande	Radial		Aterciopelado		Verde petróleo	Sin Olor					Hifas	Conidios
C17	36	PDA	Levadura	Mediana	Circular	Cremosa	Lisa	Convexa	Blanco	Frutado	Entero	Opaco			Ovoide	Gemación
C18	36	PDA	Bacteria	Mediano	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Convexa	Amarillo	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
C20	36	AEM	Levadura	Mediana	Circular	Cremosa	Lisa	Plana	Blanco	Frutado	Entero	Opaco			Elíptica	Gemación
C21	36	YGC	Bacteria	Mediano	Puntiforme	Cremosa	Rugosa	Plana	Crema	Frutado	Ondulado	Opaco	Negativo	Bacilos		
C10	36	YGC	Bacteria	Grande	Rizoide	Cremosa	Rugosa	Plana	Marrón	Frutado	Lobulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
C23	36	YGC	Bacteria	Mediano	Irregular	Membrana	Plegada	Plana	Crema	Putrefacto	Ondulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
C16	36	YGC	Bacteria	Pequeño	Irregular	Cremosa	Lisa	Plana	Marrón	Putrefacto	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
C24	36	YGC	Bacteria	Grande	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Sin Olor	Ondulado	Opaco	Negativa	Bacilos		
H1	48	YGC	Bacteria	Mediano	Irregular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Ondulado	Opaco	Negativa	Bacilos		
H2	48	MRS	Bacteria	Mediano	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Amarilla	Frutado	Ondulado	Brilloso	Positiva	Bacilos		
H3	48	PDA	Levadura	Mediana	Circular	Cremosa	Lisa	Convexa	Blanco	Frutado	Entero	Opaco			Ovoide	Gemación
H5	48	MRS	Bacteria	Mediano	Irregular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Putrefacto	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
H6	48	PDA	Bacteria	Mediano	Circular	Mucoide	Lisa	Convexa	Blanco	Frutado	Entero	Brillante	Positiva	Bacilos		

H4	48	YGC	Bacteria	Mediano	Puntiforme	Cremosa	Rugosa	Plana	Crema	Frutado	Ondulado	Opaco	Negativo	Bacilos		
H7	48	PDA	Bacteria	Mediano	Circular	Cremosa	Rugosa	Convexa	Blanco	Frutado	Ondulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
H9	48	YGC	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Marrón	Frutado	Ondulado	Brillante	Negativa	Bacilos		
H11	48	MRS	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Sin Olor	Entero	Brillante	Positiva	Bacilos		
H12	48	MRS	Bacteria	Mediano	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Convexa	Amarillo	Frutado	Entero	Brillante	Positiva	Bacilos		
H13	48	MRS	Bacteria	Mediano	Circular	Cremosa	Lisa	Convexa	Naranja	Frutado	Entero	Brillante	Negativa	Bacilos		
H15	48	MRS	Bacteria	Grande	Irregular	Cremosa	Rugosa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Brillante	Negativa	Cocos		
H16	48	MRS	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Brillante	Positiva	Bacilos		
H18	48	MRS	Bacteria	Mediano	Circular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Traslucido	Positiva	Bacilos		
H20	48	MRS	Bacteria	Mediana	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
H21	48	MRS	Bacteria	Grande	Rizoide	Cremosa	Rugosa	Plana	Marrón	Frutado	Lobulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
H22	48	MRS	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Sin Olor	Entero	Brillante	Positiva	Bacilos		
H24	48	MRS	Bacteria	Mediano	Irregular	Mucoide	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Ondulado	Brillante	Positiva	Bacilos		
H25	48	MRS	Bacteria	Pequeñas	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Negativa	Cocobacilos		
H26	48	MRS	Bacteria	Mediano	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Brillante	Positiva	Bacilos		
H27	48	MRS	Bacteria	Grande	Irregular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
H28	48	YGC	Bacteria	Grande	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Sin Olor	Ondulado	Opaco	Negativa	Bacilos		
H29	48	PDA	Bacteria	Mediano	Irregular	Cremosa	Rugosa	Convexa	Blanco	Putrefacto	Ondulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
H33	48	AEM	Levadura	Mediano	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Convexa	Naranja	Frutado	Entero	Brillante			Ovoide	Gemación
H34	48	AEM	Hongo	Mediano	Irregular		Pulverulenta		Crema	Sin Olor					Con hifas	Conidios
H35	48	YGC	Bacteria	Mediano	Irregular	Membrana	Plegada	Plana	Crema	Putrefacto	Ondulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
H36	48	AEM	Levadura	Mediano	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Convexa	Naranja	Frutado	Entero	Brillante			Ovoide	Gemación
H37	48	YGC	Bacteria	Mediano	Irregular	Mucoide	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Ondulado	Brillante	Positiva	Bacilos		
H38	48	YGC	Bacteria	Mediana	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
H39	48	YGC	Bacteria	Pequeño	Irregular	Membrana	Plegada	Plana	Crema	Putrefacto	Ondulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
H40	48	YGC	Bacteria	Grande	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Sin Olor	Ondulado	Opaco	Negativa	Bacilos		
I1	60	PDA	Bacteria	Mediano	Circular	Cremosa	Rugosa	Convexa	Blanco	Frutado	Ondulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
I2	60	PDA	Bacteria	Pequeña	Puntiforme	Mucoide	Lisa	Plana	Crema	Sin Olor	Entero	Transparente	Positiva	Espirilos		

I3	60	MRS	Bacteria	Pequeño	Irregular	Membrano sa	Plegada	Plana	Crema	Putrefact o	Ondulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
I4	60	MRS	Bacteria	Mediano	Irregular	Mucoide	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Ondulado	Brilloso	Positiva	Bacilos		
I6	60	MRS	Bacteria	Mediana	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Negativa	Bacilos		
I7	60	MRS	Bacteria	Grande	Rizoide	Cremosa	Rugosa	Plana	Marrón	Frutado	Lobulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
I9	60	YGC	Bacteria	Pequeño	Puntifor me	Cremosa	Lisa	Plana	Marrón	Frutado	Ondulado	Brilloso	Negativa	Bacilos		
I10	60	MRS	Bacteria	Mediano	Puntifor me	Cremosa	Lisa	Convexa	Amaril lo	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
I11	60	MRS	Bacteria	Mediano	Puntifor me	Cremosa	Lisa	Convexa	Amaril lo	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
I12	60	MRS	Bacteria	Mediano	Irregular	Cremosa	Rugosa	Convexa	Blanco	Putrefact o	Ondulado	Opaco	Positiva	Espirilos		
I13	60	YGC	Bacteria	Mediano	Puntifor me	Cremosa	Rugosa	Plana	Crema	Frutado	Ondulado	Opaco	Negativo	Bacilos		
I14	60	PDA	Bacteria	Mediano	Circular	Cremosa	Rugosa	Convexa	Blanco	Frutado	Ondulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
I8	60	PDA	Bacteria	Mediana	Circular	Cremosa	Lisa	Convexa	Blanco	Sin Olor	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
B3	72	MRS	Bacteria	Mediana	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
B5	72	PDA	Bacteria	Pequeño	Irregular	Cremosa	Lisa	Plana	Marrón	Putrefact o	Ondulado	Brilloso	Positiva	Bacilos		
B8	72	MRS	Bacteria	Mediano	Puntifor me	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Negativa	Cocobac ilos		
B6	72	PDA	Bacteria	Mediano	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Blanco	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
B7	72	PDA	Bacteria	Mediano	Circular	Cremosa	Lisa	Convexa	Naranj a	Frutado	Entero	Brilloso	Negativa	Bacilos		
B9	72	MRS	Bacteria	Mediano	Puntifor me	Cremosa	Lisa	Convexa	Amaril lo	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
B11	72	MRS	Bacteria	Pequeño	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Sin Olor	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
B12	72	MRS	Bacteria	Pequeño	Puntifor me	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
B13	72	PDA	Bacteria	Mediano	Irregular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Putrefact o	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
B14	72	PDA	Bacteria	Mediano	Puntifor me	Cremosa	Lisa	Convexa	Amaril lo	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
B15	72	YGC	Bacteria	Pequeño	Puntifor me	Cremosa	Lisa	Plana	Marrón	Frutado	Ondulado	Brilloso	Negativa	Bacilos		
A1	84	MRS	Bacteria	Grande	Irregular	Mucoide	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Transparent e	Positiva	Bacilos		
A3	84	MRS	Bacteria	Pequeño	Puntifor me	Mucoide	Lisa	Plana	Crema	Sin Olor	Entero	Traslucido	Positiva	Bacilos		
A6	84	MRS	Bacteria	Grande	Irregular	Membrano sa	Plegada	Plana	Crema	Putrefact o	Ondulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
A8	84	PDA	Bacteria	Mediano	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Amaril la	Frutado	Ondulado	Brilloso	Positiva	Bacilos		

A9	84	PDA	Bacteria	Mediana	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
A10	84	MRS	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Mucoide	Lisa	Plana	Naranja	Frutado	Entero	Traslucido	Positiva	Bacilos		
A14	84	MRS	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Trasparente	Positiva	Bacilos		
A15	84	YGC	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Marrón	Frutado	Ondulado	Brilloso	Negativa	Bacilos		
A17	84	PDA	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
A12	84	PDA	Bacteria	Grande	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Marrón	Putrefacto	Entero	Brilloso	Negativa	Bacilos		
A7	84	PDA	Bacteria	Mediano	Circular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
J1	96	MRS	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Negativa	Bacilos		
J2	96	PDA	Bacteria	Mediana	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
J3	96	YGC	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Marrón	Frutado	Ondulado	Brilloso	Negativa	Bacilos		
J4	96	MRS	Bacteria	Mediano	Irregular	Mucoide	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Ondulado	Brilloso	Positiva	Bacilos		
J5	96	MRS	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Cocos		
J6	96	MRS	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
J7	96	MRS	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Negativa	Espirilos		
J8	96	YGC	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Negativa	Cocobacilos		
J10	96	MRS	Bacteria	Grande	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Marrón	Putrefacto	Entero	Brilloso	Negativa	Bacilos		
J11	96	MRS	Bacteria	Grande	Irregular	Cremoso	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
J12	96	MRS	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Traslucida	Positiva	Bacilos		
J13	96	MRS	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
E1	108	MRS	Bacteria	Grande	Irregular	Mucoide	Lisa	Plana	Crema	Putrefacto	Entero	Traslucida	Negativa	Bacilos		
E2	108	MRS	Bacteria	Pequeño	Irregular	Cremoso	Lisa	Convexa	Crema	Sin Olor	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
E3	108	MRS	Bacteria	Mediano	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Convexa	Amarillo	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
E4	108	MRS	Bacteria	Mediano	Irregular	Mucoide	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Ondulado	Brilloso	Positiva	Bacilos		
E5	108	MRS	Bacteria	Mediana	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
E6	108	MRS	Bacteria	Mediano	Circular	Cremoso	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Brillosa	Negativa	Bacilos		
E7	108	PDA	Bacteria	Mediana	Circular	Cremosa	Lisa	Elevada	Crema	Sin Olor	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
E9	108	MRS	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		

E11	108	MRS	Bacteria	Grande	Irregular	Cremoso	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
E13	108	PDA	Bacteria	Grande	Rizoide	Cremosa	Rugosa	Plana	Marrón	Frutado	Lobulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
E8	108	YGC	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Brillante	Negativa	Cocobacilos		
E15	108	PDA	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Mucoide	Lisa	Plana	Crema	Sin Olor	Entero	Traslucido	Positiva	Bacilos		
E10	108	MRS	Bacteria	Grande	Irregular	Mucoide	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Ondulado	Transparente	Positiva	Bacilos		
K1	120	MRS	Bacteria	Grande	Irregular	Cremoso	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
K2	120	MRS	Bacteria	Mediano	Irregular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Putrefacto	Entero	Brillante	Positiva	Bacilos		
K3	120	MRS	Bacteria	Mediana	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
K4	120	MRS	Bacteria	Mediano	Circular	Cremosa	Lisa	Convexa	Naranja	Frutado	Entero	Brillante	Negativa	Bacilos		
K5	120	MRS	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Brillante	Positiva	Bacilos		
K7	120	MRS	Bacteria	Mediano	Irregular	Mucoide	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Ondulado	Brillante	Positiva	Bacilos		
K8	120	MRS	Bacteria	Grande	Irregular	Mucoide	Lisa	Plana	Crema	Putrefacto	Entero	Traslucida	Negativa	Bacilos		
K10	120	MRS	Bacteria	Grande	Irregular	Cremoso	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
K12	120	PDA	Levadura	Grande	Circular	Cremosa	Lisa	Elevada	Rosado	Frutado	Entero	Opaco			Elíptica	Gemación
K13	120	MRS	Bacteria	Grande	Rizoide	Cremosa	Rugosa	Plana	Marrón	Frutado	Lobulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
K15	120	MRS	Bacteria	Mediano	Irregular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Putrefacto	Entero	Brillante	Positiva	Bacilos		
K16	120	MRS	Bacteria	Mediana	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
K17	120	PDA	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Blanco	Frutado	Entero	Brillante	Positiva	Bacilos		
K18	120	YGC	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Brillante	Negativa	Cocobacilos		
K19	120	PDA	Bacteria	Grande	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Blanco	Putrefacto	Entero	Brillante	Negativa	Bacilos		
L1	132	PDA	Bacteria	Grande	Irregular	Membranosa	Plegada	Plana	Crema	Putrefacto	Ondulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
L2	132	PDA	Bacteria	Mediana	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Brillante	Positiva	Bacilos		
L3	132	PDA	Bacteria	Pequeña	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Blanco	Frutado	Entero	Brillante	Positiva	Bacilos		
L4	132	MRS	Bacteria	Grande	Irregular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Putrefacto	Entero	Transparente	Positiva	Bacilos		
L5	132	MRS	Bacteria	Mediano	Irregular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Putrefacto	Entero	Brillante	Positiva	Bacilos		
L6	132	MRS	Bacteria	Grande	Irregular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		

L7	132	YGC	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Negativa	Cocobacilos		
L8	132	MRS	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
L9	132	MRS	Bacteria	Mediana	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
L10	132	MRS	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Sin Olor	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
L11	132	MRS	Bacteria	Grande	Irregular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
M1	144	MRS	Bacteria	Mediano	Circular	Cremosa	Lisa	Convexa	Naranja	Frutado	Entero	Brilloso	Negativa	Bacilos		
M8	144	YGC	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Negativa	Cocobacilos		
M2	144	MRS	Bacteria	Pequeño	Puntiforme	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
M3	144	PDA	Bacteria	Grande	Rizoide	Cremosa	Rugosa	Plana	Marrón	Frutado	Lobulado	Opaco	Positiva	Bacilos		
M4	144	MRS	Bacteria	Mediana	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Brilloso	Positiva	Bacilos		
M5	144	MRS	Bacteria	Mediana	Irregular	Cremosa	Lisa	Convexa	Crema	Frutado	Entero	Opaco	Positiva	Bacilos		
M6	144	MRS	Bacteria	Mediano	Circular	Cremosa	Lisa	Convexa	Naranja	Frutado	Entero	Brilloso	Negativa	Bacilos		
M7	144	MRS	Bacteria	Grande	Irregular	Cremosa	Lisa	Plana	Crema	Sin Olor	Lobulado	Trasparente	Positiva	Bacilos		

Anexo 2. Identificación molecular de las 220 muestras aisladas y comparadas con la base de datos de Genbank con un porcentaje de similitud del 98%.

Código de aislamiento	Código de extracción	Hora de colecta	Nombre de la especie según Genbank	Código de Genbank	Porcentaje de similitud (%)
F1	MC_53	0	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MT613627.1	100
F2	MC_170	0	<i>Bacillus subtilis</i>	ON834409.1	100
F3	MC_16	0	<i>Pichia kluyveri</i>	FM199971.1	99.76
F4	MC_207	0	<i>Aspergillus fumigatus</i>	OW988641.1	100
F5	MC_46	0	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	OW984619.1	100
F6	MC_07	0	<i>Kodamaea ohmeri</i>	LC317627.1	98.13
F7	MC_03	0	<i>Pichia fermentans</i>	KF468218.1	100
F8	MC_23	0	<i>Kodamaea ohmeri</i>	LC317627.1	99.01
F9	MC_10	0	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	OW986480.1	99.66
F10	MC_39	0	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MH979683.1	100
F11	MC_37	0	<i>Hanseniaspora meyeri</i>	KY103531.1	100
F12	MC_15	0	<i>Bacillus</i> sp.	MT579845.2	101
F13	MC_17	0	<i>Starmerella etchellsii</i>	MH037567.1	100
F14	MC_33	0	<i>Bacillus subtilis</i>	ON882057.1	100
F15	MC_204	0	<i>Penicillium citrinum</i>	ON908684.1	100
F16	MC_36	0	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	MN378439.1	98.83
F17	MC_32	0	<i>Trichosporon coremiiforme</i>	MH536831.2	100
F18	MC_210	0	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MT593013.1	100
F19	MC_213	0	<i>Aspergillus</i> sp.	ON797317.1	100
F20	MC_01	0	<i>Bacillus subtilis</i>	MW012661.1	100
F21	MC_208	0	<i>Penicillium citrinum</i>	MT529436.1	99.81
F22	MC_26	0	<i>Bacillus licheniformis</i>	MN889250.1	99.46
D21	MC_88	12	<i>Meyerozyma smithsonii</i>	MT529031.1	100
D22	MC_57	12	<i>Torulaspora delbruecki</i>	MN902080.1	99.84
D24	MC_67	12	<i>Paenibacillus vulneris</i>	MT033023.1	98.61
D25	MC_29	12	<i>Clostridium diolis</i>	MF988698.2	100
D26	MC_24	12	<i>Clostridium beijerinckii</i>	KT799797.1	100
D27	MC_54	12	<i>Bacillus tequilensis</i>	ON961696.1	99.9
D28	MC_79	12	<i>Lysinibacillus</i> sp.	MT033087.1	100
D29	MC_94	12	<i>Gluconobacter cadivus</i>	KT366868.1	99.92
D1	MC_97	12	<i>Bacillus subtilis</i>	ON860647.1	100
D2	MC_98	12	<i>Bacillus</i> sp.	MT579845.1	100
D3	MC_205	12	<i>Penicillium</i> sp.	MT606202.1	99.77
D4	MC_209	12	<i>Penicillium citrinum</i>	OK103903.1	99.79
D5	MC_20	12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MT641207.1	100
D6	MC_40	12	<i>Trichosporon coremiiforme</i>	MH536831.1	100

D7	MC_35	12	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	MT573404.1	100
D8	MC_38	12	<i>Acetobacter orientalis</i>	ON681573.1	100
D9	MC_215	12	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MT597427.1	100
D13	MC_21	12	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	MN902080.1	99.85
D14	MC_89	12	<i>Gluconobacter frateurii</i>	OK036475.1	99.92
D20	MC_13	12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MT641207.1	100
D15	MC_85	12	<i>Gluconobacter oxydans</i>	MK759917.1	99.54
D16	MC_08	12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MT641207.1	100
D17	MC_202	12	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	MN378439.1	98.93
D18	MC_25	12	<i>Acetobacter cerevisiae</i>	MK573792.1	99.13
D19	MC_22	12	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	CP039846.1	100
D11	MC_206	12	<i>Aspergillus fumigatus</i>	OW988639.1	100
G1	MC_96	24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CP046092.1	99.87
G2	MC_65	24	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	CP039846.1	99.59
G3	MC_27	24	<i>Kodamaea ohmeri</i>	MT443963.1	100
G10	MC_34	24	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	OW988593.1	100
G4	MC_28	24	<i>Acetobacter orientalis</i>	ON681573.1	100
G5	MC_19	24	<i>Gluconobacter oxydans</i>	MK759917.1	99.14
G6	MC_11	24	<i>Acetobacter cerevisiae</i>	MK573792.1	99.43
G7	MC_05	24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MT641207.1	100
G8	MC_30	24	<i>Clostridium beijerinckii</i>	KT799797.1	100
G9	MC_09	24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MT641207.1	100
G11	MC_211	24	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MT635279.1	100
G12	MC_214	24	<i>Meyerozyma smithsonii</i>	MT529031.1	100
G13	MC_151	24	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	CP060182.1	99.64
G14	MC_259	24	<i>Lysinibacillus macroides</i>	MT218365.1	99.71
G15	MC_168	24	<i>Cytobacillus eiseniae</i>	MH894260.1	99.77
G16	MC_224	24	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	MH385002.1	100
G17	MC_223	24	<i>Bacillus subtilis</i>	ON882057.1	100
G18	MC_113	24	<i>Bacillus licheniformis</i>	ON847335.1	100
G20	MC_235	24	<i>Bacillus vallismortis</i>	ON715120.1	100
G21	MC_164	24	<i>Bacillus subtilis</i>	ON882057.1	100
G23	MC_153	24	<i>Bacillus cereus</i>	ON892078.1	100
G24	MC_120	24	<i>Bacillus stercoris</i>	MK449440.1	99.93
G25	MC_245	24	<i>Bacillus</i> sp.	MT579845.1	100
G26	MC_221	24	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	MK267806.1	100
G27	MC_108	24	<i>Gluconobacter frateurii</i>	OK036475.1	99.98
G28	MC_68	24	<i>Bacillus tequilensis</i>	OU548685.1	100
G30	MC_61	24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MT641207.1	100
G19	MC_80	24	<i>Bacillus toyonensis</i>	MT106888.1	99.79
G22	MC_277	24	<i>Bacillus licheniformis</i>	ON847335.1	100
G31	MC_63	24	<i>Bacillus subtilis</i>	KY785660.1	98.91
G32	MC_02	24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MT641207.1	100

G33	MC_203	24	<i>Aspergillus venenatus</i>	MT582760.1	100
G35	MC_187	24	<i>Bacillus velezensis</i>	MT377875.1	99.85
G36	MC_174	24	<i>Weissella cibaria</i>	LC434017.1	99.85
G38	MC_178	24	<i>Bacillus subtilis</i>	KU862331.1	99.78
G39	MC_177	24	<i>Gluconobacter cadivus</i>	KT366868.1	99.92
G40	MC_186	24	<i>Bacillus haynesii</i>	ON243947.1	98.44
G41	MC_188	24	<i>Bacillus velezensis</i>	MT078641.1	99.93
C1	MC_106	36	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	CP060182.1	100
C3	MC_116	36	<i>Acetobacter cerevisiae</i>	MK573792.1	99.74
C4	MC_140	36	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	CP039846.1	100
C5	MC_139	36	<i>Bacillus</i> sp.	ON908569.1	100
C6	MC_234	36	<i>Bacillus licheniformis</i>	ON847335.1	100
C7	MC_274	36	<i>Bacillus subtilis</i>	ON882057.1	100
C11	MC_237	36	<i>Gluconobacter frateurii</i>	OK036475.1	99.95
C12	MC_95	36	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	ON908798.1	100
C13	MC_212	36	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MK184454.1	98.15
C17	MC_87	36	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CP046092.1	100
C18	MC_81	36	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	CP060182.1	99
C19	MC_12	36	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MT641207.1	100
C20	MC_04	36	<i>Meyerozyma smithsonii</i>	MT529031.1	99.58
C21	MC_179	36	<i>Acetobacter orientalis</i>	ON681573.1	100
C10	MC_176	36	<i>Bacillus velezensis</i>	MT377875.1	99.92
C22	MC_184	36	<i>Gluconobacter frateurii</i>	OK036475.1	99.96
C23	MC_196	36	<i>Bacillus tequilensis</i>	ON763277.1	100
C16	MC_191	36	<i>Bacillus inaquosorum</i>	ON763264.1	100
C24	MC_172	36	<i>Pseudomonas poae</i>	MN307366.1	99.26
H1	MC_161	48	<i>Acetobacter cerevisiae</i>	MK573792.1	99.74
H2	MC_136	48	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MN538240.1	97.91
H3	MC_126	48	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MT522376.1	100
H5	MC_76	48	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	MT507228.1	99.93
H6	MC_155	48	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MN809380.1	99.86
H4	MC_275	48	<i>Acetobacter orientalis</i>	ON681573.1	100
H7	MC_49	48	<i>Lactobacillus nagelii</i>	MT597696.1	100
H8	MC_143	48	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MT641207.1	100
H9	MC_244	48	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	CP039846.1	100
H11	MC_138	48	<i>Bacillus clausii</i>	MH938303.1	99.9
H12	MC_146	48	<i>Lactiplantibacillus argentoratensis</i>	ON908773.1	99.92
H3	MC_18	48	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MT641207.1	100
H13	MC_249	48	<i>Serratia liquefaciens</i>	MT279350.1	100
H15	MC_117	48	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ON556694.1	100
H16	MC_103	48	<i>Bacillus cereus</i>	MT533979.1	100
H18	MC_159	48	<i>Bacillus pacificus</i>	ON885910.1	99.84

H20	MC_119	48	<i>Bacillus subtilis</i>	ON891846.1	99.77
H21	MC_169	48	<i>Bacillus velezensis</i>	MT078641.1	99.85
H22	MC_271	48	<i>Bacillus clausii</i>	MK097350.1	98.91
H24	MC_166	48	<i>Bacillus licheniformis</i>	ON847335.1	100
H25	MC_264	48	<i>Gluconobacter frateurii</i>	OK036475.1	99.97
H26	MC_162	48	<i>Bacillus stercoris</i>	MK449440.1	99.75
H27	MC_148	48	Bacillus sp.	MF567372.1	99.78
H28	MC_185	48	<i>Pseudomonas poae</i>	MN307366.1	99.9
H29	MC_62	48	<i>Lysinibacillus macroides</i>	MT197307.1	99.68
H30	MC_200	48	<i>Pseudomonas poae</i>	MN307366.1	100
H10	MC_31	48	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MT641207.1	100
H31	MC_180	48	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MT641207.1	99.84
H19	MC_173	48	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MT641207.1	99.84
H32	MC_197	48	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MT641207.1	99.84
H33	MC_194	48	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	MG938354.1	100
H34	MC_198	48	<i>Peltaster</i> sp.	MF075293.1	98.42
H35	MC_175	48	<i>Bacillus tequilensis</i>	MG651220.1	99.93
H36	MC_190	48	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	MT236399.1	99.83
H37	MC_183	48	<i>Bacillus licheniformis</i>	CP099860.1	100
H38	MC_181	48	<i>Bacillus subtilis</i>	ON882057.1	100
H39	MC_195	48	<i>Bacillus tequilensis</i>	MN560016.1	99.92
H40	MC_199	48	<i>Pseudomonas poae</i>	MN307366.1	100
H41	MC_182	48	<i>Bacillus licheniformis</i>	ON847335.1	100
I1	MC_72	60	<i>Lactobacillus nagelii</i>	MT597696.1	100
I2	MC_47	60	<i>Streptomyces xylanilyticus</i>	MT239510.1	100
I3	MC_201	60	<i>Bacillus tequilensis</i>	ON878125.1	99.85
I4	MC_255	60	<i>Bacillus licheniformis</i>	ON847335.1	99.85
I6	MC_276	60	<i>Bacillus subtilis</i>	MW255041.1	99.01
I7	MC_105	60	<i>Bacillus velezensis</i>	MN062956.1	100
I9	MC_156	60	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	CP039846.1	100
I10	MC_160	60	<i>Lactiplantibacillus argentoratensis</i>	ON908775.1	99.93
I11	MC_154	60	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	CP060182.1	99.83
I12	MC_135	60	<i>Lysinibacillus macroides</i>	MT197307.1	100
I13	MC_258	60	<i>Acetobacter orientalis</i>	ON681573.1	100
I14	MC_77	60	<i>Lactobacillus nagelii</i>	MT597696.1	100
I8	MC_71	60	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	MT033087.1	100
B3	MC_109	72	<i>Bacillus subtilis</i>	MF993344.1	99.86
B5	MC_70	72	<i>Bacillus inaquosorum</i>	ON763264.1	100
B8	MC_157	72	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	CP060182.1	99.2
B6	MC_90	72	<i>Niallia circulans</i>	MT492088.1	99.36
B7	MC_45	72	<i>Serratia liquefaciens</i>	MK981171.1	100

B9	MC_225	72	<i>Lactiplantibacillus argentoratensis</i>	ON908808.1	99.92
B10	MC_134	72	<i>Bacillus subtilis</i>	OK655678.1	99.85
B11	MC_114	72	<i>Paenibacillus lautus</i>	JX296361.1	99.49
B12	MC_279	72	<i>Bacillus xiamenensis</i>	MT611424.1	100
B13	MC_101	72	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	OK618376.1	99.55
B14	MC_55	72	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	CP060172.1	100
B15	MC_226	72	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	CP039846.1	100
A1	MC_222	84	<i>Lysinibacillus mangiferihumi</i>	KU161280.1	100
A2	MC_241	84	<i>Bacillus tequilensis</i>	JN700073.1	99.92
A3	MC_152	84	<i>Rummeliibacillus pycnus</i>	KT382255.1	99.78
A5	MC_250	84	<i>Bacillus subtilis</i>	ON860647.1	100
A6	MC_253	84	<i>Bacillus tequilensis</i>	MG651220.1	99.77
A8	MC_56	84	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KU922494.1	98.98
A9	MC_73	84	<i>Bacillus subtilis</i>	ON860647.1	100
A10	MC_260	84	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	MF662528.1	99.7
A11	MC_112	84	<i>Bacillus tequilensis</i>	MT538484.1	100
A14	MC_167	84	<i>Bacillus siamensis</i>	KY646078.1	99.71
A15	MC_243	84	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	CP039846.1	99.95
A16	MC_84	84	<i>Bacillus subtilis</i>	ON891846.1	100
A17	MC_74	84	<i>Bacillus acidicola</i>	KF030788.1	99.91
A12	MC_93	84	<i>Serratia proteamaculans</i>	KC514128.1	99.93
A13	MC_52	84	<i>Bacillus subtilis</i>	MW012643.1	98.23
A7	MC_43	84	<i>Bacillus altitudinis</i>	MT605426.1	100
J1	MC_261	96	<i>Heyndrickxia sporothermodurans</i>	MH127750.1	99.3
J2	MC_66	96	<i>Bacillus subtilis</i>	ON882057.1	100
J3	MC_75	96	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	CP039846.1	99.92
J4	MC_242	96	<i>Bacillus licheniformis</i>	ON847335.1	100
J5	MC_107	96	<i>Pediococcus acidilactici</i>	MT538479.1	99.72
J6	MC_145	96	<i>Bacillus cereus</i>	KJ534410.1	99.92
J7	MC_266	96	<i>Proteus penneri</i>	KC456586.1	99.85
J8	MC_232	96	<i>Acetobacter indonesiansis</i>	MN187257.1	99.8
J10	MC_149	96	<i>Serratia proteamaculans</i>	KC514128.1	99.78
J11	MC_278	96	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CP072691.1	100
J12	MC_104	96	<i>Bacillus proteolyticus</i>	ON832057.1	100
J13	MC_267	96	<i>Rummeliibacillus stabekisii</i>	MT585557.1	98.34
J9	MC_86	96	<i>Bacillus subtilis</i>	ON882057.1	100
E1	MC_147	108	<i>Serratia sp.</i>	MT472080.1	98.08
E2	MC_144	108	<i>Paenibacillus lautus</i>	CP032412.1	100
E3	MC_115	108	<i>Lactiplantibacillus argentoratensis</i>	ON387459.1	99.93
E4	MC_254	108	<i>Bacillus licheniformis</i>	ON847335.1	100
E5	MC_247	108	<i>Bacillus subtilis</i>	ON882057.1	100

E6	MC_269	108	<i>Providencia vermicola</i>	MT032359.1	99.66
E7	MC_51	108	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	MH385002.1	100
E9	MC_118	108	<i>Bacillus cereus</i>	ON892078.1	100
E11	MC_230	108	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CP072691.1	100
E12	MC_124	108	<i>Bacillus cereus</i>	ON892078.1	100
E13	MC_42	108	<i>Bacillus velezensis</i>	ON885268.1	100
E8	MC_64	108	<i>Acetobacter indonesiansis</i>	MN187257.1	99.8
E14	MC_58	108	<i>Bacillus subtilis</i>	KU308550.1	100
E15	MC_83	108	<i>Rummeliibacillus pycnus</i>	KT382255.1	99.7
E16	MC_268	108	<i>Bacillus subtilis</i>	LC460864.1	100
E10	MC_158	108	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	MN922884.1	98.83
K1	MC_131	120	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ON860685.1	100
K2	MC_233	120	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	OK618376.1	99.8
K3	MC_217	120	<i>Bacillus subtilis</i>	KR780584.1	99.93
K4	MC_125	120	<i>Serratia liquefaciens</i>	CP048784.1	99.93
K5	MC_240	120	<i>Bacillus cereus</i>	ON892078.1	100
K6	MC_129	120	<i>Serratia liquefaciens</i>	MH668086.1	100
K7	MC_216	120	<i>Bacillus licheniformis</i>	MT261838.1	99.78
K8	MC_123	120	<i>Serratia</i> sp.	MH915633.1	99.32
K9	MC_252	120	<i>Bacillus subtilis</i>	ON882057.1	100
K10	MC_265	120	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CP072691.1	100
K12	MC_128	120	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	MT635319.1	100
K13	MC_137	120	<i>Bacillus velezensis</i>	MT078641	99.85
K14	MC_150	120	<i>Bacillus subtilis</i>	ON999053.1	100
K15	MC_141	120	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	OK618376.1	100
K16	MC_165	120	<i>Bacillus subtilis</i>	ON999053.1	100
K17	MC_91	120	<i>Lactobacillus farraginis</i>	AB690214.1	99.93
K18	MC_50	120	<i>Acetobacter indonesiansis</i>	MN187257.1	99.8
K19	MC_99	120	<i>Cronobacter dublinensis</i>	MN646995.1	98.1
L1	MC_44	132	<i>Bacillus tequilensis</i>	MT538484.1	100
L2	MC_100	132	<i>Bacillus aerophilus</i>	KX809598.1	100
L3	MC_82	132	<i>Lactobacillus farraginis</i>	MK648445.1	100
L4	MC_111	132	<i>Lysinibacillus</i> sp.	MN186598.1	99.78
L5	MC_229	132	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	KM242578.1	100
L6	MC_220	132	<i>Bacillus</i> sp.	EU571193.1	99.47
L7	MC_142	132	<i>Acetobacter indonesiansis</i>	MN187257.1	100
L8	MC_231	132	<i>Bacillus cereus</i>	ON892078.1	100
L9	MC_127	132	<i>Bacillus subtilis</i>	ON999053.1	100
L10	MC_130	132	<i>Bacillus clausii</i>	MH938303.1	98.31
L11	MC_163	132	<i>Bacillus</i> sp.	MW971770	99.85
M1	MC_251	144	<i>Serratia liquefaciens</i>	MH668086.1	100
M8	MC_121	144	<i>Acetobacter indonesiansis</i>	MN187257.1	100
M2	MC_272	144	<i>Bacillus cereus</i>	MT373533.1	99.92

M3	MC_218	144	<i>Bacillus velezensis</i>	MT078641.1	99.93
M4	MC_273	144	<i>Bacillus aerophilus</i>	KT720207.1	99.68
M5	MC_110	144	<i>Bacillus subtilis</i>	KT818798.1	100
M6	MC_122	144	<i>Serratia liquefaciens</i>	CP048784.1	99.61
M7	MC_263	144	<i>Paenibacillus sp</i>	MG365640.2	100

Anexo 3. Análisis de correlación de Pearson de los parámetros fisicoquímicos y el número de especies por hora de colecta.

Matriz de correlación/Coeficientes

	<u>Hora de colecta</u>	<u>N° de especies</u>	<u>Ph del Fermento</u>	<u>T° del Fermento</u>	<u>Humedad fermento</u>
Hora de colecta	1.00				
N° de especies	-0.67	1.00			
Ph Del Fermento	-0.96	0.59	1.00		
T° Del Fermento	0.98	-0.63	-0.98	1.00	
Humedad fermento	-0.99	0.68	0.97	-0.98	1.00

Matriz de correlación/Probabilidades

	<u>Hora de colecta</u>	<u>N° de especies</u>	<u>Ph del Fermento</u>	<u>T° del Fermento</u>	<u>Humedad fermento</u>
Hora de colecta					
N° de especies	0.0127				
Ph Del Fermento	<0.0001	0.0355			
T° Del Fermento	<0.0001	0.0204	<0.0001		
Humedad del fermento	<0.0001	0.0105	<0.0001	<0.0001	

Autovalores

<u>Lambda</u>	<u>Valor</u>	<u>Proporción</u>	<u>Prop Acum</u>
1	4.42	0.88	0.88
2	0.53	0.11	0.99
3	0.03	0.01	1.00
4	0.01	2.9E-03	1.00
5	0.01	2.0E-03	1.00

Autovectores

<u>Variables</u>	<u>e1</u>	<u>e2</u>
Hora de colecta	-0.47	0.12
N° de especies	0.35	0.93
Ph Del Fermento	0.46	-0.28
T° Del Fermento	-0.47	0.20
<u>Humedad del fermento</u>	<u>0.47</u>	<u>-0.11</u>

Correlaciones con las variables originales

<u>Variables</u>	<u> CP 1</u>	<u>CP 2</u>
Hora de colecta	-0.99	0.09
N° de especies	0.74	0.67
Ph Del Fermento	0.97	-0.20
T° Del Fermento	-0.98	0.14
<u>Humedad del fermento</u>	<u>0.99</u>	<u>-0.08</u>

Correlación cofenética= 1.000

Anexo 4. Resultados de las pruebas bioquímicas de los microorganismos aislados.

Especie	Repetición	Relación Diámetro Halo /Diámetro Colonia	Relación Área Halo/Área Colonia	8% (UFC/uL)	15% (UFC/uL)	Carbohidratos (UFC/uL)
<i>Acetobacter cerevisiae</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	3.06
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	2.05
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	3.00
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	4.03
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	3.66
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	5.05
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	1.83
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	1.74
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	1.33

<i>Aspergillus</i> sp.	1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.12
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19
<i>Aspergillus venenatus</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	5.12
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	4.85
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	4.35
<i>Acetobacter indonesiansis</i>	1	1.32	2.31	4.12	0.89	13.49
	2	1.24	2.08	5.41	0.72	11.81
	3	1.26	2.30	6.12	0.56	12.50
<i>Acetobacter orientalis</i>	1	1.34	2.36	29.48	12.50	6.24
	2	1.29	2.23	25.12	11.10	8.23
	3	1.28	2.16	27.18	11.80	6.48
<i>Bacillus acidicola</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	10.25
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	11.75
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	9.85
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1.17	1.92	18.48	1.01	7.38
	2	1.41	4.05	20.00	1.50	8.00
	3	1.06	1.57	18.74	2.50	9.40
<i>Bacillus stercoris</i>	1	1.51	2.84	6.38	0.00	5.61
	2	0.00	0.00	6.04	0.00	8.52
	3	1.86	0.00	6.09	0.00	6.05
<i>Bacillus tequilensis</i>	1	1.56	2.96	7.63	0.00	2.44
	2	0.00	0.00	6.52	0.09	2.02
	3	0.00	0.00	6.12	0.00	1.91
<i>Bacillus</i> sp.	1	1.23	2.25	7.43	0.92	5.24
	2	1.19	1.73	6.25	0.72	9.09
	3	0.00	0.00	5.25	0.89	12.70
<i>Bacillus velezensis</i>	1	1.34	2.45	12.72	0.00	17.46
	2	1.59	2.69	10.18	0.00	15.23
	3	0.00	0.00	12.76	0.20	16.98
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1.26	2.14	12.67	4.17	5.93
	2	0.00	0.00	15.73	11.43	4.98
	3	0.00	0.00	16.52	10.14	6.52
<i>Bacillus inaquosorum</i>	1	1.14	1.60	2.87	2.37	2.99
	2	1.18	1.51	1.73	0.62	1.61
	3	1.31	2.14	1.41	0.78	1.72
<i>Bacillus aerophilus</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	2.64
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	2.89
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	2.11
<i>Bacillus altitudinis</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	20.10
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	19.50
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	18.12
	1	0.00	0.00	0.00	0.00	1.66

<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2	0.00	0.00	0.00	0.00	1.84
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	2.26
<i>Bacillus cereus</i>	1	0.00	0.00	0.29	0.10	5.10
	2	0.00	0.00	0.33	0.06	4.84
	3	0.00	0.00	0.29	0.05	5.11
<i>Bacillus clausii</i>	1	0.00	0.00	0.10	0.09	1.56
	2	0.00	0.00	0.11	0.07	1.76
	3	0.00	0.00	0.21	0.10	1.99
<i>Bacillus haynesii</i>	1	0.00	0.00	0.32	0.00	5.01
	2	0.00	0.00	0.31	0.00	4.95
	3	0.00	0.00	0.21	0.00	5.12
<i>Bacillus pacificus</i>	1	0.00	0.00	0.03	0.00	0.80
	2	0.00	0.00	0.05	0.00	0.95
	3	0.00	0.00	0.12	0.00	1.21
<i>Bacillus paralicheniformis</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	9.32
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	8.52
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	9.12
<i>Bacillus siamensis</i>	1	0.00	0.00	0.12	0.00	2.65
	2	0.00	0.00	0.16	0.00	2.05
	3	0.00	0.00	0.19	0.00	3.26
<i>Bacillus proteolyticus</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	1.92
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	1.85
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	2.10
<i>Bacillus vallismortis</i>	1	0.00	0.00	0.31	0.00	4.75
	2	0.00	0.00	0.38	0.00	4.25
	3	0.00	0.00	0.28	0.00	3.89
<i>Bacillus toyonensis</i>	1	0.00	0.00	0.23	0.00	5.86
	2	0.00	0.00	0.46	0.00	5.81
	3	0.00	0.00	0.57	0.00	5.65
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1	0.00	0.00	0.16	0.00	3.68
	2	0.00	0.00	0.19	0.00	4.32
	3	0.00	0.00	0.15	0.00	4.12
<i>Bacillus xiamenensis</i>	1	0.00	0.00	0.52	0.00	8.28
	2	0.00	0.00	0.42	0.00	7.98
	3	0.00	0.00	0.51	0.00	7.95
<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	1	0.00	0.00	0.28	0.00	4.41
	2	0.00	0.00	0.25	0.00	4.52
	3	0.00	0.00	0.29	0.00	5.01
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1	1.50	2.60	0.30	0.09	23.67
	2	0.00	0.00	0.85	0.15	19.58
	3	0.00	0.00	0.55	0.08	21.54
<i>Clostridium diolis</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	5.26
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	5.12

	3	0.00	0.00	0.00	0.00	4.98
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	1	1.39	2.40	2.22	0.10	5.90
	2	1.26	1.73	2.12	0.06	2.60
	3	0.00	0.00	1.80	0.11	2.16
<i>Cronobacter</i> sp.	1	0.00	0.00	0.00	0.00	6.66
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	6.51
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	6.23
<i>Cytobacillus eiseniae</i>	1	0.00	0.00	0.31	0.00	5.37
	2	0.00	0.00	0.35	0.00	5.81
	3	0.00	0.00	0.38	0.00	6.21
<i>Diatractium cordianum</i>	1	1.20	1.65	1.15	0.06	5.37
	2	0.00	0.00	2.75	0.03	5.81
	3	0.00	0.00	2.56	0.02	6.21
<i>Penicillium citrinum</i>	1	1.43	1.36	0.89	0.52	1.28
	2	1.27	1.70	1.20	0.63	2.10
	3	1.09	1.23	1.65	0.81	1.85
<i>Gluconobacter cadivus</i>	1	1.27	2.16	9.68	6.52	4.60
	2	0.00	0.00	9.12	5.20	4.01
	3	0.00	0.00	9.58	6.20	6.24
<i>Gluconobacter frateurii</i>	1	1.13	1.76	18.69	0.00	1.90
	2	1.25	1.90	22.97	0.00	2.65
	3	1.17	1.81	17.80	0.29	1.09
<i>Gluconobacter oxydans</i>	1	0.00	0.00	0.27	0.03	4.52
	2	0.00	0.00	0.21	0.05	4.01
	3	0.00	0.00	0.19	0.10	4.95
<i>Hanseniaspora meyeri</i>	1	0.00	0.00	0.69	0.09	1.65
	2	0.00	0.00	0.61	0.08	1.52
	3	0.00	0.00	0.58	0.10	1.45
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	10.39
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	9.85
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	9.91
<i>Heyndrickxia sporothermodurans</i>	1	0.00	0.00	0.21	0.00	3.85
	2	0.00	0.00	0.24	0.00	3.98
	3	0.00	0.00	0.32	0.00	3.87
<i>Kodamaea ohmeri</i>	1	1.31	1.88	56.20	34.38	6.42
	2	1.26	1.93	61.09	35.20	3.28
	3	1.27	1.85	50.89	33.12	3.01
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0.00	0.00	0.66	0.04	3.27
	2	0.00	0.00	0.75	0.12	3.02
	3	0.00	0.00	0.64	0.20	3.54
<i>Lactobacillus nagelii</i>	1	1.44	2.47	24.01	32.91	14.41
	2	1.24	2.54	29.44	23.67	13.49
	3	1.40	2.35	24.33	21.35	13.69

<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	1.17	2.09	44.75	28.79	18.90
	2	1.73	3.63	40.12	24.12	19.46
	3	1.33	2.81	38.52	22.01	16.34
<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	1	1.14	2.30	16.39	6.45	1.49
	2	0.00	0.00	11.89	4.24	1.58
	3	0.00	0.00	10.25	5.16	1.23
<i>Lactobacillus farraginis</i>	1	1.28	1.64	2.56	0.40	7.61
	2	0.50	1.23	1.00	0.10	7.36
	3	0.10	1.05	1.10	0.23	7.95
<i>Lysinibacillus sp.</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	15.63
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	15.95
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	15.21
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	1	0.00	0.00	0.97	0.00	0.00
	2	0.00	0.00	1.07	0.00	0.00
	3	0.00	0.00	0.98	0.00	0.00
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	3.21
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	2.52
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	3.38
<i>Lactiplantibacillus argenteratensis</i>	1	0.00	0.00	0.14	0.00	0.00
	2	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00
	3	0.00	0.00	0.18	0.00	0.00
<i>Lysinibacillus macroides</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	2.55
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	2.99
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	2.15
<i>Lysinibacillus mangiferihumi</i>	1	0.00	0.00	0.22	0.00	0.00
	2	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00
	3	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00
<i>Meyerozyma smithsonii</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	4.44
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	6.08
<i>Niallia circulans</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	7.62
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Pichia kluyveri</i>	1	0.00	0.00	0.21	0.00	11.65
	2	0.00	0.00	0.11	0.00	10.98
	3	0.00	0.00	0.23	0.00	11.02
<i>Pichia fermentans</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	6.58
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	6.85
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	7.12
<i>Paenibacillus vulneris</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	4.98
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	4.85
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	5.20
<i>Pseudomonas poae</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Pediococcus acidilactici</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	19.18
	2	0.00	0.00	0.33	0.00	18.12
	3	0.00	0.00	0.25	0.00	17.85
<i>Proteus penneri</i>	1	0.00	0.00	0.36	0.08	0.00
	2	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00
	3	0.00	0.00	0.00	0.81	0.00
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	0.00	0.00	0.12	0.00	0.00
	2	0.00	0.00	0.18	0.00	0.00
	3	0.00	0.00	0.25	0.00	0.00
<i>Providencia vermicola</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	1.65
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	1.52
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	1.63
<i>Paenibacillus</i> sp	1	0.00	0.00	0.00	0.00	4.62
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	4.58
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	4.32
<i>Penicillium</i> sp.	1	1.29	1.58	0.10	0.05	5.21
	2	0.00	0.00	0.15	0.08	5.98
	3	0.00	0.00	0.32	0.10	6.12
<i>Penicillium citrinum</i>	1	1.28	1.96	0.21	0.10	1.06
	2	1.08	1.52	0.18	0.09	1.25
	3	0.00	0.00	0.21	0.11	1.13
<i>Rummeliibacillus pycnus</i>	1	0.00	0.00	0.23	0.00	3.56
	2	0.00	0.00	0.32	0.00	3.52
	3	0.00	0.00	0.20	0.00	3.57
<i>Rummeliibacillus stabekisii</i>	1	0.00	0.00	0.26	0.00	4.21
	2	0.00	0.00	0.27	0.00	4.12
	3	0.00	0.00	0.35	0.00	4.17
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	0.00	0.00	1.07	0.21	16.53
	2	0.00	0.00	1.10	0.18	16.40
	3	0.00	0.00	1.23	0.21	16.03
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	1.54	2.93	43.07	33.52	5.05
	2	1.19	1.83	39.61	28.46	4.52
	3	1.36	2.84	42.02	25.35	3.41
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	0.00	0.00	0.60	0.00	9.10
	2	0.00	0.00	0.02	0.00	7.85
	3	0.00	0.00	0.32	0.00	8.12
<i>Serratia proteamaculans</i>	1	1.47	2.99	2.60	0.12	12.24
	2	2.42	6.26	2.17	0.00	10.23
	3	1.57	2.88	2.10	0.00	11.25
<i>Streptomyces xylanilyticus</i>	1	0.00	0.00	0.14	0.00	0.00
	2	0.00	0.00	0.16	0.00	0.00

	3	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00
<i>Serratia</i> sp.	1	0.00	0.00	0.00	0.00	3.12
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	1.79
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35
<i>Starmerella etchellsii</i>	1	1.22	2.44	0.20	0.08	16.72
	2	1.39	2.66	0.36	0.09	15.23
	3	0.00	0.00	0.45	0.13	14.51
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	1	1.89	2.50	25.21	21.22	12.19
	2	1.95	2.30	28.12	24.21	15.66
	3	1.81	2.21	24.47	19.88	11.55
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	21.28
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	17.07
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	18.25
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	1	1.78	5.40	16.49	14.98	9.20
	2	1.65	5.10	15.23	12.25	11.27
	3	1.70	5.12	14.25	11.50	13.59
<i>Weissella cibaria</i>	1	0.00	0.00	0.00	0.00	1.43
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	1.15
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	1.22

Anexo 5. Análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples de LSD de Fisher

Análisis de la varianza

Relación Diámetro Halo /Diámetro Colonia

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Relación Diámetro Halo /Di..	78	0.05	0.02	74.53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1.68	2	0.84	1.81	0.1705
Conglomerado	1.68	2	0.84	1.81	0.1705
Error	34.86	75	0.46		
Total	36.54	77			

Test: LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.38090

Error: 0.4648 gl: 75

<u>Conglomerado</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
3	0.73	30	0.12	A
1	1.00	27	0.13	A
2	1.07	21	0.15	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Relación Área Halo/Área Colonia

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
<u>Relación Área Halo/Área Co..</u>	78	0.07	0.04	84.21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	9.15	2	4.57	2.67	0.0757
Conglomerado	9.15	2	4.57	2.67	0.0757
Error	128.42	75	1.71		
Total	137.57	77			

Test: LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.73110

Error: 1.7123 gl: 75

<u>Conglomerado</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
3	1.12	30	0.24	A
1	1.78	27	0.25	A B
2	1.87	21	0.29	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

8% (UFC/uL)

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
8% (UFC/uL)	78	0.66	0.65	63.35

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	10976.48	2	5488.24	72.10	<0.0001
Conglomerado	10976.48	2	5488.24	72.10	<0.0001
Error	5709.03	75	76.12		
Total	16685.52	77			

Test: LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=4.87459

Error: 76.1204 gl: 75

<u>Conglomerado</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
3	6.36	30	1.59
1	6.81	27	1.68
2	33.31	21	1.90

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

15% (UFC/uL)

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
15% (UFC/uL)	78	0.81	0.80	66.79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	7168.63	2	3584.31	155.93	<0.0001
Conglomerado	7168.63	2	3584.31	155.93	<0.0001
Error	1724.05	75	22.99		
Total	8892.68	77			

Test: LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=2.67875

Error: 22.9874 gl: 75

Conglomerado	Medias	n	E.E.
1	1.06	27	0.92 A
3	1.63	30	0.88 A
2	22.97	21	1.05 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Carbohidratos (UFC/uL)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Carbohidratos (UFC/uL)	78	0.42	0.40	52.37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1031.37	2	515.68	27.14	<0.0001
Conglomerado	1031.37	2	515.68	27.14	<0.0001
Error	1425.26	75	19.00		
Total	2456.63	77			

Test: LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=2.43559

Error: 19.0035 gl: 75

Conglomerado	Medias	n	E.E.
3	3.79	30	0.80 A
2	10.30	21	0.95 B
1	11.83	27	0.84 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 6. Tablas de contingencia de la variable categórica (Gas)

Frecuencias absolutas

En columnas: GAS

<u>Conglomerado</u>	<u>NO</u>	<u>SI</u>	<u>Total</u>
1	0	27	27
2	0	21	21
3	29	1	30
<u>Total</u>	<u>29</u>	<u>49</u>	<u>78</u>

<u>Estadístico</u>	<u>Valor</u>	<u>gl</u>	<u>p</u>
Chi Cuadrado Pearson	73.86	2	<0.0001
Chi Cuadrado MV-G2	94.18	2	<0.0001
Coef.Conting.Cramer	0.69		
<u>Coef.Conting.Pearson</u>	<u>0.70</u>		