

Microorganismos asociados al aguamiel en el agave pulquero en Hidalgo, México Microorganisms associated with aguamiel in the agave pulque in Hidalgo, Mexico

N. L. Silva- López ^a, S. Martínez-Hernández ^a, C. J. Figueredo-Urbina ^{*,b}

^a Área Académica de Biología, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 42184, Pachuca, Hidalgo, México.

^b Investigadora por México CONAHCYT, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 43600, Tulancingo, Hidalgo, México.

Resumen

El agave ha sido un elemento importante en la cultura mesoamericana desde tiempos prehispánicos hasta la actualidad; una de sus bondades más apreciadas es la savia que produce en su madurez, fresca conocida como aguamiel o fermentada como pulque. Un factor con mayor influencia de sus características organolépticas, son los microorganismos que contiene. En este trabajo se propone ampliar el conocimiento de la influencia de los microorganismos y comprender sus efectos en las cualidades del aguamiel por medio de un análisis etnobiológico, morfológico, bioquímico y molecular MALDI-TOF de muestras con variables de clasificación tradicional, tomadas en dos épocas distintas del año. Se encontró que las muestras de primavera son microbiológicamente más diversas que las analizadas en invierno, en el primer caso los géneros más representativos fueron *Hafnia* y *Pseudomonas*, presentando mayor homogeneidad, mientras que en el segundo fueron *Pseudomonas*, *Clavispora* y *Lysinibacillus*. Estos datos permiten establecer la base para posteriores estudios en una rama emergente de la biología como sería la relación entre el manejo y la diversidad de microorganismos.

Palabras Clave: agave, aguamiel, diversidad, microorganismos & MALDI-TOF.

Abstract

The agave has been an important element in Mesoamerican culture from pre-Hispanic times to the present day and one of its most appreciated benefits is the sap it produces when ripe, fresh known as mead or fermented as pulque. A factor with the greatest influence on its organoleptic characteristics is the microorganisms it contains. This paper proposes to broaden the knowledge of the influence of microorganisms and understand their effects on the qualities of mead through an ethnobiological, morphological, biochemical, and molecular MALDI-TOF analysis of samples with variables in the traditional classification taken at two times of year. It was found that the spring samples are microbiologically more diverse than those analysed in winter, in the first case the most representative genera were *Hafnia* and *Pseudomonas* presenting more homogeneity while in the second they were *Pseudomonas*, *Clavispora* and *Lysinibacillus*. These data allows establishing the basis for future studies leading to the understanding of relation between cultural management and microbiological diversity.

Keywords: agave, sap, diversity, microorganisms & MALDI-TOF.

1. Introducción

El agave o maguey tuvo gran importancia entre las sociedades que se desarrollaron en Mesoamérica durante milenios. Estas plantas son conocidas como el “árbol de las maravillas” a causa de los múltiples usos que se le ha dado. Los registros arqueológicos han evidenciado el aprovechamiento de los magueyes por cerca de 10,000 años; uno de los principales usos fue el alimenticio, pues las hojas,

la piña o corno central, el escapo floral, las flores y la savia, fueron los recursos mayormente consumidos (Montufar y Anzuarez, 2014) prevaleciendo su aprovechamiento en diferentes sitios en México hasta la actualidad. Los magueyes pertenecen a la familia de las asparagáceas, y uno de los géneros con el mayor número de especies es *Agave*. La distribución natural del género *Agave* abarca desde el sur de Estados Unidos de América, llegando hasta Colombia, Venezuela e Islas del Caribe. Este género es endémico del

*Autor para la correspondencia: figueredocj@gmail.com.

Correo electrónico: Nahomi Lee Silva- López (si420754@uaeh.edu.mx), Sylvia Martínez-Hernández (sylvia_martinez10436@uaeh.edu.mx), Carmen Julia Figueredo-Urbina (figueredocj@gmail.com).

Historial del manuscrito: recibido el 06/12/2023, última versión-revisada recibida el 16/04/2024, aceptado el 08/05/2024, en línea (postprint) desde el 09/05/2024, publicado el DD/MM/AAAA. **DOI:** <https://doi.org/10.29057/icbi.v12i24.12206>



continente americano, donde aproximadamente el 75% de las especies se encuentran en México, posicionándose como el centro de mayor riqueza y diversidad biológica de agaves (García, 2007). En México se encuentran cerca de 200 especies, donde casi para la mitad se ha registrado que se le ha dado algún uso (Colunga *et al.*, 2017). La producción de bebidas a partir de esta planta ha sido de importancia cultural y biológica, dentro de las cuales encontramos las bebidas frescas como el aguamiel, fermentadas como el pulque y también las destiladas mezcal y tequila. Tan solo para la producción de aguamiel y pulque se han reconocido cerca de 40 especies, las cuales tienen un papel cultural importante en múltiples grupos originarios en el país.

El estado de Hidalgo es la principal entidad en la lista de producción de agave pulquero a nivel nacional (Taddei *et al.*, 2017), en la actualidad el aprovechamiento del agave está distribuido en 41 de los 84 municipios del estado y cuenta con 376,164.48 hectáreas dedicadas a la siembra de magueyes, de los que se obtuvieron 6,320,430.81 litros de pulque en el año 2022 (SIAP, 2022). Asimismo, se ha registrado elevada agrobiodiversidad de magueyes pulqueros, pues en diversas localidades del estado, el número de variedades tradicionales que se manejan y mantienen en los sistemas productivos son de los más altos registrados en la república mexicana (Figueredo *et al.*, 2021).

La agrobiodiversidad de agaves que hoy en día encontramos, en parte es producto de la interacción entre los humanos y el maguey, el cual se basa en el aprovechamiento de sus recursos, provocando que algunas especies de agaves hayan estado bajo un manejo por medio de prácticas de selección, donde las características elegidas varían dependiendo de su propósito. Los cambios presentados en los individuos suelen ser graduales y continuos como resultado del proceso de domesticación (Colunga *et al.*, 2017). Se ha propuesto que este proceso estrechamente relacionado con la selección artificial ha sido dirigido a la obtención de savia en mayor cantidad y calidad (Mora *et al.*, 2011), aunque también está relacionado a otros cambios fenotípicos y genotípicos, estos rasgos permiten a los productores diferenciar los tipos de agaves entre sí.

El aprovechamiento de la savia fresca está dirigido a la producción de bebidas como el aguamiel, llamado así por la cantidad de azúcares que contiene, puede ser extraído de diferentes especies de agave, principalmente de *Agave americana*, *Agave salmiana* y *Agave mapisaga*; que una vez fermentado se conoce como pulque (Fournier y Mondragón, 2012). El proceso de preparación del pulque inicia con la extracción de la savia del cajete u oquedad del tallo o corno central del agave que previamente se preparó, cortando parte del meyolote, cogollo, parte inferior del tallo floral o quiote (Bravo, 2014), y raspando su cavidad para que brote el líquido. Una vez extraída la savia se traspasa a un recipiente en el que se llevará a cabo la fermentación hasta obtener las características sensoriales y grados de alcohol que lo distinguen. Parte de este proceso de fermentación tiene inicio en el cajete del agave, ocurriendo espontáneamente debido a que la savia o aguamiel constituye un medio favorable para la proliferación de microorganismos, mismos que están presentes en el cajete de la planta, inoculados a través de las

herramientas del arte pulquero y también vectores como el viento e insectos como por ejemplo *Drosophila* spp. (Lappe *et al.*, 2008). No obstante, la parte más significativa de la fermentación inicia posterior a la adición de la semilla, que corresponde a una porción de pulque producido anteriormente el cual contiene colonias de microorganismos, que es usado como inóculo de la fermentación (Cervantes y Pedroza, 2007).

Los agaves se desarrollan en un microbioma complejo en donde suelen involucrarse algunas interacciones benéficas entre la planta con los microorganismos con los que coexisten (Caballero, 2006), dichas relaciones pueden desarrollarse desde las bacterias y otros organismos que habitan en el suelo hasta las bacterias que residen dentro de la planta, las cuales se denominan endófitas y suelen desarrollarse dentro de sus tejidos, donde establecen una relación simbiótica, otorgándole beneficios a la planta como el potencial para fijar nitrógeno, reducir niveles de etileno, la producción de compuestos antimicrobianos y promotores de crecimiento. Se ha comprobado que existen diferencias en esta clase de comunidades procariotas en diferentes especies de agaves, las primeras siendo determinadas por el mismo hospedero y las segundas por condiciones biogeográficas e incluso se han demostrado diferencias entre las comunidades que proliferan en distintas variedades de agave pulquero donde los géneros *Bacillus*, *Enterobacter* y *Leclercia* fueron los de mayor representación en las cinco variedades analizadas (Aguado *et al.*, 2022).

Sin embargo, las comunidades fermentadoras presentes en el aguamiel son principalmente bacterias mesófilas y levaduras, las cuales producen tres metabolitos distintivos en el pulque. Las bacterias ácido-lácticas (BAL) y ácido acéticas son las responsables de la acidez. Cepas de los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* (levaduras) y *Zymomonas mobilis* (bacterias), metabolizan los azúcares en etanol. Mientras que bacterias del género *Leuconostoc* producen polisacáridos extracelulares que determinan la viscosidad del pulque (Escalante *et al.*, 2008; Lappe *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 1957). Estas cepas han sido aisladas en aguamiel y pulques del altiplano central de México (Enríquez *et al.*, 2017; Escalante *et al.*, 2008) encontrándose diferencias en el recuento de bacterias y levaduras, variaciones relacionadas con la especie de agave, estación del año y etapa en la que se encuentre el agave (Cervantes y Pedroza, 2007; Villareal *et al.*, 2019). También se han encontrado bacterias coliformes y mohos, con análisis negativos para *Salmonella* sp. y *E. coli* en muestras de aguamiel (Espindola *et al.*, 2018).

La domesticación es un proceso que ha ocurrido también en bacterias y levaduras en diferentes grados. En el caso del pulque ha sido a través de la inoculación, en donde se toma parte del producto que tuvo los atributos sensoriales deseados con el propósito de introducir a los organismos que originaron esas características a las futuras producciones. El uso continuo de las comunidades microbianas seleccionadas para la fermentación conlleva a un mejoramiento de la estabilidad, calidad, sabor y textura del pulque (Gibbons y Rinker, 2015); la fermentación es un proceso que además de permitir la transformación de los alimentos a través de microorganismos autóctonos e introducidos, también fomenta

la heterogeneización de sus propiedades y su diversidad microbiana (Flachs y Orkin, 2019) en este caso interviniendo en las cualidades del aguamiel y por lo tanto del pulque.

Se ha documentado que existe variabilidad en la diversidad de microorganismos de la savia del agave y sus derivados por factores como la especie de agave, estadio de fermentación, geografía; encontrando mayor diversidad en verano, lo que sugiere que la microbiota del aguamiel tiene cambios entre las estaciones del año y la fuente de donde provenga, estas variaciones se deben al incremento en la radiación solar que provocan cambios en el metabolismo del maguey por lo que produce savia (aguamiel) con un pH más bajo, favoreciendo a microorganismos tolerantes a condiciones ácidas. No obstante, independientemente de la estación del año la diversidad bacteriana es mayor en el pulque y la semilla, siendo el aguamiel la fase en la que se cuenta con un mayor número de levaduras y menor diversidad de bacterias en comparación con las demás fases (Enríquez *et al.*, 2017; Rocha *et al.*, 2020; Villarreal *et al.*, 2019).

Así mismo se ha comprobado que las propiedades químicas del aguamiel y sus derivados están relacionadas con el metabolismo de las bacterias y levaduras que habitan en él, debido principalmente a la producción de ciertos metabolitos secundarios (Herrera *et al.*, 2008), los cuales tendrán efecto sobre las características organolépticas de la savia extraída del maguey. Los productores de pulque indican que la savia producida por diferentes variedades tradicionales de agave presenta diferencias organolépticas entre sí, en la literatura no hay estudios que documenten la diversidad microbiológica que propicia cada variedad tradicional de maguey; y si esta pudiera tener relación directa con las diferencias percibidas en el perfil sensorial del pulque que produce cada variedad. En este sentido, los objetivos de este trabajo fue documentar las artes pulqueras en la localidad y evaluar la diversidad microbiológica presente en el aguamiel de variedades tradicionales de agave pulquero en dos épocas distintas del año, mediante la identificación morfológica, bioquímica y molecular, con el propósito de determinar su papel en la aportación de distintas cualidades organolépticas al aguamiel.

Debido a la importancia biocultural del agave y a su alta diversificación y aprovechamiento en Hidalgo, es importante realizar estudios en la multiplicidad de los promotores en la fermentación del aguamiel, siendo los responsables de otorgarle sus características agradables. Hasta el momento no hay reportes en la literatura que ofrezcan una descripción y caracterización de las comunidades microbianas enfocadas en el aguamiel de distintas variedades tradicionales de maguey, es por ello que este trabajo permitirá ampliar el conocimiento de la influencia de los microorganismos en la producción de pulque y comprender los efectos que produce el manejo a través de la selección artificial, los cuales se ven reflejados en la heterogeneidad organoléptica del aguamiel y el pulque. Permitiendo que se establezca como la base para posteriores estudios de una rama emergente de la biología como la etnozimología, además de ofrecer información que clarifique un fenómeno percatado por los productores de pulque y que presenta cierto interés para los mismos.

2. Metodología

2.1. Área de estudio

Las muestras se colectaron del Rancho La Gaspapeña (19°58'08"N 98°30'18"O), situado en el municipio de Singuilucan, Hidalgo (Figura 1).

2.2. Evaluación etnobotánica

Se realizaron cuatro recorridos temáticos para identificar las labores en relación con la colecta del aguamiel en el Rancho La Gaspapeña, para ello se contó con el apoyo del tlachiquero y el productor. Durante los recorridos se colectó información acerca de los instrumentos utilizados y la secuencia de actividades que se llevan a cabo. Además, se realizaron entrevistas abiertas a ambos para conocer acerca de la historia de vida de los entrevistados, los tipos de agaves empleados para extraer el aguamiel, las características del aguamiel y la producción de pulque en el rancho. Esta herramienta metodológica permite generar información a partir de un cuestionario organizado en preguntas y temas, pero con la flexibilidad de que los entrevistados pueden exponer y orientar libremente sus respuestas, así como tratar temas emergentes (Bernard, 2017).

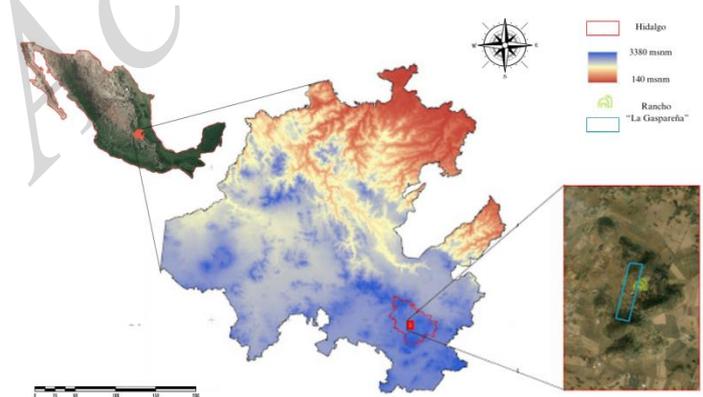


Figura 1: Ubicación geográfica del área de estudio, Rancho La Gaspapeña en Singuilucan, Hidalgo. Área delimitada correspondiente al cultivo de distintas variedades de agave pulquero.

2.3. Colecta de las muestras

De las variedades de agave Manso y Chalquecho (*Agave salmiana* subsp. *salmiana*), se seleccionaron tres individuos. Conforme a las especificaciones marcadas en la NMX-V-022-1972 (DOF, 1972), con ajuste del volumen, de cada individuo se colectaron 50 mL de aguamiel, las muestras se tomaron directamente del cajete con una pipeta o jeringa y se almacenaron en frascos de 250 mL estériles. Se mantuvieron a 4°C, evitando su fermentación, durante su traslado al laboratorio de Genética de la UAEH para ser procesadas en las primeras 24 h (Cervantes y Pedroza, 2007; Espindola *et al.*, 2018). Se realizaron dos muestreos, el primero en febrero (que coincide con el periodo invernal) y el segundo en abril (que corresponde a la primavera), ambos en el 2023. Sin embargo; estos muestreos no son equitativos en cantidad y en la variedad tradicional seleccionada, puesto que dependían de la disponibilidad de agaves maduros presentes para la

producción, provocando que en el caso de la variedad Chalqueño solo fuera posible realizar la colecta de muestras en un solo momento de su producción.

2.4. Aislamiento de cepas bacterianas y caracterización morfológica

Para el crecimiento bacteriano se usaron los medios agar Soja Trypticaseína (MCD LAB), como cultivo general y el conteo de bacterias y, para favorecer el crecimiento de BAL agar Jugo de Tomate (preparado en laboratorio) (León *et al.*, 2012; Odds, 1991). Para sembrar se realizaron diluciones decimales seriadas (10^{-1} a 10^{-3}) de las muestras colectadas. Posteriormente se sembraron 100 μ l de cada dilución por extensión en placa en los medios antes mencionados, realizando tres réplicas por cultivo, todo bajo condiciones asépticas, posteriormente se incubaron a 30°C durante 48 horas siguiendo los procedimientos de Cervantes y Pedroza (2007) y León *et al.* (2012). Pasado el periodo de incubación se realizó la caracterización morfológica colonial basados en la forma, textura, coloración y elevación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) siguiendo el procedimiento llevado a cabo por Enríquez *et al.* (2017). Las UFC que presentaron mayor variación morfológica fueron resembradas para obtener cultivos axénicos, mismos que fueron preservados en ultracongelación a -70° C con glicerol (cepario) y activados para los estudios de identificación.



Figura 2: Colecta de aguamiel para los análisis de laboratorio. A-B) Toma de muestra de aguamiel directa del cajete con pipeta o jeringa, C) Recolecta de aguamiel de forma tradicional usando un acocote, D) Muestras preparadas para el análisis microbiológico.

2.5. Pruebas bioquímicas

2.5.1 Prueba de catalasa.

Se basa en comprobar la presencia de la enzima catalasa, siendo la responsable de descomponer el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua; suele encontrarse en bacterias

aerobias y anaerobias facultativas que presenten citocromo oxidasa. Procedimiento: 1) Con ayuda de un asa bacteriológica se coloca en un portaobjetos limpio la muestra; 2) Se agrega una o dos gotas de peróxido de hidrógeno al 3% y; 3) Se leen los resultados, siendo positiva cuando aparece burbujeo instantáneo y negativa cuando no presenta burbujeo (Velasco y Tapia, 2014).

2.5.2 Prueba agar hierro triple azúcar (TSI)

Permite la identificación de bacterias a través de la determinación del azúcar que se utilice para fermentar, así como por la producción de gas y ácido sulfhídrico. La prueba se basa en la detección de productos de la fermentación, principalmente los ácidos, que serán detectados por el indicador rojo de fenol provocando diferencias en la coloración del medio. Procedimiento: 1) Preparar tubos con medio TSI y dejar solidificar inclinados. 2) Con asa bacteriológica recta se inocula la muestra en un tubo usando la técnica de punción y estría. 3) Incubar a 35 ± 2 °C durante 18-24 horas con las tapas semi abiertas. 4) Leer los resultados de acuerdo con la tabla 1. (Velasco y Tapia, 2014)

Tabla 1. Interpretación de resultados en la prueba TSI.

Fermenta tres azúcares	Fermenta glucosa	No fermenta	Producción de ácido sulfhídrico	Producción de gas
Todo el medio se torna amarillo	Superficie del medio rojo y fondo amarillo	Todo el medio se torna rojo	Precipitado de color negro	El medio se quiebra o se despega del fondo

2.6. Identificación por MALDI-TOF

En la identificación por espectrofotometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) se hace una caracterización de proteínas codificadas por el genoma, lo que resulta en el perfil proteómico bacteriano, que es único para cada especie, en otras palabras, se obtienen las huellas químicas de cada microorganismo (Bou *et al.*, 2011). Procedimiento: 1) Las cepas se activan en medio Infusión Cerebro Corazón (MCD LAB) y se incuban a 30° C durante 48 horas. 2) Posteriormente se siembran en Agar Nutritivo (MCD LAB) usando la técnica de agotamiento por estría, se incuban durante 18 a 24 horas a 30° C. 3) Con asa bacteriológica de punta redonda se transfiere una colonia fresca, de más de 5 mm de diámetro a un tubo de 2 mL, marca Eppendorf, con 300 μ l de agua de grado molecular (Mili-Q). 4) Se agita con vórtex hasta la disgregación completa de la colonia (se observa turbidez). 5) se agregan 900 μ l de etanol. 6) Para su procesamiento se trasladaron el mismo día al Laboratorio Divisional de Espectrometría de Masas, de la UAM Iztapalapa, CDMX, donde se analizaron en el equipo MALDI Biotyper® (Bruker, servidor 4.1.80 (PYTH) 102 2017-08-226_04-55-52). 7) Identificación con base en el valor de coincidencia y la categoría de consistencia.

3. Resultados

3.1. Las labores pulqueras en la colecta de aguamiel

La principal variedad tradicional que se cultiva en esta región es el *Manso* (Figura 3A). El productor se dedica activamente a labores del rancho desde hace 15 años aproximadamente, no obstante, el conocimiento tradicional que posee para labores relacionados con agaves lo obtuvo a través de la tradición oral de su abuelo y su papá. Por su parte el Tlachiquero lleva sólo una década trabajando en el rancho, pero es oriundo de la región y desde niño aprendió las labores pulqueras de su tío y de observar a otras personas trabajando en Singuilucan. El productor es quien se dedica al cultivo de las diferentes variedades tradicionales de agaves pulqueros, el cuidado de los agaves consiste en el abono orgánico y las podas necesarias hasta que alcanza el tamaño para iniciar las labores pulqueras. Se requiere de un “capador”, el cual es la persona encargada de capar el agave. El “capado” consiste en retirar parte del pedúnculo floral o quíote con una berreta corta y se deja reposar el agave uno o más meses y después entra en acción la labor del tlachiquero que realiza la “picada” (empezar a hacer la oquedad o cajete del maguey). Luego de una semana de la picada del agave, este ya está listo, y se inicia la extracción del aguamiel, en esta región del país se realiza dos veces al día, una a entre las 05:00 a 07:00 horas y otra entre las 16:00 a las 18:00 horas dependiendo de las condiciones del tiempo y la hora de amanecer o atardecer. Para realizar la extracción de la savia o el aguamiel se necesita un acocote (Figura 3B-C), este artefacto tradicionalmente se realizaba con el fruto alargado seco de un tipo de cucurbitácea de la especie *Lagenaria siceraria*, no obstante, recientemente se ha sustituido por acocotes de fibra de vidrio o se improvisa con una botella de plástico de refresco. A este instrumento se le realiza huecos en los extremos, uno que se introduce al cajete y otro por el cual el tlachiquero succiona el aguamiel. El tlachiquero también lleva consigo un raspador o cuchara (Figura 3D), con el cual una vez extraído el aguamiel con el acocote se procede a raspar el cajete con el raspador. Antes o entre la labor de extraer el aguamiel de un agave a otro, es necesario dar filo al raspador, para ello se emplea una herramienta conocida como islabón o eslabón (Figura 3E). Para contener el aguamiel se lleva un bidón de 20 litros y para transportar se utiliza una carretilla. Estos utensilios se lavan de vez en cuando, únicamente con agua de chorro y algún estropajo, el tlachiquero también se lava las manos antes de realizar la extracción del aguamiel, sólo con agua de chorro. Se tiene la creencia que usar jabones, cremas en las manos o algún tipo de perfume “corta el pulque” (no fermenta adecuadamente). Generalmente el cajete del agave se tapa con una roca que tenga el tamaño de la oquedad o también se usan pedazos de las hojas o pencas para tapar (Figura 4 A-C).

Al cajete llegan gran cantidad de animales, principalmente insectos voladores como moscas de la fruta, abejas, entre otros (Figura 4D), cuando se destapa el cajete muchos siguen vivos y solo se retiran con el raspador. Para extraer el aguamiel se introduce el extremo más delgado del acocote al cajete, el tlachiquero succiona y rápidamente procede a tapar el hueco con su dedo índice. Saca el acocote y vacía el

contenido en el garrafón, lo tapa y procede a raspar el cajete con el raspador (esto se hace para evitar la cicatrización del tejido), se vuelve a tapar y ahí se deja hasta la siguiente extracción. Esto se repite en cada agave en producción, una vez colectada todo el aguamiel se lleva al tinacal en la carretilla, allí se encuentran las tinas de fermentación tradicionales de piel de ganado vacuno *Bos taurus*, aunque también pueden ser de fibra de vidrio (Fig. 3E-F). Una vez en el tinacal la persona encargada de realizar las labores del tinacal y las preparaciones del pulque es el mayordomo. Una vez que se recibe el aguamiel, se debe utilizar rápidamente, pues en unas dos horas puede “blanquearse” (inicia la fermentación) y ya no se usa. Se emplea un colador de plástico y se va colando el aguamiel a medida que se va vertiendo en una tina que ya contiene pulque del día anterior. Allí se deja que siga fermentando al menos unas tres a cuatro horas y ya está listo el pulque para tomar



Figura 3: A) Maguey Manso, B) Acocote de fibra de vidrio con una capacidad de ocho litros, C) Castañas de madera, fibra de vidrio y un acocote tradicional, D) Raspador o cuchara, E) Islabones o Eslabones para dar filo a otras herramientas.



Figura 4: A) Cajete del agave pulquero variedad Manso, B-C) Se muestra roca y pedazos de hojas del mismo agave que se utiliza para tapar el cajete, D) Cajete de agave con aguamiel, se aprecia insectos, E) Tina de piel de vaca para fermentar el aguamiel, F) Tinas de fibra de vidrio donde se fermenta el aguamiel y se almacena el pulque.

Conteo de bacterias mesófilas aerobias del aguamiel

El conteo total de UFC en aguamiel reveló que el número total de bacterias entre variedades era fluctuante, con una mayor carga microbiológica en las muestras provenientes de agaves de la variedad Chalqueño (Tabla 2).

Tabla 2: Unidades formadoras de colonia (UFC) en las variedades de agaves pulqueros (UFC/100 µL)

Tipo de medio	Muestra	Variedad Manso	Variedad Chalqueño.
Agar jugo de tomate	1	65,000	107,000
	2	12,000	393,000
	3	47,000	33,000
Agar soya tripticaseína	1	65,000	15,000
	2	80,000	18,000
	3	3,000	19,000

En el primer muestreo se obtuvieron 30 cultivos bacterianos axénicos y 26 en el segundo muestreo. El número inicial de cepas fue mayor, pero algunas fueron descartadas debido a la problemática de mantenerlas *in vitro*, ya sea por su metabolismo, ciclo de vida o complicaciones del entorno, que no fueron aptas para conservarlas por largos periodos (Escalante *et al.*, 2004).

Con base en los análisis morfológicos coloniales, se registró un total de 28 morfotipos distintos correspondientes al muestreo uno, procedentes de la variedad Manso. En el caso del muestreo dos se caracterizaron 45 morfotipos, 23 se reconocieron en la variedad tradicional Manso y 22 morfotipos pertenecen a la variedad tradicional Chalqueño. En el primer muestreo 21 cultivos fueron catalasa positiva, conforme a la prueba TSI, se encontró que cuatro cepas fermentaron glucosa, 23 fermentaron los tres azúcares (glucosa, lactosa y sacarosa), tres no son fermentadoras, cuatro son capaces de producir H₂S y diez son productoras de gas. En el segundo muestreo 15 cultivos fueron catalasa positiva; respecto a la prueba TSI diez fermentaron glucosa, 12 fermentaron los tres azúcares, dos no son fermentadoras, ninguna cepa produjo H₂S, finalmente seis son capaces de producir gas (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de pruebas bioquímicas por variedad tradicional de agave pulquero Manso y Chalqueño en las dos épocas de muestreo en el Rancho La Gaspaña, Singuilucan, Hidalgo. Lo números corresponden Muestreo 1: Invierno y Muestreo 2: Primavera.

Muestreo	# Cepas x Variedad	Catalasa		TSI							
				Gas		H ₂ S		Fermenta 3 azúcares	Fermenta glucosa	No	
				+	-	+	-				
1	Manso	30	21	9	10	20	4	26	23	4	3
2	Manso	16	10	6	5	11	0	16	9	5	2
	Chalqueño	10	5	5	1	9	0	10	3	5	2

3.2. Identificación

Se seleccionaron 21 muestras del cepario, siete correspondientes a la variedad de agave Chalqueño y las otras 14 a la variedad Manso, dichas cepas fueron seleccionadas considerando sus características morfológicas para tener una muestra representativa de los morfotipos que se encontraban en el cepario. Se identificaron 17 cepas de bacterias mesófilas y un microorganismo levaduriforme mesófilo. Los géneros bacterianos más representados fueron *Pseudomonas* y *Hafnia*. Las 17 cepas se reparten en 12 especies (Tabla 4).

Tabla 4. Especies identificadas por la técnica MALDI-TOF.

Especie	Aislada en	Características del grupo	Código NCBI
<i>Hafnia alvei</i>	Agua, suelo y alimentos	Fermenta glucosa y metaboliza aminoácidos. Patógeno oportunista poco común	569
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rizosfera y en plantas	Estimula el crecimiento vegetal	294
<i>Pseudomonas antartica</i>	Esteras de cianobacterias	Mesofila, mayormente aislada de fuentes animales	219572
<i>Citrobacter braakii</i>	Suelo, agua o tejidos animales	Fermenta glucosa, patógena de humanos	57706
<i>Pseudomonas poae</i>	Suelo y tejidos vegetales	Patógena en humanos	200451
<i>Pseudomonas monteilii</i>	Muestras ambientales y tracto respiratorio en humanos	Mesófila	76759
<i>Proteus mirabilis</i>	Microbiota intestinal humana	Fermenta glucosa, patógena en animales	584
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	Suelo y cuerpos de agua	Gram +, usada en bebidas probióticas, también como control biológico al producir proteínas tóxicas para larvas de mosquitos	1421
<i>Rahnella aquatilis</i>	Muestras de suelo, materia vegetal y comida	Fermenta glucosa, algunas cepas pueden ser fitopatógenas	34038
<i>Kluyvera intermedia</i>	Microbiota humano	Fermenta glucosa, se considera patógeno oportunista	61648
<i>Pantoea agglomerans</i> (sinónimo) <i>Erwinia herbicola</i>	Materia vegetal, semillas, frutos	Aerobia facultativa, produce ácidos a partir de la glucosa, se usa para biorremediación y como control biológico de enfermedades vegetales	549
<i>Clavispora lusitanae</i> Levadura	Bebidas tradicionales mexicanas como pulque y mezcal	Mesófila, estrechamente relacionada con el género <i>Saccharomyces</i> , fermenta glucosa, patógena oportunista en humanos	36911

La mayoría de las especies bacterianas son Gram negativas, asimismo casi todas pertenecen al filo proteobacteria, que se caracteriza por su diversidad genética y metabólica al igual que por su importante rol en la salud humana y sus interacciones en el medio ambiente (IEQFB, 2023). Sólo una cepa bacteriana era Gram positiva *L. sphaericus*. En el muestreo de febrero se identificaron cuatro especies relacionadas a los géneros *Hafnia*, *Pseudomonas* y *Citrobacter*; que contrastan con el segundo muestreo, donde se encontraron 11 especies pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Proteus*, *Lysinibacillus*, *Rahnella*, *Kluyvera*, *Pantoea* y *Candida*. Todos correspondientes a organismos bacterianos con excepción de *Candida*, antes mencionado como levadura. Las especies no se repiten por muestreo, sin embargo, se encontraron que varias especies del género *Pseudomonas*, pertenecen a la vez a un subgrupo denominado *Pseudomonas fluorescens*, fueron identificadas en ambos muestreos (Fig. 5A). Este grupo bacteriano ha sido directamente relacionado con la microbiología de la rizosfera en plantas y en algunos casos han sido empleados en cultivos

agrícolas (Pérez *et al.*, 2015). En el primer muestreo se identificaron tres especies (Figura 5B).

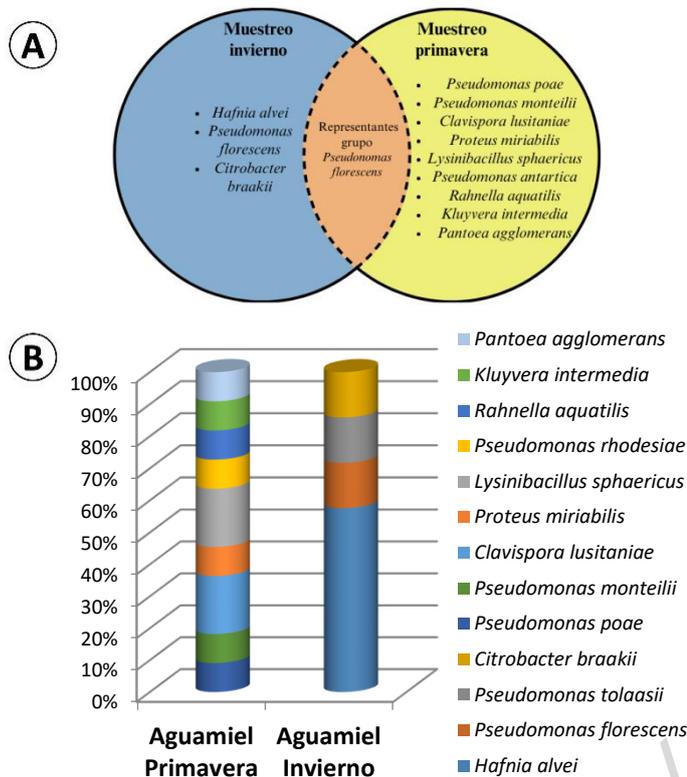


Figura 5: Distribución de las especies bacterianas por muestreo. A) Diagrama de comparación y similitudes de la diversidad microbiana proveniente de muestras de aguamiel correspondientes a dos distintas estaciones del año (primavera e invierno). B) Representación de la proporción en porcentaje de especies microbiana aisladas de diferentes plantas de agave.

4. Discusión

La especie *Agave salmiana* subespecie *salmiana* es la de mayor aprovechamiento en Hidalgo y otros estados para la producción de pulque, de tal manera que fue la principal especie que se encontró en producción durante los muestreos, siendo la variedad Manso y Chaqueño las más apreciadas por sus características. De igual manera es la especie con mayor presencia en los estudios de diversidad microbiana en la literatura (Cervantes *et al.*, 2007; Morales *et al.*, 2012; Villareal *et al.*, 2019). Las labores pulqueras aún se mantienen como hace décadas, son múltiples los instrumentos que se emplean, además de prácticas culturales en el manejo del aguamiel y el pulque de donde pueden provenir parte de los microorganismos que encontramos en el aguamiel y el pulque.

En el análisis realizado se confirmó que independientemente de la variedad tradicional de agave de donde provenga la muestra, los microorganismos predominantes son las BAL en comparación con las levaduras, teniendo una relación de 17 a dos. Se ha demostrado que existe una mayor cantidad de BAL que de levaduras en el aguamiel, y que el número de levaduras va en aumento y el de BAL disminuye conforme el proceso de fermentación avanza (Enríquez 2017; Herrera *et al.*, 2008). Durante las estaciones de invierno y primavera el aguamiel

suele ser más ácido, debido al efecto de la radiación solar en el metabolismo del agave, lo que favorece la presencia de microorganismos tolerantes a un pH ácido (Contreras *et al.*, 2017).

Dentro de los organismos identificados a nivel de especie que ya han sido relacionados con el aguamiel o productos derivados de la savia del agave, podemos mencionar a *Hafnia alvei* y *Clavispora lusitaniae* que han sido aislados directamente de muestras de aguamiel y pulque (Chacón *et al.*, 2020; Escalante *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2020); *Kluyvera intermedia* ha sido aislada previamente de muestras de pulque (Chacón *et al.*, 2020); *Citrobacter braakii* y *Pantoea agglomerans* no han sido descritas como especies relacionadas con el aguamiel, sin embargo el género *Citrobacter* y *Pantoea* son ampliamente reconocidos como parte importante de la microbiota del aguamiel (Carrasco, 2019; Enríquez, 2017); similar al caso de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas tolaasii*, *Pseudomonas poae*, *Pseudomonas monteilii* y *Pseudomonas rhodesiae* donde si bien las especies no han sido reportadas, la relación del género *Pseudomonas* con el pulque ya ha sido documentada; en el caso de la cepa de *Rahnella aquatilis* sólo el género había sido relacionado con muestras de pulque y aguamiel (Chacón *et al.*, 2020); finalmente *Lysinibacillus sphaericus* y *Proteus mirabilis* son especies que no ha sido asociadas con la savia del agave y tampoco con ninguna de sus fases de transformación posteriores; sin embargo en el caso de la *L. sphaericus*, se ha encontrado en el “kéfir” o también conocido como “búlgaros”, la cual es una bebida probiótica tradicional, producto de la fermentación de la leche por medio colonias coliformes compuestas por distintas bacterias y levaduras que coexisten en una relación simbiótica (Oliveira *et al.*, 2019). *P. mirabilis* ha sido relacionada con bebidas fermentadas de soya en donde sus compuestos principales son hemolisinas y ureasa; la hemolisina está relacionada a su capacidad patógena ya que su función se basa en hacer que las células de su huésped liberen los nutrientes y el patógeno, en este caso *P. mirabilis*, pueda aprovecharlos. Por otra parte, la ureasa es una enzima que es capaz de producir amoníaco a través de la hidrólisis de la urea, esta reacción genera un aumento de pH del medio por lo tanto la actividad de la ureasa le permite a la bacteria sobrevivir a medios ácidos, esta característica también está relacionada a sus propiedades patógenas ya que los sitios donde se aloja en su huésped suelen tener pH ácido (Reyes *et al.*, 2016).

Contrastando la diversidad entre los dos muestreos, se aprecia que el aguamiel de las muestras correspondientes al mes de abril, con temperatura ambiental ligeramente más elevada, tienen mayor diversidad que el aguamiel colectado en febrero, llegando a tener más del doble de distintas especies de microorganismos; además en las muestras de febrero se refleja una gran dominancia (homogeneidad) por *H. alvei* sobre las demás especies bacterianas, así como reporta Escalante *et al.* (2004) las BAL presentan dominancia sobre otros grupos bacterianos inclusive cuando el proceso de fermentación es más avanzado, en el caso del pulque, y aun así *H. alvei* sigue teniendo una presencia considerable en la caracterización bacteriana de dicha bebida; esto difiere de los resultados de otros estudios dependientes de cultivo, donde encontraron que la temporalidad con mayor número de especies era en invierno (Enríquez *et al.*, 2017); sin embargo

según Villareal *et al* (2019) basado en un estudio molecular donde comparan el aguamiel proveniente de dos especies, encontró que por el contrario la estación con mayor abundancia en diversidad microbiológica es en verano independientemente de que especie provenga; lo que nos permite deducir que la microbiota presente en el aguamiel sufre cambios en su estructura a lo largo de las estaciones del año. Una de las hipótesis que surgieron al explicar la diferencia en la diversidad entre estaciones fue que una de las fuentes de inoculación en el aguamiel son los insectos y el pico de actividad de estos organismos es en los meses más cálidos (primavera-verano); esta característica puede estar relacionada a que son organismos ectotermos por lo que necesitan del calor ambiental para regular su temperatura, además de que en estas temporadas aumenta la abundancia de recursos alimenticios (Peralta *et al.*, 2020), por lo tanto al tener una mayor cantidad de insectos interactuando con el aguamiel, la carga microbiológica inoculada por este medio también aumentaría en esta época.

Los azúcares en el aguamiel consisten principalmente en fructosa, seguido por glucosa y rastros de sacarosa (Peralta *et al.*, 2020) lo que convierte al aguamiel en un sustrato con características favorables para el crecimiento de poblaciones microbiológicas; permitiendo asimismo mantener sus poblaciones autóctonas en espera de condiciones ambientales y metabólicas apropiadas para su multiplicación (Cervantes y Pedroza, 2008). La mayor diversidad bacteriana encontrada en el aguamiel en este estudio corresponde al filo Proteobacteria; seguido por solo una cepa del grupo Firmicutes, esta relación se comporta de la misma manera a como Escalante *et al* (2008) lo reporta, mientras que los hongos se representaron por una especie del filo Ascomycetes (Fig. 5B). En cuanto a las proteobacterias se identificaron organismos pertenecientes a la clase Gammaproteobacteria, la cual es la clasificación más grande de las proteobacterias, con una gran diversidad de tipos fisiológicos y metabólicos, que si bien están relacionadas los factores abióticos donde se distribuyen los agaves pulqueros, también pertenecen diversas bacterias patógenas para humanos (Dueñez, 2013). Y si bien en la literatura se ha reportado la presencia de bacterias con potencial patológico en el aguamiel, se ha encontrado que solamente el 1% de la microbiota corresponde a este género puede ser un patógeno potencial (Huezo *et al.*, 2023) y así como Escalante *et al* (2008) argumenta, su presencia en el aguamiel puede ser solamente parte de su diversidad natural provenientes del ambiente y que se han ido acumulando en el cajete o que bien son inoculadas durante el proceso de extracción, manejo o almacenamiento, sin embargo podemos recalcar que en el presente estudio las muestras fueron tomadas de forma directa del agave, por lo que la presencia de este grupo bacteriano puede atribuirse de mayor manera a su acumulación medioambiental. Por su parte en el presente estudio se encontró que el 76% de las bacterias pertenecen al grupo de las Gammaproteobacteria, seguido por Firmicutes con 12% y Ascomycetes con 12%, contrario a lo que indica la literatura donde en otros estudios el porcentaje más representativo está conformado por organismos correspondientes al filo Firmicutes y el menos representativo conformado por el filo de las proteobacterias (Escalante *et al.*, 2004).

Sin embargo, es importante enfatizar que las gamma proteobacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza y no solo poseen capacidades patógenas, ya que pueden tener distintos papeles ecológicos, como las bacterias con metabolismo capaz de realizar la fijación de nitrógeno en el suelo. La presencia de bacterias patógenas en el aguamiel y algunos de sus derivados suele ser limitada, al igual que la información en la literatura sobre la presencia y comportamiento de bacterias patógenas en el mismo. Con el fin de determinar la bioseguridad del aguamiel y sus derivados Gómez (2011) realizó un análisis a lo largo del proceso de fermentación del aguamiel con cinco cepas patógenas gastrointestinales (*S. typhimurium*, *E. coli*, *S. flexneri*, *S. aureus*, y *E. aerogenes*) donde concluyó que estos organismos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros patógenos en condiciones *in vitro*; lo que demuestra que debido a las propiedades antimicrobianas que confieren ciertos metabolitos producidos por ciertas BAL en el aguamiel, las probabilidades de contraer enfermedades por consumo de bebidas tradicionales es bajo (Huezo *et al.*, 2023).

5. Conclusiones

La diversidad microbiológica de muestras de aguamiel provenientes de dos variedades tradicionales demostró tener diferencias en cuanto a riqueza, siendo abril donde hubo mayor riqueza; mientras que la variedad “Chalqueño” tiene mayor abundancia microbiológica, estas características podrían estar directamente relacionadas con las propiedades organolépticas que diferencian a cada uno de los productos obtenidos que son reconocidos y apreciados por sus particularidades.

La diversidad microbiana en el aguamiel se caracteriza principalmente por la presencia dominante de bacterias, seguida por levaduras, independientemente de su origen. Los microorganismos analizados han sido previamente asociados tanto con el aguamiel como con el pulque, y pertenecen a géneros que han sido correlacionados con estas bebidas tradicionales, así como con otras bebidas fermentadas ancestrales. Sin embargo, debido al número limitado de muestras analizadas a profundidad no es posible determinar si los datos se comportarían de la misma manera en las muestras que no fueron candidatas al análisis MALDI-TOF; por lo que permanece un área de oportunidad en la investigación de la biodiversidad microbiológica del aguamiel y productos derivados, en niveles intraespecíficos de *A. salmiana* subespecie *salmiana*. Es importante recalcar que los estudios moleculares enfocados en BAL han provisto de perspectivas de su perfil metabólico y en sus relaciones con otros organismos y el ambiente con el fin de comprender su papel en la fermentación tradicional o industrializada de alimentos y su interacción con los humanos (Douillard y Vos, 2014)

Agradecimientos

Agradecemos al Rancho La Gaspareña por las facilidades para la realización de esta investigación, a Mario A. García Montes y Cynthia Nicolás Sánchez por su apoyo en campo. Este trabajo forma parte del proyecto de titulación de Nahomi

Lee Silva López para la obtención del grado de Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, fungiendo como tutora la Dra. Carmen J. Figueredo Urbina y como cotutor la Dra. Sylvia Martínez Hernández. La investigación es parte del Proyecto Investigadoras e Investigadores por México CONACYT CIR/0010/2022.

Referencias

- Aguado, G., Aguado, D., Moreno, B., Arroyo, D., Centeno, D., Aguirre, C., García, E. (2022). Endomicrobiota Bacteriana de Agave Pulquero (*Agave salmiana*). *Fitotec*, 45(2), 242-250. <https://doi.org/10.35196/rfm.2022.2.243>
- Alanís, G., y González, M. (2011). Formas de uso de los magueyes (*Agave spp.*) en Nuevo León, México. *Revista Salud Pública y Nutrición*, Edición Especial, (5), 287-299.
- Álvarez, G., Figueredo, C. y Casas, A. (2020). Sistemas de manejo de maguey pulquero en México. *ETNOBIOLOGÍA*, 18(2), 3–23.
- Álvarez, G., Vallejo, M. y Figueredo, C. (2022). Agaves pulqueros de México. DOI: 10.13140/RG.2.2.30667.05928
- Bou, G., Fernandez, A., García, C., Saenz, J. y Valdezate, S. (2011). Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *El Servier*. 29(8), 601-608.
- Bernard, H. R. (2017). Research methods in anthropology: Qualitative and quantitative approaches. *Rowman & Littlefield*.
- Bravo, G. (2014). Vocabulario náhuatl del maguey y el pulque. México: Asociación de amigos del museo del maguey.
- Caballero, J. (2006). Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. *Revista Latinoamericana de microbiología*. 48(2), 154-161.
- Carbonero, P. (1975). Bioquímica de las fermentaciones. Universidad Politécnica de Madrid.
- Carrasco, T. (2019). Identificación fenotípica y genotípica de bacterias acidolácticas aisladas de aguamiel y pulque con actividad antimicrobiana frente a bacterias asociadas a enfermedades transmitidas por alimentos. *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Ciencias Químicas*
- Cervantes, M. y Pedroza, A. (2007). El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *Nova* 5(8), 101-212. <https://doi.org/10.22490/24629448.382>
- Chacón, K., Torres, J., Giles, M., Escalante, A., y Gibbons, J. G. (2020). Genomic profiling of bacterial and fungal communities and their predictive functionality during pulque fermentation by whole-genome shotgun sequencing. *Scientific reports*, 10(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71864-4>
- Colunga, P., Torres, I., Casas, A., Figueredo, C., Rangel S., Delgado, A., Vargas, O., Cabrera, D., Zixumbo, D., Aguirre, X., Eguarté, L. y Carrillo, G. (2017). Los Agaves y las prácticas mesoamericanas de aprovechamiento, manejo y domesticación. *Domesticación en el continente americano*, 2, 273-308. <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/magueyes>
- Contreras, F. E., Martínez, R. A., Martínez, M. A., Rodríguez-García, M. E., Aguilar-Uscanga, M. G., y Delgado-Portales, R. E. (2017). Microbiota of Agave Salmiana and Synergistic Interaction of Bacteria and Yeast in a Mexican Pulque Fermentation. *Frontiers in microbiology*, 8, 2490. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02490>
- Diario Oficial de la Federación (1972). Aguamiel/ Hidromiel. Informe México, D.F., Septiembre 12, 1972
- Douillard, F. y Vos, W. (2014). Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microb. Cell. Fact.* 13:S8. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S8
- Dueñas, S. (2013). Diversidad de proteobacterias (alfa, beta, gamma, delta y épsilon) presentes en aguas profundas del Golfo de México (Tesis Licenciatura). Universidad Autónoma de Baja California. Baja California, México. <https://hdl.handle.net/20.500.12930/492>
- Enríquez, M., Veana F., Aguilar, C., Garza, I., López, M., Rutiaga, O., Morlett, J. y Rodríguez, H. (2017). Microbial diversity and biochemical profile of aguamiel collected from Agave salmiana and A. atrovirens during different seasons of the year. *Food Sci Biotechnol* 26 (4), 1003-1011. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0141-z>
- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernandez, G., Cordova-Aguilar, M., Lopez-Munguia, A., Gosset, G. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *Food Microbiology*. 124, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003>
- Escalante, A., Rodríguez, M., Martínez A., López A., Bolívar, F. y Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 235(2), 273-279. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09599.x>
- Escalante, P., Blaschek, A., Santos, L. y De León, A. (2008). Identification of yeast and bacteria involved in the mezcál fermentation of Agave salmiana. *Applied Microbiology International*. 46, 626–630. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2008.02359.x>
- Espindola, V., Trejo, M., Lira, A. y Pascual, S. (2018). Caracterización del aguamiel y jarabe de agave originario del Estado de México, Hidalgo y Tlaxcala. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos* 3, 522-528.
- Figueredo, C., Álvarez, G., García, M. y Octavio, P., (2021). Morphological and genetic diversity of traditional varieties of agave in Hidalgo State, Mexico. *PLoS ONE* 16(7). <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-143808/v1>
- Flachs, A. y Orkin, J. (2019). Fermentation and the ethnobiology of microbial entanglement. *Ethnobiology Letters*, 10(1), 35-39. <https://doi.org/10.14237/ebl.10.1.2019.1481>
- Fournier G. y Mondragón B. (2012). Las bebidas mexicanas, Pulque, mezcál y tesgüino. *Arqueología Mexicana*, 19, 53-59
- García, A. (2007). Los Agaves de México. *Ciencias*, 087, 14-23
- Gentry H. (1982). Agaves of Continental North America. Arizona University Press, Tucson. <https://doi.org/10.2307/j.ctv1t4m2h4>
- Gibbons, J. y Rinker, D. (2015). The genomics of microbial domestication in the fermented food environment. *Current opinion in genetics & development*, 35: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.07.003>
- Gomez, C., Díaz, C., Villarruel, A., Torres, M., Añorve, J., Rangel, E. y Castro, J. (2011). Behavior of *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* during production of pulque, a traditional Mexican beverage. *Journal of food protection*. 74(4), 580-587. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-10-382>
- Herrera, M., Lappe, P., y Wachter, C. (2008). Identificación polifásica de levaduras y bacterias ácido lácticas aisladas de aguamiel, pulque y semilla. VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. XIII Congreso Nacional de Biotecnología.
- Huezo, A., Ortega, E., Pérez, B., y El-Kassis, E. (2023). Characterization of Bacterial Diversity in Aguamiel and Two Types of Pulque from the Zacatlán Region, México. *Fermentation*, 9(6), 564. <https://doi.org/10.3390/fermentation9060564>
- Instituto Europeo de Química Física y Biología (2023). ¿Qué son las proteobacterias y cómo se clasifican? Instituto Europeo de Química, Física y Biología. <https://ieqfb.com/clasificacion-proteobacterias/>
- Lappe, P., R. Moreno, J. Arrizón, T. Herrera, A. García, A. Gschaedler. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic non distilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1037-1052. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00430.x>
- León, D., Colín, D., Padilla, D., Hurlé, L., García, F., y Brito, R. (2012). Análisis bromatológico y aislamiento de microorganismos con potencial probiótico del pulque. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria: Investigación de la Universidad Simón Bolívar*, (11), 115-122.
- Montúfar, A. y Anzués, N. (2014). El registro arqueológico e histórico del maguey. *Arqueología Mexicana Especial* 57, 12- 13
- Mora, J., Reyes, J., Flores, J., Peña, C., y Aguirre, J. (2011). Variación morfológica y humanización de la sección Salmiana del género Agave. *Agrociencia*, 45(4): 465-477.
- Morales, F., Reyes, J., y Pérez, A. (2012). La producción de pulque en México: estado del arte. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(1).
- Odds, F. (1991). Sabouraud ('s) agar. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 29(6), 355-359.
- Oliveira, B., Fiorda, G., Thomas, V., Rakshit S., Carvalho, J. y Socol, C. (2019). In vitro Probiotic Properties and DNA Protection Activity of Yeast and Lactic Acid Bacteria Isolated from A Honey- Based Kefir Beverage. *Foods*, 8(10), 458.
- Peralta, I., Gonzalez, F., Rodriguez, M., Sanchez A y López A. (2020). Evolution of fructans in aguamiel (Agave sap) during the plant production lifetime. *Frontiers in Nutrition*. 7. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.566950>
- Reyes, L., Soto, M., Olvera, J., Orozco, E., Lobo, N., Plenge, L., Galván, J., Alvarez, E., Martínez, A., y Díaz, Ángel. (2016). Aspectos estructurales y mecánicos de la enzima ureasa y sus proteínas accesorias. *Ciencia en la frontera. Especial*. 19-36.
- Rocha, C., Espinal, A., Martínez, S., Caballero, J., Alcaraz, L y Cruz, A. (2020). Deep microbial community profiling along the fermentation

- process of pulque, a biocultural resource of Mexico. *Microbiological Research*, 241, 126593. <https://doi.org/10.1101/718999>
- Sánchez, A., Terán, J., y Piso, J. (1957). Estudios sobre la microbiología del pulque. -XVIII.- Datos químicos de la fermentación del aguamiel con cultivos puros. *Sociedad Química México* 1: 167–174.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, (2022). Estadística de Producción agrícola. <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php>
- Taddei, C., Preciado, J., Robles, J., Aranda, N., Chavez, I.,García, J. y Salomón, A. (2017). Hidalgo Caracterización de la Región e Identificación de Proyectos Productivos Factibles. *Creación del Centro de Investigación y Desarrollo en Agrotecnología Alimentaria*. CONACYT. 12-17.
- Villareal, S., Enriquez, M., Michel, M., Flores, A., Montañez, J., Aguilar, C. y Rodríguez R. (2019). Metagenomic Microbial Diversity in Aguamiel from Two Agave Species During 4- Year Seasons. *Food Biotechnology*, 33 (1): 1-16. <https://doi.org/10.1080/08905436.2018.1547200>
- Velasco, R. y Tapia, R. (2014). Curso práctico de microbiología. Universidad Autónoma Metropolitana.

Aceptado/Accepted