

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Análisis metagenómico de la diversidad microbiana de la savia
del Agave Americana L. (Chaguar mishqui) en dos localidades de
la región Andina**

Doménica Mayte Argüello Sanipatín

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de:
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 14 de mayo de 2021

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Análisis metagenómico de la diversidad microbiana de la savia
del Agave Americana L. (Chaguar mishqui) en dos localidades de
la región Andina**

Domenica Mayte Argüello Sanipatin

Nombre del profesor, Título académico

Sonia Zapata Mena, PhD

Quito, 14 de mayo de 2021

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Doménica Mayte Argüello Sanipatín

Código: 00136818

Cédula de identidad: 1727208967

Lugar y fecha: Quito, 14 de mayo de 2021

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

RESUMEN

El Chaguar mishqui es una importante bebida tradicional ecuatoriana, extraída de pencos maduros preferentemente del *Agave americana* L. Ha sido atribuida características curativas para varias enfermedades, principalmente digestivas. Se realizó el análisis metagenómico de la savia de dos plantas de Agave ubicados en dos provincias de Ecuador, gracias a la secuenciación de los genes 18S rRNA para fungi y 16S rRNA para el dominio bacteria. La abundancia y diversidad de los microorganismos variaron en ambas muestras, sin embargo, se identificaron organismos compartidos que corresponde a microbiota autóctona. Se identificaron 7 géneros y 7 especies de levaduras donde destaca *Kluyveromyces marxianus*. Así mismo, se identificaron 12 géneros y 20 especies de bacterias, de las cuales, las más abundantes fueron bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas y *Zymomonas mobilis*. Los resultados de este estudio generan una visión general acerca de la ecología microbiana relacionada con la fermentación del Chaguar mishqui, con el fin de controlar el proceso y seleccionar aquellos microorganismos con potencial probiótico en un futuro.

Palabras clave: Chaguar mishqui, metagenómica, pulque, *Agave*

ABSTRACT

Chaguar mishqui is an important traditional Ecuadorian drink, extracted from Agave, preferably from *Agave americana* L. It has been attributed curative characteristics for various diseases, mainly digestive. A metagenomic analysis of the sap of two Agave plants located in two provinces of Ecuador was conducted, using the 18S rRNA gene for fungi and 16S rRNA gene for the Bacteria domain. The abundance and diversity of the microorganisms varied in both samples; however, shared organisms were identified, those correspond to autochthonous microbiota. Seven genera and 7 yeast species were identified where *Kluyveromyces marxianus* was the most abundant species. Likewise, 12 genera and 20 species of bacteria were identified, of which the most abundant were lactic acid bacteria, acetic acid bacteria and *Zymomonas mobilis*. The results of this study generate an overview of the microbial ecology related to the fermentation of Chaguar mishqui, in order to control the process and select those microorganisms with probiotic potential in the future.

Key words: Chaguar mishqui, metagenomics, aguamiel, *Agave*

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	11
La cabuya negra	11
Obtención del Chaguar mishqui	12
Microbiota asociada a la fermentación	12
METODOLOGÍA	15
Toma de Muestras	15
Extracción del DNA total	15
Amplificación de los genes 16S rRNA y 18S rRNA	15
Secuenciamiento y Análisis metagenómico	16
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIONES	25
TABLAS	26
FIGURAS	27
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
ANEXOS	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies encontrada en el análisis 18S rRNA Se muestra las especies identificadas en ambas muestras y sus porcentajes de abundancia a partir del número de lecturas obtenidas para cada microorganismo vs. el número de lecturas totales	26
Tabla 2. Especies encontradas en el análisis 16S rRNA Se muestra las especies identificadas en ambas muestras y sus porcentajes de abundancia a partir del número de lecturas obtenidas para cada microorganismo vs el número de lecturas totales	26

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Géneros encontrados en PICH-19 y COT-5 18S rRNA.** Se muestran los porcentajes de abundancia de los géneros identificados en la muestra PICH-19 y COT-5, basados del número de lecturas obtenidas para cada microorganismo vs. los lecturas totales 27
- Figura 2. Géneros encontrados en PICH-19 16S rRNA.** Se muestran los porcentajes de abundancia basados en el número de lecturas obtenidos para cada microorganismo vs los lecturas totales de la muestra PICH-19. Aquellos géneros con * son pertenecientes al grupo de BAL. 27
- Figura 3. Géneros encontrados en COT-5 16S rRNA.** Se muestran los porcentajes de abundancia basados en el número de lecturas obtenidos para cada microorganismo vs los lecturas totales de la muestra COT-5. Aquellos géneros con * son pertenecientes al grupo de BAL. 28

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Condiciones de PCR.....	33
---	-----------

INTRODUCCIÓN

El Chaguar mishqui, Tzwar mischki o Chawar Mihski, antiguamente conocido como la bebida de los dioses ha sido utilizada por comunidades indígenas ecuatorianas y andinas como una bebida nutritiva, medicinal y espirituosa. Es la savia o aguamiel obtenida a partir de pencos maduros y se caracteriza por su sabor dulce. Se la consume en diversas presentaciones: inmediatamente después de retirarlo del penco, en forma de miel, como colada después de cocinarlo y, como bebida alcohólica fermentada o destilada (muy similar al tequila) (Ayora & Quito, 2013).

El aguamiel obtenido del penco o cabuya negra era considerado como fuente de vida para los pobladores de la región Andina prehispánicos debido a todas las propiedades curativas que se le atribuían tales como: curar articulaciones, dolores, malestar estomacal, impotencia sexual, etc. A partir de la llegada de los españoles, su popularidad bajó drásticamente y el uso del penco era mal visto por las clases sociales altas (Quishpe, 2020). Actualmente, los mishqueros (quienes extraen el Chaguar mishqui) son muy pocos y a pesar de la antigüedad de tan versátil bebida existen escasas investigaciones científicas sobre su composición, propiedades curativas y su producción a gran escala aún es una opción muy lejana en nuestro país (Teleamazonas, 2019).

La cabuya negra

El Agave es el género al que pertenece el penco azul o la cabuya negra. Pertenece a la familia de las Agavaceae, es una planta que crece en condiciones de sequía y en zonas áridas y es originaria de México. Actualmente, se han descrito al menos 100 diferentes especies, pero en Ecuador la más abundante y utilizada para extraer su savia es el *Agave americana* L. o *Agave americana* Linn que se encuentra extendido por toda Sudamérica principalmente en Ecuador, Perú,

Chile y Bolivia. En estos países se conoce a su savia como Chaguar Mishqui o mishqui chancaca (Flores, 2016).

Obtención del Chaguar mishqui

El proceso de obtención del Chaguar mishqui es extenso. En un principio, hay que esperar a que el penco tenga de 8 a 12 años para que el ‘corazón’ del penco este maduro. El cual sale como un tronco muy alto que se lo conoce como tallo floral que debe ser cortado antes de continuar el proceso. Una vez cortado el tallo, la planta empieza a producir el aguamiel y se la deja reposar por alrededor 6 meses antes de extraer la savia (Ayora & Quito, 2013). Después de este tiempo, se procede a cortar el centro de la planta hasta obtener una especie de olla, donde el aguamiel se irá almacenando. El mishquero, raspa la ‘olla’ lo que lastima la planta y promueve que el aguamiel caiga en la misma. Generalmente, la recolección de la savia se la realiza dos veces al día: en la mañana y en la tarde, intentando esperar al menos 5 horas entre las extracciones. El penco genera Chaguar mishqui por 3 o 4 meses antes de secarse y morir, no sin antes dejar rizomas que permitirán el crecimiento de nuevos pencos (Allauca, 2010).

Microbiota asociada a la fermentación

La extracción del Chaguar mishqui es un conocimiento tradicional que se ha traspasado de generación a generación, por este motivo, la falta de métodos estandarizados o de saneamiento y las características del proceso de extracción permite el crecimiento de amplias comunidades microbianas como levaduras y bacterias. Estos microorganismos son los encargados de fermentar la savia, incluso cuando sigue en la “olla” del penco. Sin embargo, debido a la falta de conocimiento acerca de su microbiota y su extracción al aire libre resulta complicado controlar la

fermentación y evitar su contaminación, lo que es esencial para obtener un producto final de calidad y acreditado para ser consumido por el ser humano (Teleamazonas, 2019).

En cuanto a la microbiota descrita del Chaguar mishqui, se encuentran levaduras, que intervienen en una variedad de alimentos fermentados en las que producen etanol y CO₂ en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Ciani & Mannazzu I, 2018). También, bacterias ácido lácticas (BAL) quienes degradan carbohidratos para producir ácido láctico y CO₂, crecen en ambientes microaerófilos y en pH ácidos (4 - 4,5 (Ciani & Mannazzu I, 2018) y finalmente bacterias acéticas que suelen ser consideradas “spoilers” no deseados en bebidas fermentadas como el vino o la sidra, sin embargo, suelen estar presentes en fermentaciones naturales de ciertos tipos de cerveza, kombucha o cocoa (De Rosse & De Vuyst). La presencia de ciertas enterobacterias, coliformes u hongos son indicadores contaminación debido a la manipulación directa de personas con mala higiene o mal lavado de utensilios (Gonzalez, 2018).

La microbiota presente en el Chaguar Mishqui ha sido caracterizada solamente por métodos dependientes de cultivos y, aun así, estos tipos de estudios son escasos (Figuroa & Sosa, 2015). El uso de herramientas de secuenciación de nueva generación ayuda a visibilizar toda la comunidad de microorganismos presentes incluyendo a microorganismos no cultivables. Por ejemplo, el cultivo de algunas bacterias ácido-acéticas es muy complicado y suelen estar en un estado viable pero no cultivable (VBNC) (De Rosse & De Vuyst). También, permite dilucidar los cambios en abundancia y diversidad de las comunidades microbianas en distintos tiempos de recolección y compararlos con estudios realizados en otros países (De Filippis, Parente, & Ercolini, 2016). La microbiota aun no descrita en la savia del *Agave* puede jugar un papel importante en la composición del aguamiel y en la ecología de las especies y linajes presentes en la misma. Al conocer toda la diversidad presente se puede empezar a direccionarse hacia la producción a gran

escala de derivados e incluso conocer si efectivamente se pueden utilizar los microorganismos presentes como probióticos beneficiosos para la salud humana (De Fillippis, Parente, & Ercolini, 2016).

Los estudios enfocados en la diversidad microbiana del aguamiel del *Agave americana L.* son pocos a pesar de tener varias aplicaciones para mejorar su calidad, aumentar su producción y visibilizar una bebida tradicional que se ha ido extinguiendo con los años. Además, este tipo de estudios reducen los sesgos y permiten entender de manera global la comunidad microbiana presente, tanto de organismos cultivables como no cultivables permitiendo comparar los resultados con otros estudios realizados. Este proyecto se convierte en el primer estudio de metagenómica del Chaguar mishqui en Ecuador. Aquí, se analiza la secuenciación de 16S rRNA (bacteria) y 18S rRNA (fungi) de la savia obtenida de pencos (*Agave americana L.*) de dos provincias ecuatorianas: Pichincha y Cotopaxi con el objetivo de entender los cambios de diversidad y abundancia de los microorganismos en el proceso. Además, analizar su potencial probiótico y si existe indicadores de contaminación

METODOLOGÍA

Toma de Muestras

En este estudio se realizó el análisis metagenómico dos muestras provenientes de otro proyecto que estudió las características fisicoquímicas y microbiológicas de la savia mediante técnicas tradicionales. La muestra 1 se identificó como (Pich-19) y fue colectada en la provincia de Pichincha en la comunidad “La Toglla” ubicada en el cerro Ilaló, y estuvo dentro de la planta en la “olla” 19 horas desde la última recolección. La segunda muestra (Cot-5) fue colectada en el noroccidente de la provincia de Cotopaxi en el cantón Pujilí, barrio Sarapamba y estuvo dentro de la planta en la “olla” 5 horas.

Extracción del DNA total

. El protocolo de extracción del DNA se llevó a cabo con el kit comercial PureLink Genomic DNA. En general, el protocolo consiste en: preparación de las muestras, unión del DNA, lavado, elución y finalmente purificación usando centrifugación. Para garantizar la calidad del DNA se utilizó RNAasas para la digestión del RNA que contamina la muestra final. A continuación, se realizó digestión con la proteinasa K utilizada para lisis de células y tejidos con el objetivo de mantener la calidad del DNA deseado. Para evaluar la pureza del DNA se utilizó NanoDrop; para evaluar la concentración se utilizó Qubit y para evaluar la integridad del DNA se realizó un gel de agarosa.

Amplificación de los genes 16S rRNA y 18S rRNA

Se obtuvo el DNA de calidad, pureza e integridad apropiada para continuar con los pasos de amplificación del 16s rRNA. Para la amplificación del 16S rRNA V3-V4 en bacteria se utilizó

el primer forward 341f 5'- CCTAYGGGRBGCASCAG-3' y reverse 806R 5'- GGACTACNNGGGTATCTAAT-3'. Se utilizó la polimerasa FastPfu y las condiciones de la reacción se encuentran detalladas en el Anexo A.

Para la amplificación del 18S rRNA de fungi se utilizó el primer forward TAREuk454FWD1F 5'-CCAGCASCYGC GGTAATTCC-3' y reverse TAREukREV3 5'- ACTTTCGTTCTTGATYRA-3'. Se utilizó la polimerasa FastPfu y las condiciones de la reacción se encuentran detalladas en el Anexo A.

Secuenciamiento y Análisis metagenómico

El secuenciamiento del DNA se realizó por CD genomics (16S rRNA) y Fisabio (18S rRNA). Se utilizó la plataforma Illumina HiSeq 3500 para generar pair end (PE) reads de 250pb. Durante la preparación de la librería, se les asignó un barcode único. El barcode y la secuencia del primer fueron truncados. A continuación, se ensamblaron las PE reads y se eliminaron las secuencias quiméricas. Se generaron 36518 reads para el 18S rRNA (Pich-19), 16831 reads para el 18s rRNA (Cot-5), 32629 reads para el 16S rRNA (Pich-19), 28453 reads para el 16S rRNA (Cot-5).

Con el objetivo de analizar la diversidad de especies en las muestras se utilizó el software R para hacer clustering y asignar ASVs. Las secuencias fueron asignadas en ASVs con el paquete de R DADA2 versión 1.8.1. Se asignaron en 9 ASV en los análisis de 18S rRNA y 44 ASV en los análisis de 16S rRNA. Las secuencias se alinearon y compararon con la base de datos de SILVA y se utilizó el método de Bayes khmer para la asignación taxonómica. La asignación taxonómica de cada ASV generó información acerca de la diversidad de cada tratamiento (Pich-19 y Cot-5)

hasta el nivel de género. Para determinar la abundancia relativa se comparó el número de lecturas obtenidas para cada microorganismo contra el número de lecturas totales de la muestra. Para tener mayor resolución y determinar género y especies se compararon y alinearon las secuencias representativas ($>0,1\%$) con la base de datos del NCBI BLASTn y el software Bioedit respectivamente. Para los análisis presentados en el presente proyecto, se determinó como significativas aquellos géneros y especies que representaron $>0,01\%$ en cualquier tratamiento tanto para bacteria y fungi.

RESULTADOS

Se determinó como significativos para el análisis aquellos géneros y especies encontrados en al menos 0,01% en las dos muestras tanto para el marcador 16S rRNA como para el 18S rRNA. Se hizo una relación directa entre la cantidad de lecturas determinados para cada organismo y su abundancia dentro del tratamiento, es decir, mientras a mayor cantidad de lecturas que se hayan generado se interpretó como mayor abundancia relativa. Para fungi, se obtuvo un total de 36518 para el tratamiento de Pich-19 18S rRNA y 16831 para Cot-5 18S rRNA. Para el dominio bacteria, se encontró un total de 32629 para el tratamiento Pich-5 y 28453 para Cot-5.

El análisis de 18S rRNA muestra la presencia de levaduras de la división Ascomycota, de la clase Saccharomycetes y del orden Saccharomycetales. Se identificó un solo género compartido entre ambos tratamientos que fue *Kluyveromyces*. En cuanto a Pich-19 tiene presentes dos géneros de levaduras *Kluyveromyces* (99.66%) y *Candida* (0.27%). *Candida* no aparece en el tratamiento Cot-5, sin embargo, en este tratamiento se identificaron otros géneros significativos como *Saccharomyces* (33.64%), *Brettanomyces* (10.62%), *Hanseniaspora* (6.51%) y *Pichia* (0.35%) a parte de *Kluyveromyces* (48.84%). Ver Figura 1.

En la Tabla 1 se observa un resumen de las especies identificadas con más del 0.01% de abundancia en el estudio molecular del 18S rRNA. *Kluyveromyces marxianus* es la levadura más abundante en los dos tratamientos, representa el 99.66% en Pich-19 y el 48.88% en Cot-5. Cot-5 se identificaron 5 especies y, por otro lado, Pich-19 solo se identificaron dos especies.

En el análisis del marcador 16S rRNA, se encontraron 12 géneros presentes en al menos 0,01% en alguno de las dos muestras. De estos, 6 son compartidas entre Pich-19 y Cot-5. Entre

ellos destacan 4 géneros de BAL: *Lactococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, bacterias ácido-acéticas (BAA): *Acetobacter* y un género de importancia de bacilos Gram negativos fermentadores y productores de etanol: *Zymomonas*. Los 6 géneros restantes son exclusivos de algún tratamiento y 4 de ellos pertenecen a la familia de Enterobacteriaceae.

En la Figura 2 se detallan los porcentajes de abundancia de los géneros presentes en Pich-19, se identificaron 10 géneros con una abundancia de al menos 0,01%. De estos, el 74.23% se relaciona con bacterias del género *Lactococcus*, recientemente clasificada como un nuevo género análogo a *Streptococcus*. Además, se identificaron 3 géneros más de bacterias ácido lácticas: *Weissella*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. En resumen, las BAL en este tratamiento representan el 80.27% de la microbiota total. Se encontró el género *Acetobacter* como representante de BAA con una abundancia de 0,24%. El 5% son pertenecientes de la familia Enterobacteriaceae, dentro de ellas se encuentran: *Enterobacter* (1,23%), *Kluyvera* (2.115) y *Lelliottia* (1.66%) que son indicadores de contaminación durante el proceso de fermentación del Chaguar mishqui. Cabe mencionar que estos 3 géneros BAL son exclusivos del tratamiento Pich-19 y no fueron encontrados en Cot-5. También, se identificó *Acinetobacter*, bacteria Gram negativa no fermentadora, posiblemente indicadora de deterioro. Finalmente, las bacterias del género *Zymomonas* (0,31%) fermentadoras productoras de etanol y han sido descritas como deseables en estudios a cerca de la microbiota de bebidas provenientes del agave.

En cuanto a la muestra Cot-5 con 5 horas de fermentación se encontraron 8 géneros representativos (>0,01%), de los cuales 5 son géneros de BAL: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* y *Lactobacillus* que corresponden al 69.4% de la microbiota total. El 29.24% corresponde al género *Zymomonas*, cabe recalcar que tiene una abundancia considerablemente

mayor con respecto a la muestra Pich-19 donde representaba el 0.31%. El género *Acetobacter* representó el 0.24%, muy cercano al 0.23% encontrado en el tratamiento Pich-19. Finalmente, se encontró un género exclusivo de este tratamiento *Hafnia* (0.19%) de la familia de las enterobacterias como indicador de contaminación. Ver Figura 3.

En la Tabla 2 se detallan las 20 especies identificadas en ambos tratamientos con el marcador 16S rRNA (>0.01%). Siendo *Lactococcus plantarum* la más abundante, sin embargo, en el tratamiento Cot-5 hay menor abundancia de esta especie en específico pero mayor diversidad de especies en comparación a Pich-19 que la abundancia de *L. plantarum* es sumamente alta pero la diversidad de especies baja considerablemente. Se encuentran también 4 especies pertenecientes al género *Leuconostoc* presentes en el tratamiento Cot-5: *Leuconostoc fallax*, *L. Kiimchi*, *L. mesenteroides* y *L. citreum*. De estas solamente *Leuconostoc mesenteroides* se identifica en ambos tratamientos, bacteria que es asociada directamente con alimentos fermentados. En cuanto al género *Lactobacillus* se encontró 7 especies siendo el más diverso. De las 7 especies de *Lactobacillus* solamente 2 son compartidas por ambos tratamientos: *Lactobacillus gallinarum* y *Lactobacillus sucicola* ambas han sido estudiadas por su potencial actividad probiótica en alimentos. Las 5 especies restantes (*L. pasteurii*, *L. plantarum*, *L. kefir*, *L. paracollinoides*, *L. vespulae*) son exclusivas del tratamiento Cot-5. Finalmente, se encontraron 4 especies de enterobacterias: *Kluyvera ascorbata*, *Enterobacter ludwigii* y *Lelliottia nimispressuralis* exclusivas de Pich-19 representando el 4.99% de la microbiota, posiblemente estos datos demuestran mayor contaminación durante el proceso que el tratamiento Cot-5 donde se identifica únicamente la enterobacteria *Hafnia alvei* que representa el 0.19%.

DISCUSIÓN

El Chaguar mishqui es producto de la fermentación natural de la savia del penco, donde los microorganismos varían en abundancia y diversidad durante el tiempo. En este tipo de fermentaciones los microorganismos es el ambiente, suelo, aire, plantas y utensilios inician el proceso (De Vuyst & Weckcx, 2015). Existen pocos estudios a cerca de la microbiota del Chaguar mishqui, sin embargo, se ha identificado como microorganismos dominantes a bacterias ácido lácticas y levaduras autóctonas (Figueroa M. , 2015).

A partir de los resultados obtenidos se infiere que un consorcio de levaduras y bacterias son responsables de la fermentación alcohólica del Chaguar mishqui. Donde la mayor diversidad se encuentra en el dominio Bacteria representado por 12 géneros y 20 especies, cantidad mayor a las 6 especies identificadas con el gen 18S rRNA. A pesar de que las muestras provienen de localidades distintas, se identificó microorganismos compartidos, dando indicios que los mismos se traten de microbiota autóctona del *Agave americana L.* y no dependan de la localidad en la que se encuentren. En general, se comparten géneros BAL, BAA, *Z. mobilis* y *K. marxianus*.

Los cambios en abundancia y diversidad pueden ser explicados por la competencia nutricional que se genera durante la fermentación (Chacon-Vargas, Torres, Giles-Gomez, Escalante, & Gibbons, 2020). La muestra Cot-5, tuvo mayor diversidad de microorganismos. A inicios de la fermentación, las poblaciones tienen condiciones ambientales y nutricionales favorables que son fácilmente usadas por varios géneros autóctonos del ambiente (De Vuyst & Weckcx, 2015). Por otro lado, la muestra con más abundancia fue Pich-19, al ser una etapa más avanzada de fermentación los microorganismos dominantes crecen, produciendo metabolitos específicos y cambia las condiciones fisicoquímicas, como el pH o cantidad de oxígeno disponible,

inhibiendo el crecimiento de poblaciones minoritarias encontradas en etapas iniciales (De Vuyst & Weckcx, 2015).

K. marxianus fue la levadura más abundante en ambas muestras, la cual ha sido descrita en investigaciones del pulque (bebida mexicana fermentada obtenida a partir del *Agave*) y de otras bebidas destiladas del *Agave* (Herrera, Lappe, & Wachter, s.f). Posiblemente forma parte de la microbiota autóctona del *Agave*, lo cual, explica su elevada abundancia en comparación a otras levaduras. Además, se ha descrito que tiene mayor rango de degradación de sustratos que la levadura comercial *S. cerevisiae* (Chacon-Vargas, Torres, Giles-Gomez, Escalante, & Gibbons, 2020). Todos los demás géneros identificados están relacionadas a la producción de etanol.

El género más abundante de bacteria en las dos muestras fue *Lactococcus* el cual está muy relacionado evolutivamente al género *Streptococcus* (Schleifer, y otros, 1986). En el estudio de Siezen, R et al. compararon los genomas de 5 linajes de *Lactococcus lactis* y demostraron que solo el 60% de sus genes son compartidos, los demás, pertenecen a genes accesorios que codifican para genes de interés industrial como producción de exopolisacáridos, azúcares y metabolismo de aminoácidos (Siezen, Starrenburg, Boekhorst, & Renckens, 2008). Además, se identificaron genes relacionados a la degradación de polímeros complejos de las paredes celulares de las plantas, comprobando su adaptación para crecer en plantas (Siezen, Starrenburg, Boekhorst, & Renckens, 2008). La investigación de los linajes de *Lactococcus sp.* presentes en los agaves del territorio ecuatoriano podrían aclarar su relación evolutiva con linajes usados industrialmente en otros países.

En Pich-19, *Z. mobilis* es la segunda bacteria más abundante, se caracteriza por ser ácido tolerante, fermentadora de azúcares por la vía Enter-Doudoroff (Escalante, Rodriguez, Martinez,

Lopez, & Bolivar, 2004), capaz de crecer en presencia de etanol y en altas cantidades de azúcar (Balón, 2009). También ha sido descrita durante la fermentación de bebidas tradicionales provenientes del *Agave* (Herrera, Lappe, & Wachter, s.f). Se la consideraba como no deseable en bebidas como la cerveza o el vino, sin embargo, existe evidencia del mayor potencial de producción de etanol que *S. cerevisiae*, en bebidas como la sidra o la kombucha (Marsh, Sullivan, Hill, Ross, & Cotter, 2013). *Z. mobilis* tuvo menor abundancia en COT-5, lo cual indica que su presencia puede variar por factores como la variedad del agave, ubicación o tiempo de fermentación. Para clarificar la relación de *Z. mobilis* en el Agave en zonas ecuatorianas se deben realizar estudios con mayor número de muestras.

Se identificó un género BAA: *Acetobacter* sp. El cual crece preferiblemente en presencia de etanol y es capaz de sobrevivir durante todas las etapas de fermentación, generalmente sus conteos aumentan en tiempos finales (Pothakos, Illegghems, Laureys, & Spitaels, 2016). Por otro lado, el género *Acinetobacter*, aerobio estricto, se ha relacionado con producción de ácido acético y ha sido descrito en el pulque, más aún cuando el azúcar aún está elevado (Chacon-Vargas, Torres, Giles-Gomez, Escalante, & Gibbons, 2020). La presencia de ambos géneros en ciertos alimentos está relacionada con mayor rapidez en el deterioro del alimento, por esto, su control es necesario (Kamper, 2014) .

Los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* son considerados probióticos (Parra, 2010). Debido a la capacidad de *Leuconostoc mesenteroides* a sobrevivir a las condiciones gastrointestinales (Rodriguez, Hernandez, & Yañez, 2015). Están relacionados con la inhibición de patógenos intestinales como *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella* sp. en los alimentos fermentados (Ayala, y otros, 2018). Más aún, estos géneros utilizan la inulina, polisacárido que se encuentra en verduras y frutas (Madrigal & Sangronis, 2007). Se ha reconocido al *Agave tequilana* por su alta

cantidad de inulina, permitiendo el crecimiento de especies con potencial probiótico (Rodríguez, Hernández, & Yañez, 2015). También, se han mencionado posibles beneficios del género *Lactococcus* por la producción de nisina, una bacteriocina, capaz de inhibir crecimiento de patógenos intestinales (Villarreal, y otros, 2019). Cabe mencionar que estos géneros se relacionan a la producción de exopolisacáridos responsables de la viscosidad notoria del Chaguar mishqui (Cervantes & Pedroza, 2007).

Aunque el Chaguar mishqui podría tener efectos probióticos debido a su microbiota, su recolección y procesos de fermentación están relacionados a condiciones no asépticas (Figueroa & Sosa, 2015). Durante este estudio se identificaron 4 especies de Enterobacterias, las cuales son indicadores de contaminación ambiental y/o intestinal. *Hafnia alvei* bacteria de la microbiota gastrointestinal de mamíferos, insectos y aves ha sido descrita como contaminante de alimentos (Ridel, 1999). *Kluyvera ascorbata* y *Enterobacter ludwigii* han sido aisladas de plantas, tierra, agua y están relacionadas a trastornos intestinales, gastroenteritis y deterioro de alimentos (Cooney & Fanning, 2011).

La microbiota presente en la fermentación del Chaguar mishqui puede depender de la localización, condiciones ambientales o variedad del *Agave*, manipulación humana y falta de buenas prácticas que garanticen la inocuidad del producto (Figueroa M. , 2015). La falta de estándares de calidad dificulta la comercialización del Chaguar mishqui sin tratamientos térmicos previos. Es por esto, que la caracterización de la microbiota fermentativa es una herramienta para una futura selección de los microorganismos deseados con el fin de lograr una proceso controlado.

CONCLUSIONES

En la presente investigación se detalla la microbiota encontrada en dos muestras de aguamiel, la cual está representada por *Kluyveromyces marxianus* y bacterias BAL, en especial, *Lactococcus sp.*, *Lactobacillus sp.* y *Leuconostoc sp.*, todas ellas descritas anteriormente en estudios relacionados a bebidas provenientes del Agave. La presencia de *Zymomonas sp.* podría estar relacionada a la capacidad de alta producción de etanol en el aguamiel.

La presencia de Enterobacterias en ambas muestras son indicadores de falta de estándares de calidad e inocuidad durante el proceso de fermentación de la savia, lo que advierte que su consumo directo puede ser un riesgo para la salud y se requiere mejorar los procesos de obtención

Finalmente, el presente estudio constituye un aporte general al estudio metagenómico de la microbiota encontrada en el aguamiel del *Agave americana L.* Sin embargo, más estudios son necesarios para obtener información estadísticamente confiable.

TABLAS

Tabla 1. Especies encontrada en el análisis 18S rRNA Se muestra las especies identificadas en ambas muestras y sus porcentajes de abundancia a partir del número de lecturas obtenidas para cada microorganismo vs. el número de lecturas totales

Hongo	Porcentaje	
	Pich-19	Cot-5
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99.66	48.84
<i>Brettanomyces anomalus</i>	-	10.62
<i>Candida ethanolica</i>	0.27	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	33.65
<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	-	6.51
<i>Pichia manshurica</i>	-	0.35

Tabla 2. Especies encontradas en el análisis 16S rRNA Se muestra las especies identificadas en ambas muestras y sus porcentajes de abundancia a partir del número de lecturas obtenidas para cada microorganismo vs el número de lecturas totales

Bacteria	Porcentaje	
	Pich-19	Cot-5
<i>Lactococcus plantarum</i> *	74.23	48.98
<i>Lacococcus lactis</i> *	-	1.16
<i>Zymomonas mobilis</i>	0.31	22.05
<i>Leuconostoc fallax</i> *	-	8.01
<i>Leuconostoc Kiimchi</i> *	-	0.39
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> *	1.95	0.45
<i>Leuconostoc citreum</i> *	2.35	1.37
<i>Weisella beninensis</i> *	6.08	0.27
<i>Lactobacillus gallinarum</i> *	0.02	6.18
<i>Lactobacillus pasteurii</i> *	-	0.20
<i>Lactobacillus sucicola</i> *	0.43	0.62
<i>Lactobacillus plantarum</i> *	-	0.12
<i>Lactobacillus kefir</i> *	-	0.12
<i>Lactobacillus paracollinoides</i> *	-	1.16
<i>Lactobacillus vespulae</i> *	-	0.19
<i>Fructobacillus fructosus</i> *	-	0.55
<i>Kluyvera ascorbata</i>	2.11	-
<i>Enterobacter ludwigii</i>	1.23	-
<i>Hafnia alvei</i>	-	0.19
<i>Lelliottia nimispressuralis</i>	1.65	-

FIGURAS

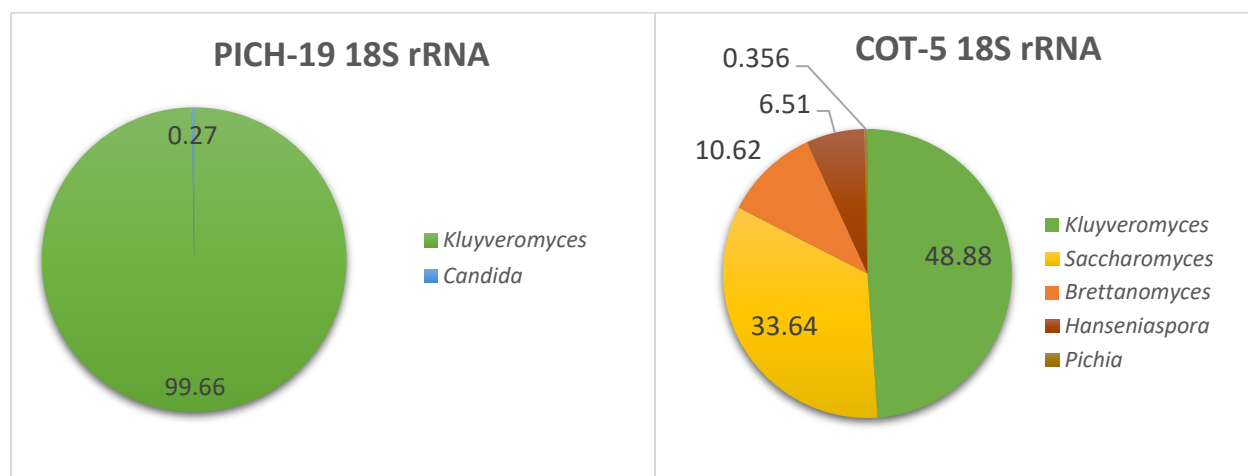


Figura 1. Géneros encontrados en PICH-19 y COT-5 18S rRNA. Se muestran los porcentajes de abundancia de los géneros identificados en la muestra PICH-19 y COT-5, basados del número de lecturas obtenidas para cada microorganismo vs. los lecturas totales

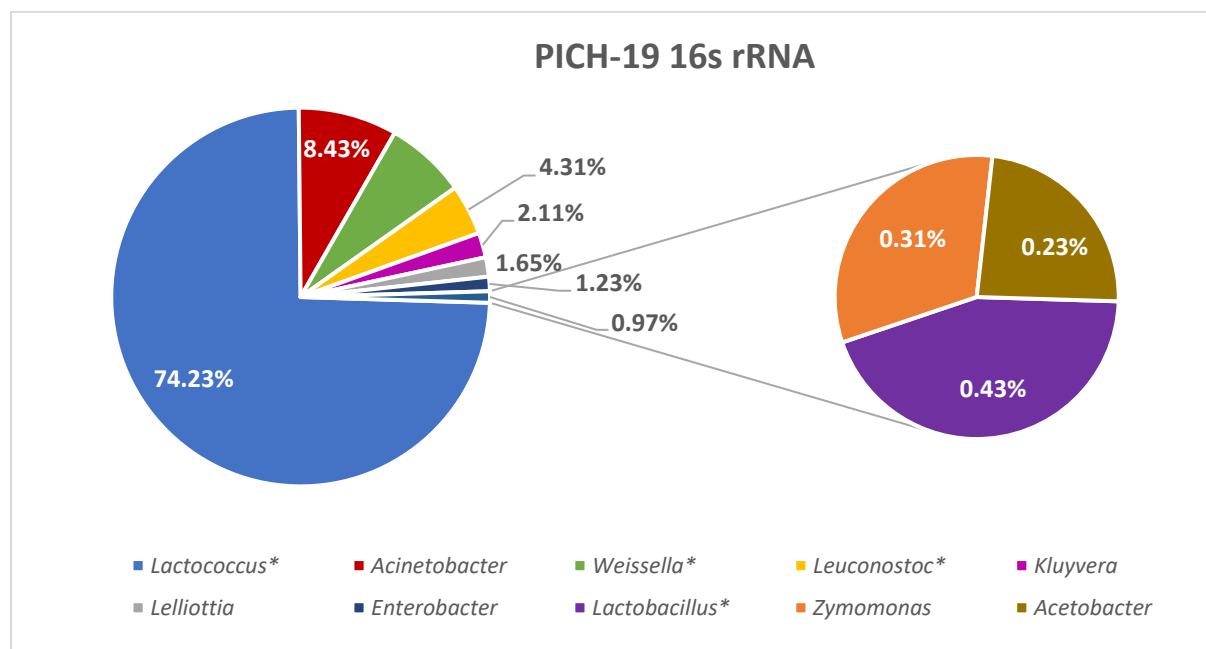


Figura 2. Géneros encontrados en PICH-19 16S rRNA. Se muestran los porcentajes de abundancia basados en el número de lecturas obtenidos para cada microorganismo vs los lecturas totales de la muestra PICH-19. Aquellos géneros con * son pertenecientes al grupo de BAL.

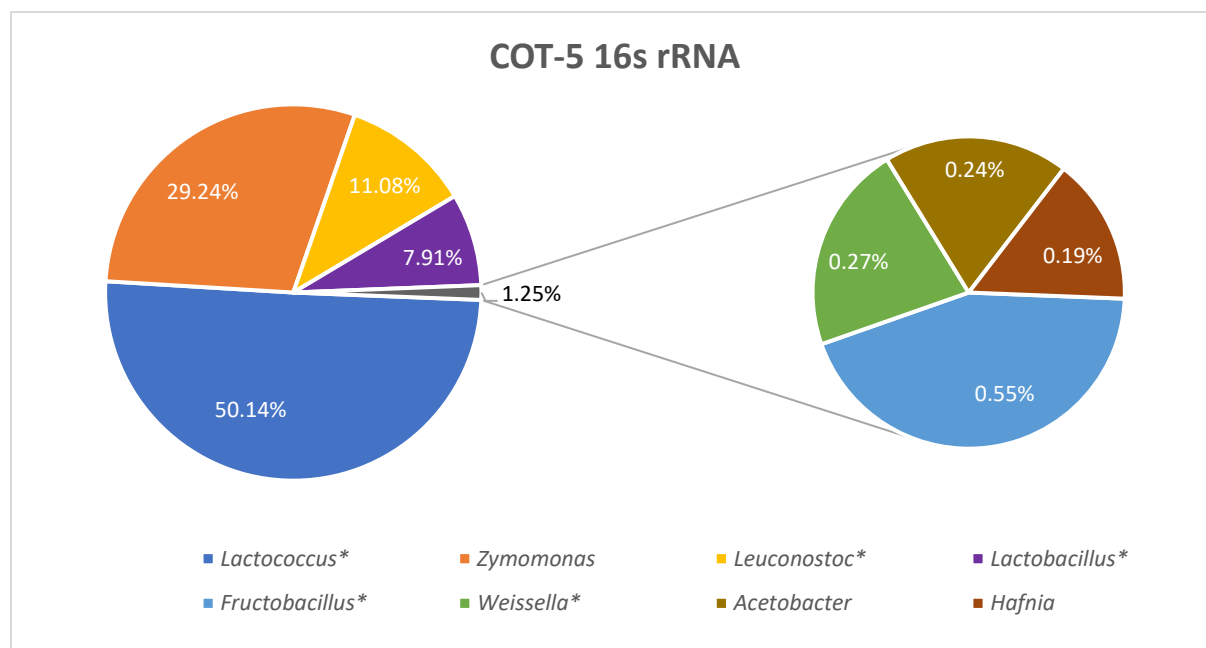


Figura 3. Géneros encontrados en COT-5 16S rRNA. Se muestran los porcentajes de abundancia basados en el número de lecturas obtenidos para cada microorganismo vs las lecturas totales de la muestra COT-5. Aquellos géneros con * son pertenecientes al grupo de BAL.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allauca, R. (2010). *Diversificación del uso del chaguarmishqui en la gastronomía del cantón guano*. Riobamba: Escuela Superior Politecnica de Chimborazo.
- Ayala, M., Hernandez, David, Gonzales, S., Jose, B., Hernandez, O., & Torres, N. (2018). *Prebiotic effect of two sources of inulin on in vitro growth of Lactobacillus*. Mexico: Universidad Autonoma de Guerrero.
- Ayora, D., & Quito, K. (2013). *Procesos de extraccion del mishqui y elaboraci[on del chaguarmishqui en ñamarin, provincia del Azuay. Propuesta de nuevos usos gastronómicos y bebidas*. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Balón, F. (2009). *Aprovechamiento de efluentes agroindustriales ricos en aguas almidonosas para la obtención de bioetanol mediante el uso de Zymomonas mobilis*. México: Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro.
- Cervantes, M., & Pedroza, A. (2007). *El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman*. Mexico: Pontifica Universidad Javeriana.
- Chacon-Vargas, K., Torres, J., Giles-Gomez, M., Escalante, A., & Gibbons, J. (2020). *Genomic profiling of bacterial and fungal communities and their predictive functionality during pulque fermentation by whole-genomeshotgun sequencing*. Nature research.
- Ciani, M., & Mannazzu I, D. (2018). *Microbiota of fermented Beverages*. MDPI editorial.
- Cooney, S., & Fanning, S. (2014). *Kluyvera Species*. Encyclopedia of Food Safety.

- De Filippis, F., Parente, E., & Ercolini, D. (2016). *Metagenomics insights into food fermentations*. Microbial Biotechnology.
- De Fillippis, F., Parente, E., & Ercolini, D. (2016). *Metagenomics insights into food fermentations*. Microbial Biotechnology.
- De Rosse, J., & De Vuyst, L. (s.f.). *Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages*.
- De Vuyst, L., & Weckcx, S. (2015). *The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development*. Bélgica: Journal of Applied Microbiology.
- Escalante, A., Rodriguez, M., Martinez, A., Lopez, A., & Bolivar, F. (2004). *Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis*. Mexico: FEMS Microbiology Letters.
- Figueroa, M., & Sosa, E. (2015). *Caracterización microbiológica y química de la savia de Agave americana L. (cabuya negra) de ecotipos de las provincias de Pichincha y Cotopaxi*. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Flores, C. (2016). *ALTERNATIVAS EN EL USO DEL CHAGUAR MISHQUI COMO ENDULZANTE*. Ambato: Universidad Regional Autónoma de los Andes.
- Herrera, M., Lappe, P., & Wachter, C. (s.f). *IDENTIFICACIÓN POLIFÁSICA DE LEVADURAS Y BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS*. Tijuana: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Kamper, P. (2014). *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. *Acinetobacter*. Germany: Elsevier.
- Madrigal, L., & Sangronis, E. (2007). *La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales*. Caracas: Archivos LATinoamericanos de Nutricion.

- Marsh, A., Sullivan, O., Hill, C., Ross, P., & Cotter, P. (2013). *Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources*. FEMS Microbiology Letters.
- Parra, R. (2010). *Review. Lactic Acid Bacteria: Functional role in the foods*. Universidad Nacional de Colombia.
- Pothakos, V., Illegheems, K., Laureys, D., & Spitaels, F. (2016). *Acetic Acid Bacteria in Fermented Food and Beverage Ecosystems*. Tokyo: Springer.
- Quishpe, T. (24 de julio de 2020). Sobre como iniciamos Mishky Huarmy. (G. Bonifaz, Entrevistador)
- Ridel, J. (1999). *Encyclopedia of food Microbiology. Hafnia Alvei*. Elsevier.
- Rodriguez, D., Hernandez, H., & Yañez, J. (2015). *Probiotic Properties of Leuconostoc mesenteroides Isolated from Aguamiel of Agave salmiana*. Probiotics and Antimicrobial Proteins.
- Schleifer, K., Kraus, J., Dvorak, C., Balz, K., Collins, M., & Fischer, W. (1986). *Transfer of Streptococcus lactis and Related Streptococci to the Genus Lactococcus gen. nov.* Germany: System. Appl. Microbiology.
- Siezen, R., Starrenburg, M., Boekhorst, J., & Renckens, J. (2008). *Genome-Scale Genotype-Phenotype Matching of Two Lactococcus lactis Isolates from Plants Identifies Mechanisms of Adaptation to the Plant Niche*. Appl Environ Microbiology.
- Teamazonas. (26 de Agosto de 2019). *Día a Día*. Obtenido de el agave: <https://www.youtube.com/watch?v=WV-af9M-1y0>

Villarreal, S., Enriquez, M., Michel, M., Flores, A., Montañez, J., Aguilar, C., & Rodriguez, R. (2019). *Metagenomic Microbial Diversity in Aguamiel from two Agave Species during 4-year Seasons*. Food Biotechnology.

ANEXO 1: CONDICIONES DE PCR**In 20 ul reaction system**

5×FastPfu Buffer4 µl
2.5 mM dNTPs.....2 µl
Forward Primer(5 µM)..... 0.8µl
Reverse Primer(5 µM) 0.8µl
FastPfu Polymerase.....0.4 µl
Template DNA10ng

Reaction condition

- a. 95°C 5 min**
- b. 95°C 30 sec**
55°C 30 sec
72°C 45 sec
27 cycles
- c. 72°C 10 min**
- d. 10°C until halted by user**