

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias e Ingeniería

**Caracterización microbiológica y química de la savia de *Agave americana*
L. (cabuya negra) de ecotipos de las provincias de Pichincha y Cotopaxi**

**María Andrea Figueroa Moncayo
Estefanía Alejandra Sosa Sosa**

**Lucía Ramírez Cárdenas, Ph.D., Directora de Tesis
David Egas, Ph.D., Codirector de Tesis**

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de
Ingeniera en Alimentos

Quito, mayo de 2015

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias e Ingeniería

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Caracterización microbiológica y química de la savia de *Agave americana*
L. (cabuya negra) de ecotipos de las provincias de Pichincha y Cotopaxi**

Andrea Figueroa

Estefanía Sosa

Lucía Ramírez, Ph.D.,
Directora de Tesis

David Egas, Ph.D.,
Co-director de Tesis

Javier Garrido, M.Sc.,
Director de Ingeniería
en Alimentos y
Miembro del Comité de Tesis

Sonia Zapata, Ph.D.,
Miembro del Comité de Tesis

Michael Koziol, Ph.D.,
Miembro del Comité de Tesis

Ximena Córdova, Ph.D.,
Decana de la Escuela
de Ingeniería
Colegio de Ciencias e Ingeniería

Quito, mayo de 2015

© DERECHOS DE AUTOR

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

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma: -----

Nombre: Estefanía Alejandra Sosa Sosa

C. I.: 171743064-7

Firma: -----

Nombre: María Andrea Figueroa Moncayo

C. I.: 110476071-3

Fecha: Quito, mayo de 2015

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar un profundo agradecimiento a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este trabajo de investigación.

A mis padres, María Rosa y Guido, por su amor, su esfuerzo, su apoyo incondicional, su sabia orientación y estímulo constante.

A mi novio, Moshe Jiménez, por su afecto, su predisposición y ayuda sincera e incondicional, por su compañía en los buenos y malos momentos, por haberme dedicado su tiempo y esfuerzo para el desarrollo de esta tesis.

A la Universidad San Francisco de Quito, sus directivos y docentes por haberme brindado la oportunidad de enriquecer mi vida personal y profesional.

En especial a Lucía Ramírez, Directora de Tesis, a David Egas, Codirector, a Sonia Zapata y su equipo de trabajo: Gabriela Vasco, Juan Mosquera y Cristina Chávez, a Javier Garrido, Carlos Fabara, Mario Caviedes, Carolina Andino, y Andrea Torres, a cada uno de ellos, por haberme brindado esa orientación profesional de alto nivel, la ayuda oportuna y la calidad humana demostradas a lo largo de este trabajo de investigación.

A la señora Helena Ronquillo y al señor Luis Paucar por facilitar sus sembríos y compartir sus conocimientos para que sea posible la realización de este estudio.

A César Zambrano por su colaboración.

A Pedro Romero por su valioso aporte.

A Andrea Figueroa, mi amiga y compañera de tesis, por su constancia y dedicación.

Estefanía Alejandra Sosa Sosa

Agradezco a mis padres Luis Figueroa y Andrea Moncayo por apoyarme incondicionalmente, alentándome a seguir adelante a pesar de los problemas y dificultades. A mis hermanas Diana y Claudia por estar a mi lado siempre. Mi novio Roberth Vaca quien ha estado conmigo en los momentos difíciles, brindándome toda la ayuda posible desde el inicio hasta el final de la tesis. A Estefania Sosa con quien he compartido no solo el aula de clase sino una gran amistad.

Imposible olvidar a las personas que nos ayudaron con su tiempo, consejos, conocimientos y recomendaciones a lo largo de la elaboración del presente proyecto investigativo, Lucia Ramírez, David Egas, Sonia Zapata, Javier Garrido, Carlos Fabara, Mario Caviedes, Gabriela Vasco, Carolina Andino, Juan Mosquera, Cristina Chavez y Andrea Torres.

Finalmente, quiero agradecer a Luis Paucar y Elena Ronquillo por ayudarnos en el manejo y cosecha de las plantas de Agave, ya que sin su ayuda no hubiera sido posible obtener la materia prima para realizar este proyecto.

María Andrea Figueroa Moncayo

RESUMEN

La savia del *Agave americana* L. es una bebida conocida popularmente como “aguamiel” o “Chawar mishki” que se extrae de la base de pencos maduros. El objetivo de este estudio fue realizar análisis microbiológicos y químicos que incluyeron la identificación molecular (secuenciación del ADNr 16S) de las bacterias ácido lácticas asociadas a la savia del Agave y la cuantificación de calcio, magnesio y carbohidratos totales. Las muestras fueron recolectadas en las provincias ecuatorianas de Pichincha y Cotopaxi. *Leuconostoc mesenteroides* fue la bacteria ácido láctica predominante en las muestras provenientes de las dos provincias y se le atribuye propiedades probióticas. Aparte, la presencia de *E. coli* en una de las muestras de Cotopaxi, demuestra que la ingesta de esta bebida sin tratamiento térmico representa un riesgo para la salud de los consumidores. Se detectaron minerales y carbohidratos; sin embargo, las muestras de savia analizadas no representaron una fuente significativa de calcio ni de magnesio. En relación a un tamaño de porción de 240 mL para una dieta de 2000 kcal, se encontraron, en la savia del *Agave americana* L., porcentajes del Valor Diario Recomendado de 0.25 a 0.29% para calcio, entre 1.59 y 1.77% con respecto al magnesio y un 13.14% para carbohidratos. Desde el punto de vista microbiológico, las muestras recolectadas en la provincia de Pichincha fueron de mejor calidad que las de Cotopaxi. Al parecer, *Leuconostoc mesenteroides* es responsable de la rápida fermentación de la bebida. La savia del *Agave americana* L. podría ser considerada fuente de probióticos si se ingiere sin tratamiento térmico. A pesar de que existe la creencia de que el “aguamiel” ayuda a combatir enfermedades como la osteoporosis, el contenido de calcio detectado en el producto fue demasiado bajo.

ABSTRACT

The sap of *Agave americana* L. is a drink popularly known as "aguamiel" or "Chawar mishki" extracted from the base of mature Agave plants. The aim of this study was to do microbiological and chemical analysis that included the molecular identification (16S rDNA sequencing) of the lactic acid bacteria associated to Agave sap and the quantification of calcium, magnesium and total carbohydrates. The samples were collected in the Ecuadorian provinces of Pichincha and Cotopaxi. *Leuconostoc mesenteroides* was the predominant lactic acid bacteria in samples from the two provinces and it has been proposed to possess probiotic properties. Besides, the presence of *E. coli* in a sample of Cotopaxi, shows that consumption of this beverage without heat treatment represents a risk to consumer health. Minerals and carbohydrates were detected; however, the analyzed sap samples did not represent a significant source of calcium or magnesium. In relation to a serving size of 240 mL for a diet of 2000 kcal, they were found, in the sap of *Agave americana* L., percentages of daily value from 0.25 to 0.29% for calcium, between 1.59 and 1.77% for magnesium and 13.14% for carbohydrates. From a microbiological point of view, the samples collected in the province of Pichincha were of better quality than those of Cotopaxi. It seems, *Leuconostoc mesenteroides* is responsible for the rapid fermentation of the beverage. The sap of *Agave americana* L. could be considered a source of probiotics if it is ingested without heat treatment. Although there is a belief that "aguamiel" helps to fight illnesses like osteoporosis, the calcium content detected in the product was too low.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	15
Justificación	18
Objetivos	20
General.	20
Específicos.	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Materiales	21
Materiales de extracción.....	21
Métodos.....	22
Recolección de muestras para los análisis químicos.....	22
Recolección de muestras para los análisis microbiológicos.....	22
Análisis microbiológicos.....	24
Presencia de Coliformes y Escherichia coli.	24
Presencia de mohos y levaduras.	24
Identificación de Mohos.	24
Identificación de levaduras.....	25
Aislamiento de bacterias ácido lácticas.	25
Identificación fenotípica de bacterias ácido lácticas.	25
Conservación de cepas aisladas.....	27
Extracción de ADN.	27
Amplificación del ADNr 16S.....	28

	10
Electroforesis de ADN.....	29
Secuenciación del ADN.....	29
Análisis químicos.	29
Determinación de calcio y magnesio.....	29
Determinación de carbohidratos totales.	30
Diseño experimental (caracterización química).....	30
Análisis estadístico.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
Análisis microbiológicos de la savia de <i>Agave americana</i> L.....	32
Presencia de Coliformes y <i>Escherichia coli</i>	32
Presencia de mohos y levaduras.....	33
Identificación molecular de bacterias ácido lácticas.	34
Análisis químicos de la savia de <i>Agave americana</i> L.	43
CONCLUSIONES	50
RECOMENDACIONES	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO A Detalle de las actividades realizadas para la caracterización microbiológica de la savia de <i>Agave americana</i> L.	59
ANEXO B Presencia de Coliformes y <i>Escherichia coli</i> en la savia de <i>Agave americana</i> L. recolectada en la provincia de Cotopaxi y Pichincha.	63
ANEXO C Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en el medio de cultivo Chromocult de la muestra tomada de la planta 5 en la mañana y en la provincia de Cotopaxi.	63

ANEXO D Mohos identificados al microscopio en las muestras de Cotopaxi y Pichincha	64
ANEXO E <i>Penicillium</i> observado al microscopio de campo claro 40x.....	64
ANEXO F Resultado API® Candida de la muestra recolectada de la planta 1 en la mañana en Cotopaxi.....	65
ANEXO G Resultados API® Candida de la muestra recolectada de la planta 4 en la mañana en Cotopaxi.....	65
ANEXO H Resultados API® Candida de la muestra recolectada de la planta 2 en la tarde en Pichincha	65
ANEXO I Bacterias ácido lácticas aisladas en medio MRS, asociadas a la savia de <i>Agave americana</i> L., recolectada en la provincia de Cotopaxi a las 9:00 am.....	66
ANEXO J Bacterias ácido lácticas aisladas en medio MRS, asociadas a la savia de <i>Agave americana</i> L., recolectado en la provincia de Cotopaxi a las 2:00 pm.....	66
ANEXO K Bacterias ácido lácticas aisladas en el medio MRS, asociadas a la savia de <i>Agave americana</i> L., recolectado en la provincia de Pichincha a las 9:00 AM.	67
ANEXO L Bacterias ácido lácticas aisladas en el medio MRS, asociadas a la savia de <i>Agave americana</i> L., recolectado en la provincia de Pichincha a las 2:00 pm.	67
ANEXO M PCR de ADNr 16S	68
ANEXO N PCR de ADNr 16S	68
ANEXO O PCR de ADNr 16S.....	69
ANEXO P Análisis de la varianza (ANOVA) del contenido de calcio de los tratamientos	69

ANEXO Q Análisis de la varianza (ANOVA) del contenido de magnesio de los tratamientos	70
ANEXO R Análisis de la varianza (ANOVA) del contenido de carbohidratos de los tratamientos	70

TABLAS

Tabla 1 Detalle de las muestras empleadas para los análisis microbiológicos.....	23
Tabla 2 Reactivos y concentraciones utilizadas para PCR de ADNr 16S	28
Tabla 3 Condiciones PCR adoptadas en la amplificación del ADNr 16S	28
Tabla 4 Resumen del diseño experimental	31
Tabla 5 Bacterias ácido lácticas identificadas en plantas de <i>Agave americana</i> L. de la provincia de Cotopaxi a dos horas de recolección	35
Tabla 6 Bacterias ácido lácticas identificadas en plantas de <i>Agave americana</i> L. de la provincia de Pichincha a dos horas de recolección.....	36
Tabla 7 Resumen del Análisis de Varianza (ANOVA) de calcio, magnesio y carbohidratos totales de los tratamientos.....	43
Tabla 8 Contenido de calcio (mg/mL) de los tratamientos	44
Tabla 9 Contenido de magnesio (mg/mL) de los tratamientos.....	45
Tabla 10 Contenido de carbohidratos totales (mg/mL) de los tratamientos.....	46
Tabla 11 Comparación del contenido de minerales y carbohidratos presentes en la savia de <i>Agave americana</i> L. de Ecuador y Perú	48
Tabla 12 Porcentaje del Valor Diario Recomendado para calcio, magnesio y carbohidratos presentes en la savia de <i>Agave americana</i> L.	49

FIGURAS

Figura 1 Frecuencia de las bacterias ácido lácticas identificadas por provincia..... 37

INTRODUCCIÓN

El “aguamiel”, “Chawar mishki” o savia segregada por la planta de Agave, es extraída de la base de pencos maduros y ha sido una bebida valorada por varias comunidades indígenas debido sus aparentes cualidades tanto preventivas como curativas, llegando a ser considerada milagrosa (Segura, 2006; Ministerio de Educación Ecuador, 2009).

El extracto del *Agave americana* Linn o *Agave americana* L., planta a la que también se conoce como cabuya negra o penco, ha sido utilizado ancestralmente para varios propósitos: medicinales, como bebida refrescante, alimento nutritivo e incluso como bebida alcohólica, arraigándose en las culturas sobre todo andinas y ha estado presente en sus fiestas, rituales; en general, en la vida cotidiana (Segura, 2006).

El *Agave americana* L. es una planta que pertenece al género *Agave*, de la familia *Agavaceae* del orden *Asparagales*, clase *Liliopsida*, filo *Magnophyta*, del reino *Plantae* (Jurado, Sarzosa, 2009). Los pencos son plantas xerófitas, es decir, están adaptadas a vivir largos periodos de sequía y altas temperaturas; crecen a la intemperie en zonas áridas y semiáridas, características que han sido aprovechadas por los comuneros, que utilizan a esta planta como una cerca natural para dividir los terrenos o parcelas (García, 2007).

La cabuya negra, tiene un tronco ancho y carnoso que sale directamente de la raíz, donde se encuentra el llamado “corazón de la planta”, parte que hay que intervenir para obtener su savia; de este tronco se desprenden largas hojas que pueden llegar a medir treinta centímetros de ancho y dos metros de largo con una terminación puntiaguda en el extremo, en la que se puede observar grandes espinas que sirven a la planta de protección contra depredadores (Sampedro, 2009). El Agave se puede reproducir de forma sexual o

asexual. La primera mediante semillas que se forman en el tronco de la planta una vez alcanzada la madurez, la segunda mediante bulbillos, generados en los pedúnculos florales, en el tallo o entre las hojas; estos brotes vegetativos son plantas en miniatura que caen al suelo y comienzan la vida de una nueva planta; también se propagan mediante hijuelos, que nacen de los rizomas de la planta madre (Jurado, Sarzosa, 2009).

Para empezar con el proceso de obtención del “Chawar mishki” se debe tomar en cuenta las siguientes consideraciones principales: la planta de Agave debe tener una edad de entre diez a quince años, es decir cuando la planta llega a la etapa de maduración, se debe realizar el proceso antes del crecimiento del tallo floral. Si la savia no es extraída, el penco a partir de su tronco principal empieza a desarrollar, poco a poco, un largo tronco delgado y leñoso que puede llegar a medir diez metros de altura, de éste se desprenden, en la parte superior, ramas en las que crecen flores y frutos (Bautista, 2006).

Una vez que el penco ha alcanzado su madurez, está listo para ser cosechado, el proceso varía dependiendo de la comunidad. Empieza cuando el agricultor observa que el tronco de la planta está lo suficientemente maduro, es decir con el tamaño adecuado que demuestre estar lleno de savia. A continuación, se le realiza una hendidura, de tal manera que se forme un pequeño pozo del tamaño aproximado de un plato sopero (Romero, 2010). Se espera alrededor de cinco horas entre cada recolección, la primera se puede hacer en las primeras horas de la mañana, este producto va a tener un líquido espumoso, lechoso similar a la nata flotando, debido al tiempo que ha pasado desde la última recolección, se retira este residuo y con una pequeña taza se recolecta el jugo que produjo el tronco del Agave, a estas horas este exudado es un tanto ácido, debido al contenido de azúcar y a la acción de las levaduras (Bautista, 2001). Cuando termina la recolección, con una cuchara se raspa un poco la superficie del fondo del pozo, ya que según la explicación de la gente

dedicada a la explotación de la cabuya negra, la idea es lastimar a la planta para que siga produciendo savia; posteriormente se tapa con las hojas del mismo penco o piedras para evitar, en lo posible, que la hendidura se llene de insectos u objetos extraños (L. Paucar, entrevista personal, 19 de junio de 2013).

Al mediodía se realiza el mismo proceso de extracción de la savia; el sabor esta vez es más dulce que el de la savia de la mañana, ya que ha pasado menos horas dentro del penco. Si la planta está produciendo gran cantidad de “aguamiel” se puede realizar otra recolección al final de la tarde. Diariamente una planta de cabuya negra puede producir de dos a cuatro litros, dependiendo del ciclo en el que se encuentre una vez realizado el orificio de extracción (Romero, 2010). El penco unos dos o tres meses después de iniciado el proceso de recolección se seca y muere, pero deja rizomas, con los que nueve años después el recolector puede iniciar nuevamente el proceso y comercializar su producto.

Algunos productores agrícolas extraen y venden el “aguamiel” crudo, otros hacen un segundo paso en el que pasteurizan el producto y hay quienes incluso llegan a añadir cebada u otros ingredientes para agregarle sabor. En la ciudad de Quito, especialmente en sus parroquias aledañas, se pueden encontrar pequeños puestos de comerciantes del “aguamiel”, quienes se plantean dos jornadas de recolección, la primera en la mañana y la segunda al mediodía, dependiendo de qué tan cargada de la bebida esté la planta se puede plantear una tercera recolección en la tarde.

Justificación

Si bien, en el Ecuador, el consumo de la savia azucarada de la cabuya conocida como “aguamiel” o “Chawar mishki” se da desde tiempos ancestrales; no obstante, su explotación es muy local y restringida, y son pocas las personas que conocen esta bebida. Actualmente, su consumo es cada vez más difundido y el interés que existe sobre su verdadera calidad nutricional y microbiológica es aún mayor, existiendo exigencias radicales con relación al sistema de gestión de calidad e inocuidad alimentaria.

La comunidad indígena es la principal consumidora y comercializadora del “aguamiel”; así como también, la conocedora de sus técnicas de extracción, y la que le atribuye varias propiedades medicinales al producto; sin embargo, se trata de una bebida que, muchas veces, se consume cruda, además sus métodos de extracción difieren de una comunidad a otra y, en el contexto ecuatoriano, no existen suficientes bases teórico científicas que sustenten propiedades beneficiosas y garanticen la inocuidad del producto. A nivel de Ecuador son contados los estudios realizados sobre el “aguamiel” (Bautista, 2006; Jurado, Sarzosa, 2009; Sampedro, 2009), que es extraído mediante técnicas artesanales y se comercializa, en su gran mayoría, sin etiqueta nutricional ni registro sanitario como un alimento funcional que ayuda a prevenir enfermedades como osteoporosis, estreñimiento, gripe; e incluso se le atribuyen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. El presente estudio se basó en la cuantificación de compuestos bioactivos como calcio y magnesio y macronutrientes como carbohidratos en la savia de *Agave americana* L., así como también, en la identificación de los microorganismos asociados a la fermentación de esta bebida, con la finalidad de analizar los riesgos y/o beneficios que podría tener para la salud de los consumidores.

Algunos son los productos alimenticios que se obtienen a partir del “aguamiel” y son comercializados por comunidades indígenas del Ecuador: miel de cabuya, colada de cebada, tequila, tortillas de tiesto, bebidas fermentadas, caramelos, helados, vinagre. Con la información de este estudio, se podría modificar los procesos de obtención de los productos, de modo tal que se alargue la vida útil del producto, se conserve; en lo posible, las propiedades beneficiosas y de interés nutricional, y se elimine cualquier posible riesgo para la salud de los consumidores. Es así que, no solo los productores van a ser los beneficiarios, sino; también, los consumidores de “Chawar mishki”.

Objetivos

General.

Caracterizar la savia de *Agave americana* L., proveniente de diferentes ecotipos de las provincias ecuatorianas de Pichincha y Cotopaxi, por medio de análisis microbiológicos y químicos.

Específicos.

- Identificar a nivel molecular las bacterias ácido lácticas (BAL) asociadas a la savia del *Agave americana* L.
- Determinar la calidad microbiológica del “Chawar mishki” de dos provincias y jornadas de recolección.
- Cuantificar, mediante análisis instrumental, el contenido de carbohidratos, calcio (Ca) y magnesio (Mg) presentes en la savia de *Agave americana* L. (“Chawar-mishki”).
- Comprobar si existe variación en el contenido de nutrientes de la savia de *Agave americana* L. según el ecotipo, la jornada y el ciclo de recolección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

- Savia de *Agave americana* L. recolectada en las provincias de Pichincha (en la comunidad ancestral “La Toglla”, ubicada en el cerro Ilaló de la parroquia Guangopolo, zona “Murucucho”, cantón Quito, con la colaboración del señor Luis Paucar) y en Cotopaxi (en la propiedad de la señora Elena Ronquillo, barrio Sarapamba, ubicado al noroccidente de la provincia de Cotopaxi, cantón Pujilí).

Materiales de extracción.

- Guantes
- Raspador
- Taza de plástico
- Cucharas estériles
- Colador
- Embudo
- Botellas de plástico ámbar estériles y rotuladas
- Botellas de vidrio estériles y rotuladas
- *Coolers*
- Refrigerantes

Métodos

Recolección de muestras para los análisis químicos.

Los ecotipos, cada una de las variedades de una especie que difiere en sus condiciones de vida o ambiente, que se manejaron en la presente investigación provienen de las provincias de Pichincha y Cotopaxi, donde se efectuó la recolección de las muestras de savia de *Agave americana* L. (Océano Uno, 2001). En cada lugar de estudio se manejaron dos ciclos de recolección, es decir, se extrajeron muestras por dos ocasiones, la primera se realizó un mes después de perforada la base del penco y la segunda a los dos meses. En cada ciclo se realizaron dos jornadas de recolección, a las nueve de la mañana y a las dos de la tarde. Se trabajó con cinco plantas de *Agave* por provincia, que fueron consideradas repeticiones en el diseño experimental.

El muestreo de la savia de *Agave Americana* L., fue efectuado de la misma manera en ambas provincias. El extracto de *Agave* de la jornada de las nueve de la mañana permaneció durante diecinueve horas en el interior de la planta, tiempo tomado desde la última recolección. En cambio, la savia extraída a las dos de la tarde, se mantuvo dentro del penco durante cinco horas, aproximadamente.

Recolección de muestras para los análisis microbiológicos.

La recolección de muestras de la savia de *Agave americana* L. para los análisis microbiológicos, fue efectuada días después de recolectadas las muestras para las determinaciones químicas. En cada provincia se manejaron dos jornadas, la primera a las nueve de la mañana y la segunda a las dos de la tarde. En Cotopaxi se trabajó con cinco plantas de *Agave*, mientras que en la provincia de Pichincha se manejaron cuatro. En cada jornada de recolección se tomó únicamente una muestra de cada penco, es decir, en total se recolectaron 18 muestras, 8 provenientes de Pichincha y 10 de Cotopaxi. Las

determinaciones se realizaron por duplicado. En la Tabla 1 se especifican los códigos y el origen de las muestras empleadas para los análisis microbiológicos.

Tabla 1 Detalle de las muestras empleadas para los análisis microbiológicos

Código muestra	Origen de la muestra			
	Bacteria	Planta	Hora de recolección	Provincia
C1A1	1	Penco 1	9:00 AM	Cotopaxi
C1A2	2			
C2A1	1	Penco 2		
C2A2	2			
C3A1	1	Penco 3		
C3A2	2			
C4A1	1	Penco 4		
C4A2	2			
C5A1	1	Penco 5		
C5A2	2			
C1P1	1	Penco 1	2:00 PM	Cotopaxi
C1P2	2			
C2P1	1	Penco 2		
C2P2	2			
C3P1	1	Penco 3		
C3P2	2			
C4P1	1	Penco 4		
C4P2	2			
C5P1	1	Penco 5		
C5P2	2			
P1A1	1	Penco 1	9:00 AM	Pichincha
P1A2	2			
P2A1	1	Penco 2		
P2A2	2			
P3A1	1	Penco 3		
P3A2	2			
P4A1	1	Penco 4		
P4A2	2			
P1P1	1	Penco 1	2:00 PM	Pichincha
P1P2	2			
P2P1	1	Penco 2		
P2P2	2			
P3P1	1	Penco 3		
P3P2	2			
P4P1	1	Penco 4		
P4P2	2			

La recolección fue realizada de la siguiente manera: tomando en consideración las máximas medidas higiénicas posibles (uso de guantes quirúrgicos, mascarrilla, materiales estériles) se retiraron las hojas que cubrían el orificio del penco, una vez despejado el orificio, se recogió la savia con una cuchara previamente esterilizada, y se colocó en un frasco estéril de vidrio. Se tapó el frasco, se rotuló y guardó en un *cooler* para su transporte refrigerado. Terminada la primera recolección, se raspó el orificio de la planta y cinco horas después se realizó la segunda recolección.

Análisis microbiológicos.

Presencia de Coliformes y Escherichia coli.

Con ayuda de un hisopo estéril se inoculó cada muestra en el medio de cultivo Chromocult selectivo para Enterobacterias y se realizó la técnica de estriación que consiste en diluir progresivamente el inóculo primario sobre la superficie del medio de cultivo para obtener colonias aisladas (Merck, 2000). Cada muestra se analizó por duplicado.

Presencia de mohos y levaduras.

Para determinar la presencia de hongos en las muestras, se empleó el medio de Sabouraud y se ensayó la técnica de estriación descrita anteriormente por duplicado (Merck, 2000).

Identificación de Mohos.

Se utilizó el método de la cinta scotch que consistió en tomar un pedazo de 2 centímetros de cinta scotch, la parte adhesiva se apoyó contra una colonia de hongos, luego se puso en una placa porta-objetos con una gota de colorante de azul de algodón. La observación se realizó al microscopio con objetivos 10X y 40X, y las estructuras observadas se compararon con un atlas de hongos ambientales (Zapata, 2012).

Identificación de levaduras.

Se identificó mediante la prueba bioquímica API® Candida. A partir de colonias de levadura lo más aisladas posible se preparó una suspensión en solución salina al 0.85% hasta llegar a una tonalidad McFarland 3. Se humedeció con agua destilada la cámara de incubación, cada microtubo de la galería API® Candida se llenó con la suspensión de levaduras evitando la formación de burbujas e inmediatamente se recubrió con aceite mineral a los cinco primeros y al último microtubo. Se selló la cámara y se incubó a 35°C por 24 horas. Los resultados de las reacciones se interpretaron en función de la tabla de lectura de la ficha técnica y la identificación se realizó por medio del *software apiweb*TM (bioMérieux® S.A., 2006).

Aislamiento de bacterias ácido lácticas.

Para determinar presencia de bacterias ácido lácticas en la savia de *Agave americana* L., se trabajó por duplicado con medios de cultivos específicos como: agar MRS, usado generalmente para determinar *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y M17 empleado en determinaciones de *Lactococcus* y *Streptococcus* lácticos. Para la siembra de estas bacterias no se usaron diluciones. Con un hisopo estéril se hizo un inóculo primario y con un asa de inoculación se realizó la técnica de estriado para obtener colonias aisladas. Los medios de cultivo fueron guardados en una atmósfera anaerobia a una temperatura de 35°C (Merck, 2000; Zapata, 2012).

Identificación fenotípica de bacterias ácido lácticas.

Para confirmar que las bacterias encontradas en MRS y M17 eran ácido lácticas se realizaron las siguientes pruebas:

Tinción Gram.- En un portaobjetos se puso una gota de solución salina donde se inoculó la bacteria de interés. La muestra se secó pasando el portaobjetos por la flama de

un mechero. Una vez que la muestra estuvo seca, se inició la tinción con cristal violeta, usado como colorante para teñir las membranas de las bacterias. A continuación, se aplicó lugol que actúa como mordiente, haciendo que el cristal violeta se fije con mayor intensidad a la pared de la célula. Luego se esparció sobre el portaobjetos alcohol-acetona como decolorante, las bacterias gram positivas no se decoloran, mientras que las gram negativas sí. Por último, se utilizó safranina como colorante de contraste, quedando los organismos gram negativos de color rojo y los gram positivos violetas. Una vez preparada la muestra se observó al microscopio con el lente objetivo de 100X (Zapata, 2012).

Catalasa.- Se usó peróxido de hidrógeno. Las bacterias gram positivas en contacto con este reactivo, producen oxígeno y liberan burbujas; en el caso de las gram negativas no se produce reacción alguna (Zapata, 2012).

La tinción Gram y la prueba de la catalasa fueron efectuadas en dos colonias de cada medio de cultivo, es decir, se observaron setenta y dos colonias de MRS y setenta y dos de M17.

Para el posterior análisis molecular de las bacterias ácido lácticas, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de ADN, se trabajó únicamente con las colonias de los medios MRS (Perera, 2002). Se seleccionaron dieciocho colonias de los medios MRS (los que no tenían crecimiento de levaduras), de éstos se escogieron dos colonias de cada medio, y se aislaron en nuevos MRS, es decir, se manejaron treinta y seis colonias en total, distribuidos de la siguiente manera: dieciséis en Pichincha, ocho del muestreo de la mañana y ocho de la tarde, y veinte en Cotopaxi, diez del muestreo de la mañana y diez de la tarde.

Conservación de cepas aisladas.

Las cepas seleccionadas fueron criogenizadas. Este proceso se realizó con cultivos jóvenes, es decir, después de aislar las colonias de interés, se dejó transcurrir 48 horas para proceder con la criogenización. Con un hisopo estéril se tomaron algunas colonias de bacterias que fueron suspendidas en 3 mL de caldo MRS (70% Agua - 30% glicerol), contenido en un tubo de criogenización. Las cepas fueron congeladas a -80°C (Perera, 2002).

Extracción de ADN.

Se utilizó dos métodos de extracción descritos a continuación:

Método de Lisis.- Las cepas seleccionadas fueron cultivadas en MRS. Con un hisopo esterilizado se tomaron 3 colonias de bacterias y se resuspendieron en 300 µL de agua destilada estéril contenida en tubos Eppendorf® de 1500 µL. Se sometió a ebullición (91°C) durante 10 minutos en un baño maría. A continuación se centrifugó a 3500 rpm durante 1 minuto y se congeló para conservar el ADN extraído (Guamán, 2012).

Método de DNAzol.- Después de 48 horas de cultivo en MRS, se transfirieron de 2 a 3 colonias grandes de bacterias a tubos Eppendorf® de 2000 µL de capacidad, que contenían 1000 µL de agua destilada estéril. Esta suspensión fue centrifugada a 14000 rpm durante 5 minutos. El agua fue eliminada del tubo y se hizo un lavado con PBS 1x, se volvió a centrifugar. Una vez centrifugado se desechó el líquido sobrenadante, se añadió 500 µL de DNAzol y 500 µL de alcohol al 100%. Se dejó reposar por 3 minutos y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el líquido sobrenadante y se realizaron dos lavados con 1000 µL de etanol al 75%, se volvió a centrifugar. Después de desechar el líquido sobrenadante, se dejó secar el *pellet* por 1 hora a temperatura ambiente,

transcurrido este tiempo se suspendió el *pellet* en 300 μL de NaOH 8 mM y se congeló (Perera, 2002).

Amplificación del ADNr 16S.

Para la amplificación de este gen, en la reacción en cadena de la polimerasa se utilizaron los *primers* 16sr y 16sf (De Dios, 2013). Las muestras de ADN obtenidas por el método de Lisis, fueron amplificadas directamente mientras que las muestras obtenidas por el método de DNAzol se trabajaron con diluciones 1:10.

Se realizaron 3 protocolos de amplificación. Los reactivos para la reacción y las condiciones de amplificación se detallan en la Tabla 2 y en la Tabla 3.

Tabla 2 Reactivos y concentraciones utilizadas para PCR de ADNr 16S

Reactivo	Concentración	1 Reacción (μL)	Master Mix (μL)
Agua PCR		12.81	204.96
PCR Buffer	1 x	6	96
MgCl ₂	2.6 mM	3.12	49.92
dNTPs	250 uM	3.75	60
Go Taq promega	0.02 Unid./uL	0.12	1.92
16s f	0.2 uM	0.6	9.6
16s r	0.2 uM	0.6	9.6
ADN		3	

Tabla 3 Condiciones PCR adoptadas en la amplificación del ADNr 16S

Desnaturalización	94°C, 4 minutos	x30 CICLOS
Desnaturalización	94°C, 1 minuto	
Annealing	51,7°C, 20 segundos	
Elongación	72°C, 2 minutos	
Extensión final	72°C, 8 minutos	

Electroforesis de ADN.

Los productos de la PCR fueron observados en un gel de agarosa de 1.5%, que se preparó de la siguiente manera: Se mezcló 1.1g de agarosa con 70 mL de TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA) y se disolvió por calentamiento en un horno microondas en intervalos de 50, 30, 20 segundos y agitando, hasta total disolución de la mezcla agarosa/tampón; una vez disuelta la mezcla, se enfrió un tanto sin dejar gelificar y se añadió 0,8 µL de Bromuro de Etidio (0.01%). Se pasó la mezcla a la cámara de electroforesis y se dejó enfriar hasta formación total del gel (20 minutos, aproximadamente). A continuación, se inyectó 4 µL de amplicón en cada pocillo del gel y 2 µL de marcador de peso molecular Invitrogen®, se corrió durante 50 minutos a 90 voltios. Terminada la electroforesis, se expuso el gel a luz UV con una cámara y se obtuvo la imagen. Para visualizar el tamaño del producto de PCR se utilizó un marcador de tamaño Invitrogen® de 1500 pares de bases (pb) fragmentado en bandas de 100 pb (Guamán, 2012; Lee *et al.*, 2012).

Secuenciación del ADN.

Se enviaron 36 productos de PCR a la empresa *Functional Biosciences, Inc.*, ubicada en Madison, Wisconsin para secuenciación en ambos sentidos.

Análisis químicos.

Determinación de calcio y magnesio.

El calcio y el magnesio fueron determinados por espectroscopia de absorción atómica (AOAC 975.03).

Determinación de carbohidratos totales.

Los carbohidratos totales se determinaron según el método espectrofotométrico fenol ácido sulfúrico (Nielsen, 2007).

Diseño experimental (caracterización química).

Los tratamientos fueron dispuestos en un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) con arreglo factorial 2^3 que correspondió a la combinación de tres factores con dos niveles cada uno: ecotipo (Pichincha y Cotopaxi), jornada de recolección (mañana, 9:00 AM y tarde, 2:00 PM) y ciclo de recolección (mes 1 y mes 2). Obteniéndose 8 tratamientos con 5 repeticiones y un total de 40 unidades experimentales. Los tratamientos fueron:

TRATAMIENTO 1: Pichincha, mes 1, AM

TRATAMIENTO 2: Pichincha, mes 1, PM

TRATAMIENTO 3: Cotopaxi, mes 1, AM

TRATAMIENTO 4: Cotopaxi, mes 1, PM

TRATAMIENTO 5: Pichincha, mes 2, AM

TRATAMIENTO 6: Pichincha, mes 2, PM

TRATAMIENTO 7: Cotopaxi, mes 2, AM

TRATAMIENTO 8: Cotopaxi, mes 2, PM

Tres fueron las variables que se midieron: Ca, Mg y carbohidratos totales.

En la Tabla 4 se presenta un resumen del diseño experimental ejecutado.

Tabla 4 Resumen del diseño experimental

DBCA con arreglo factorial 2³		
FACTORES Y NIVELES EN ESTUDIO		
Ecotipo	Jornada de recolección	Ciclo de recolección
Pichincha	9:00 AM	Mes 1
Cotopaxi	2:00 PM	Mes 2
TRATAMIENTOS		
TRATAMIENTO 1: Pichincha, mes 1, AM	TRATAMIENTO 5: Pichincha, mes 2, AM	
TRATAMIENTO 2: Pichincha, mes 1, PM	TRATAMIENTO 6: Pichincha, mes 2, PM	
TRATAMIENTO 3: Cotopaxi, mes 1, AM	TRATAMIENTO 7: Cotopaxi, mes 2, AM	
TRATAMIENTO 4: Cotopaxi, mes 1, PM	TRATAMIENTO 8: Cotopaxi, mes 2, PM	
REPETICIONES: 5 pencos por provincia		
VARIABLES DE RESPUESTA: 3 (Ca, Mg y carbohidratos totales).		
Unidades experimentales: 40		

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos de las pruebas químicas fueron analizados empleando el *software* estadístico InfoStat versión 2013, éstos se procesaron estadísticamente aplicando análisis de varianza (ANOVA) y prueba de significación de Tukey para comparación de medias al 5% de probabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis microbiológicos de la savia de *Agave americana* L.

Presencia de Coliformes y *Escherichia coli*.

En todas las muestras de ambas provincias y sus correspondientes jornadas de recolección, se evidenció presencia de Coliformes totales, esto sugiere; por un lado, que pudo haber contaminación ambiental; por otro lado, también existe la posibilidad de que se trate de Coliformes propios del suelo o de la planta (ANEXO B) (Ramos, 2008). Aparte, en una de las muestras recolectada en la provincia de Cotopaxi, se obtuvo un resultado positivo para *Escherichia coli*, lo que confirma que existió contaminación fecal, en la muestra de la quinta planta de Agave, recolectada en la jornada de la mañana (ANEXO C) (Perna, 2001). Una de las causas de esta contaminación, probablemente, fue que los pencos se mantienen a la intemperie, y, una vez realizado el orificio en la base de la planta, éste es cubierto con una piedra y con hojas de la propia planta de Agave; además, los cultivos están rodeados de ganado y animales domésticos.

La savia de Agave es utilizada para consumo humano y en ocasiones no es sometida a tratamiento térmico. La *Escherichia coli*, es una bacteria que habita el intestino de animales de sangre caliente, incluido el ser humano, siendo un componente secundario de la microflora total del intestino. Sin embargo, existen patotipos de *E. coli* causantes de varias enfermedades; su presencia en heces, fácil cultivabilidad, carácter patógeno y capacidad de supervivencia en el agua hacen que esta bacteria sea indicador de contaminación fecal (Adams, Moss 1995). El consumo de un alimento que presente contaminación fecal y sin tratamiento térmico, implica el riesgo de que esté contaminado con patógenos intestinales como *Salmonella*, *Shigella*, virus entéricos, etc. que causan diferentes enfermedades (Adams, Moss, 1995; Rodríguez-Angeles, 2002; Vidal, 2007).

Presencia de mohos y levaduras.

Penicillium, *Oospora*, *Mucor* y *Candida kefir* fueron los hongos identificados en las muestras analizadas de la savia de *Agave americana L.* (ANEXO D).

Penicillium correspondió al género predominante tanto en la provincia de Pichincha como de Cotopaxi (ANEXO E). *Penicillium* pertenece al género de hongos más abundante presente en el suelo y aire, algunas especies producen toxinas haciendo al alimento no apto para el consumo (Adams, Moss, 1997). En la prueba API® *Candida* realizada a dos muestras de Cotopaxi y una muestra de Pichincha (C1AM, C4AM y P2PM), se identificó la presencia de *Candida kefir*, con un porcentaje de identificación de 99.9% (ANEXO F, ANEXO G y ANEXO H). Este microorganismo conocido también con el nombre de *Candida pseudotropicalis*, corresponde al estado asexual de *Kluyveromyces marxianus* y pertenece al grupo de levaduras capaces de fermentar la lactosa, produce la enzima β -galactosidasa para así hidrolizar la lactosa, posee un sistema enzimático dirigido a la producción de la enzima por presencia de lactosa y/o galactosa que actúan como inductores. *Candida kefir* es usada para la producción de la enzima a nivel industrial, y ha sido aislada de los gránulos para producir Kéfir. Esta levadura ha sido utilizada también para transformar los azúcares del suero lácteo en proteínas o productos que puedan ser empleados para la alimentación de humanos y animales (Astiasarán *et al.*, 2003; Zumbado, 2005).

La savia de *Agave americana L.*, un líquido rico en azúcares fermentables contiene bacterias ácido lácticas, mohos y levaduras autóctonos en espera de condiciones nutricionales y ambientales apropiadas para su propagación. Por lo que se trata de un producto bastante inestable (Pardo, 2005).

La presencia de mohos y levaduras en la savia del Agave es normal, resulta inevitable dadas las condiciones de obtención de la bebida. Con seguridad, los hongos son microorganismos propios del Agave, de su ambiente o de su entorno, como es el caso de *Penicillium*, que se encuentra en el aire y suelo, y que prevaleció en las muestras de la savia de *Agave americana* L. analizadas. De acuerdo con la literatura, es común encontrar hongos en muestras de “aguamiel”, Apolinar (2014) a más de aislar microorganismos Gram positivos del “aguamiel”, aisló levaduras. Los resultados descritos por Escalante *et al.* (2004) también revelaron la presencia de hongos y de bacterias ácido lácticas en el “aguamiel”, asimismo Cervantes-Contreras, Pedroza-Rodríguez (2007), en su estudio sobre las características microbiológicas del pulque y su contenido alcohólico, identificaron a partir del “aguamiel” una levadura, un coco bacilo Gram negativo y un bacilo Gram positivo pertenecientes a los géneros *Saccharomyces* sp., *Zymomonas* sp. y *Lactobacillus* sp., respectivamente. De igual modo, Bautista (2006) observó crecimiento de mohos y levaduras en muestras de savia de *Agave americana* L..

Identificación molecular de bacterias ácido lácticas.

En todas las muestras y duplicados sembrados en los medios de cultivo MRS y M17, se obtuvo resultados positivos. En 4 de las 36 muestras de los medios MRS y en 9 de las 36 muestras de los medios M17 se observó crecimiento de levaduras. Por un lado, la prueba de tinción Gram mostró presencia de cocos Gram negativos y cocos Gram positivos, siendo estos últimos los predominantes; por otro lado, todas las colonias de bacterias fueron catalasa negativa.

En las 18 muestras de medios MRS que fueron seleccionadas (sin crecimiento de levaduras), se observó desarrollo de dos tipos de colonias con morfología distinta. Para la completa caracterización microbiológica de la savia de *Agave americana* L. se estudió el

ADN de estas bacterias, con la finalidad de identificar el género y especie de cada una (Curtis, 2000).

En la Tabla 5 se expone un resumen de las bacterias ácido lácticas identificadas en las muestras extraídas de cada planta de *Agave americana* L. a ambas jornadas de recolección, en la provincia de Cotopaxi.

Tabla 5 Bacterias ácido lácticas identificadas en plantas de *Agave americana* L. de la provincia de Cotopaxi a dos horas de recolección

Planta	Bacterias ácido-lácticas	
	9:00 AM	2:00 PM
1	<i>Leuconostoc citreum</i> <i>Lactobacillus fabifermentans</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>
2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
3	<i>Lactobacillus kefir</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
4	<i>Leuconostoc citreum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus capillatus</i>
5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus fabifermentans</i>

Independientemente de la hora de recolección, se puede apreciar que en cuatro de las cinco plantas usadas en este estudio se encontró presencia de *Leuconostoc mesenteroides*. Por lo demás, en dos de los pencos se encontró *Leuconostoc citreum* (primero y cuarto Agave), *Lactobacillus fabifermentans* (primero y quinto Agave) y *Lactobacillus kefir* (primero y tercero Agave). También se observa que en el cuarto Agave, hay dos bacterias que se presentan solo en esta planta, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus capillatus*. Únicamente en el segundo y tercer penco, se encontró la bacteria, *Leuconostoc mesenteroides*, tanto en la jornada de la mañana como en la tarde.

En la provincia de Pichincha, en cambio, se pueden observar resultados muy homogéneos, el género *Leuconostoc* fue predominante. *Leuconostoc mesenteroides* prevaleció tanto en la recolección de la mañana como de la tarde y *Leuconostoc*

pseudomesenteroides fue identificada en la savia recolectada en la tarde de la planta número dos (Tabla 6).

Tabla 6 Bacterias ácido lácticas identificadas en plantas de *Agave americana* L. de la provincia de Pichincha a dos horas de recolección

Planta	Bacterias ácido-lácticas	
	9:00 AM	2:00 PM
1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

En la Figura 1 se presenta la frecuencia de las bacterias ácido lácticas identificadas por provincia, destacándose que tanto en Pichincha como en Cotopaxi, la microbiota que predominó en las muestras de savia de *Agave americana* L. fue el género *Leuconostoc*, representado por las especies *mesenteroides*, *citreum* y *pseudomesenteroides*. Además, se identificó al género *Lactobacillus*, representado por las especies *kefiri*, *fabifermentans*, *plantarum* y *capillatus*.

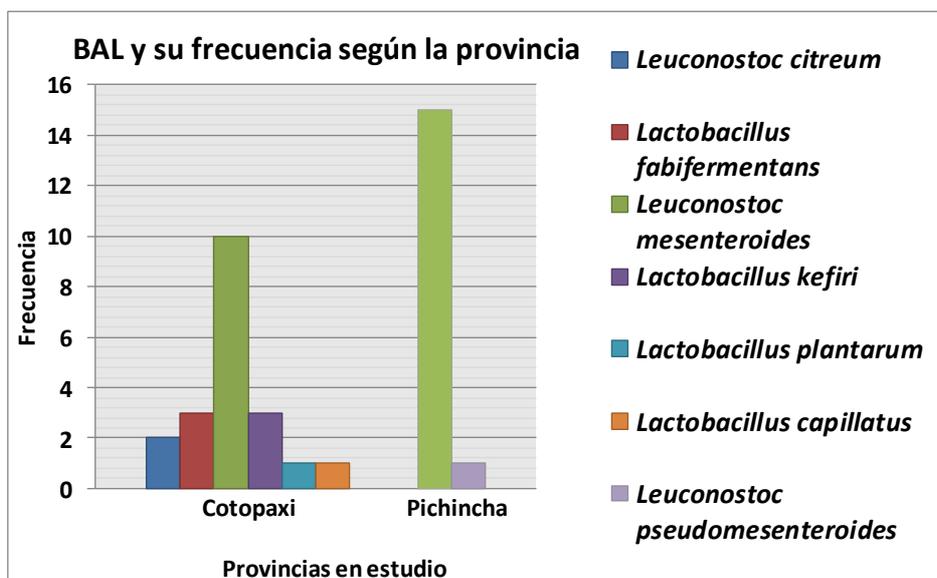


Figura 1 Frecuencia de las bacterias ácido lácticas identificadas por provincia

La fermentación del “aguamiel” se da básicamente por la presencia de levaduras y BAL del género *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. *Leuconostoc mesenteroides* así como *Lactobacillus plantarum* naturalmente presentes en los vegetales representa una de las bacterias ácido-lácticas más importantes en la fermentación de vegetales (Dimic, 2006). Las especies *Leuconostoc* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, *L. mesenteroides* constituye una de las bacterias ácido lácticas predominantes en frutas y vegetales y es la responsable de iniciar la fermentación del “chucrut” y otras fermentaciones en vegetales (Adams, Moss, 1997). Los vegetales verdes y raíces son su nicho ecológico natural, se encuentra en la microbiota de vacunos e insectos; pero, no forma parte de la microbiota del humano (Jofré *et al.*, 2006). Por lo tanto, *Leuconostoc mesenteroides*, una de las más importantes del género *Leuconostoc*, y que está involucrada en la fermentación de los vegetales es parte de la microbiota de la savia de *Agave americana* L. (Bamforth, 2005). Además, la presencia de las bacterias *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus plantarum* justifica la rápida fermentación de los azúcares

presentes en la savia del Agave, en especial, cuando más tiempo permanece la bebida en el interior de la planta.

En el presente estudio se encontró que *Leuconostoc mesenteroides* forma parte de la microbiota del *Agave americana* L. al igual que del *Agave tequilana*, especie del mismo género, típica de México (García, 2004). Ésta es una bacteria endófito (habita y coloniza los tejidos de la planta sin causar estragos) que se encuentra presente en todas las etapas de cultivo del *Agave tequilana*, junto a otras bacterias es promotora del crecimiento vegetal (Martinez, 2015). *L. mesenteroides* es parte activa del proceso de fermentación del aguamiel, investigaciones realizadas en la caña de azúcar revelaron que esta bacteria produce dextrano (polisacárido formado por moléculas de glucosa), que es indicativo del deterioro de la sacarosa (Cuervo, 2010). La actividad metabólica de *L. mesenteroides* es la que confiere la característica viscosa al pulque (bebida alcohólica fermentada tradicional de México obtenida a partir de la savia del *Agave tequilana*) (García, 2004).

En Pichincha se encontró principalmente *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc pseudomesenteroides* ambas ácido lácticas y asociadas con el proceso de fermentación. No obstante, en las muestras recolectadas en la provincia de Cotopaxi se indentificó *L. citreum* una bacteria ácido láctica heterofermentativa que generalmente se asocia a la fermentación de vegetales, al igual que *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus plantarum* (Dimic, 2006). En ciertas investigaciones *L. citreum* fue aislada de masas de trigo (Passerini, 2014). Di Cagno *et al.* (2014) en su estudio comparativo de masas fermentadas para la elaboración de galletas, pizza, entre otros productos, encontraron crecimiento de *Leuconostoc citreum* tanto en masas fermentadas firmes como líquidas. *L. citreum* también se puede encontrar en bebidas fermentadas como el “pozol”, bebida tradicional del sur de México elaborada a base de maíz (Olivares, 2001). Así

mismo, Herrera-Solorzano *et al.* (2008) identificaron *Leuconostoc citreum* en el aguamiel sin fermentar.

Aparte de *Leuconostoc*, en las muestras de la provincia de Cotopaxi, se identificó a *Lactobacillus plantarum* que tiene una gran capacidad de adaptación, por lo que se encuentra presente en un sinnúmero de ambientes y sustratos como: cárnicos, vegetales, derivados lácteos, residuos industriales, materia orgánica de origen vegetal en descomposición e incluso se puede encontrar en el tracto gastrointestinal de los mamíferos. Predomina en la fermentación espontánea obteniéndose alimentos como: aceitunas, pepinos, pepinillos, coles o “chucrut” y berenjenas (Adams, Moss, 1997; Rodríguez *et al.*, 2009). Así también participa en la fermentación de cacao en la que interviene otra bacteria identificada en este estudio *Leuconostoc pseudomesenteroides*; *L. plantarum* es endófito del cacao (Wacher, 2011). Se puede encontrar también antes de la cosecha de la uva, en mostos y vinos, en la que comparte hábitat con otra bacteria del género *Leuconostoc* identificada en el “aguamiel” de *Agave americana* L., *Leuconostoc mesenteroides* (Ruiz, 2010).

Otro *Lactobacillus* que se encontró en el “aguamiel” del *Agave americana* L. es *L. fabifermentans*, que comparte un 99% de similitud en la secuencia del gen 16S y 23S con *L. plantarum* (Reverón, 2013). *Lactobacillus fabifermentans*, es una bacteria propuesta recientemente, se encuentra en la fermentación natural de los granos de cacao, así como también ha sido aislada del orujo de uva (subproducto sólido de la elaboración del vino) recolectado después de la fermentación alcohólica espontánea (De Bruyne, 2009; Treu, 2014).

El pulque, bebida que resulta de la fermentación de la savia del Agave azul, tiene un proceso de fermentación muy similar al “aguamiel” objeto de este estudio, por lo que

resulta lógico encontrar en ambas saviás bacterias propias del género *Agave* como son *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc pseudomesenteroides*, entre otras (Escalante *et al.*, 2004).

Por otro lado, en el mosto del mezcal (bebida alcohólica tradicional de México), Hernández (2009) identificó varias bacterias ácido lácticas, entre éstas: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fabifermentans* y *Lactobacillus kefir*,

Lactobacillus capillatus es una especie de *Lactobacillus* recién identificada, que también participa en procesos de fermentación y fue aislada de la salmuera de tofuapestoso (refrigerio chino fermentado), que es obtenida por la mezcla de verduras o hierbas chinas, camarones o pescado; la mezcla se fermenta naturalmente (Chao, 2008). Esta bacteria, también, ha sido encontrada en la microbiota vaginal de vacas (Swartz, 2014).

Algunos estudios demuestran que ciertas bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus plantarum* podría tener un efecto probiótico. Los probióticos son cultivos de microorganismos vivos, generalmente bacterias, que al consumirse sobreviven al tránsito gastro-intestinal, algunas consideraciones para que un alimento sea considerado probiótico son: tener la capacidad de adherirse y colonizar el intestino, tener un tiempo corto de reproducción, alterar favorablemente el balance microbiano, con efectos beneficiosos a la salud (Webb, 2006; León-de la O, 2012). Lebeer *et al.* (2008), estudiaron las características de algunas bacterias ácido lácticas entre éstas *Lactobacillus plantarum* y encontraron que esta especie tiene una buena capacidad de adherencia, lo que implica que esta cepa puede promover el tiempo de residencia en el intestino, excluir patógenos y tener interacción con las células huésped para la protección de las células epiteliales, lo que muestra la capacidad probiótica de *Lactobacillus plantarum* (Servin, 2004; Vries, 2006). Otra investigación realizada por Castro-Rodríguez (2015), demuestra el potencial

probiótico que tienen las bacterias del Agave, aislando *Leuconostoc mesenteroides* de la savia de *Agave salmiana*, cepa que sobrevivió a la simulación *in vitro* de las condiciones gastrointestinales (ácido del estómago y sales biliares del intestino).

Según Amores *et al.* (2004), las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc spp.* corresponden a microorganismos frecuentemente empleados como probióticos. Algunas cepas probióticas son empleadas en la elaboración de productos fermentados, así por ejemplo, se menciona a la leche fermentada “Kéfir” que contiene como cepa probiótica a *Lactobacillus kefir*, y las leches fermentadas “Kishk” y “M`Bannic” con *Lactobacillus plantarum* como cultivo probiótico. Ramírez *et al.* (2011), también, mencionan a *Lactobacillus plantarum* como uno de los microorganismos usados como probióticos. Además, Soccol *et al.* (2012), señalan a microorganismos aislados del “pulque” (bebida que resulta de la fermentación de la savia del Agave), y que corresponden a los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, como probióticos. Es más, en un estudio efectuado por Shukla *et al.* (2014) a la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* N NRRL B-1149 se le atribuye potenciales propiedades probióticas, además de que, su producto de fermentación dextrano evidenció actividad anticancerígena *in vitro* frente al cáncer cervical y de colón. Asimismo, fue aislado *Leuconostoc mesenteroides* P45 presente en el pulque con potencial efecto probiótico y capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas (UNAM, 2014).

A pesar de que la savia del Agave podría tener efectos probióticos, gracias su microbiota natural; no sería posible su comercialización como tal, debido a las condiciones de recolección. La obtención de esta bebida se da en ambientes poco controlados, ya que los pencos se encuentran en el campo a la intemperie; muchas veces el sector no cuenta con agua potable y no se considera medidas de higiene para el manejo y uso de los

utensilios y materiales que entran en contacto con el producto; además, de que la zona donde se cultiva el Agave está generalmente rodeada de ganado o animales domésticos. A lo anterior se suman los resultados de Coliformes y *E. Coli* obtenidos en este trabajo de investigación. De ahí que, la savia de Agave no debería ser consumida sin un tratamiento térmico previo. Cuando un alimento es sometido a altas temperaturas todo tipo de microorganismos (tanto patógenos como benéficos) muere. Por lo tanto, no se podría calificar a la savia de Agave como un alimento probiótico. Para eliminar la *Escherichia coli*, un alimento debe ser sometido a 55°C durante una hora, ó 60°C por el transcurso de 15 a 20 minutos (Torres, 2009). Una pasteurización discontinua o por lotes, en la que se aplica baja temperatura y tiempo de tratamiento largo (62,8°C por 30 minutos) es suficiente para eliminar *E. Coli*. Sin embargo, al ser una bebida bastante inestable y muy propensa a posibles contaminaciones por las condiciones de recolección, se podría someter también a una pasteurización continua (HTST) en la que se aplica tiempos cortos y altas temperaturas (71,7°C durante 15 segundos) o bien una pasteurización de ultra alta temperatura (UHT), en la que se maneja temperaturas más elevadas y menor tiempo (138°C durante 1 o 2 segundos). Tomando en cuenta que la temperatura óptima para el crecimiento microbiano es de 25°C a 37°C, se requiere un choque térmico para impedir su desarrollo (Bautista *et al.*, 2011; Ramesh, n.d.).

Por otro lado, algunas investigaciones sustentan que la planta de Agave es una buena fuente de fructanos, considerados prebióticos, debido a que estimulan el crecimiento de bacterias benéficas para el organismo (De las Cagigas, 2002; Urías, 2004; Gable, 2009; Velásquez, 2014). De igual modo, García *et al.* (2009) encontraron que los carbohidratos más abundantes en el Agave son los fructanos, tanto en el tallo como en las hojas del Agave, siendo probable que la savia también contenga fructanos.

Análisis químicos de la savia de *Agave americana* L.

En la Tabla 7 se presenta un resumen del Análisis de Varianza (ANOVA) del contenido de calcio, magnesio y carbohidratos totales de los tratamientos.

Tabla 7 Resumen del Análisis de Varianza (ANOVA) de calcio, magnesio y carbohidratos totales de los tratamientos

F.V.	Gl	Cuadrados Medios		
		Calcio	Magnesio	Carbohidratos totales
Tratamientos	7	23,98*	2,51 ^{n.s.}	1278,22*
Bloques	4	2,72 ^{n.s.}	2,44 ^{n.s.}	592,23*
Factor A (Eco-tipo)	1	68,59*	7,78 ^{n.s.}	3015,26*
Factor B (Jornada)	1	68,54*	2,35 ^{n.s.}	3357,51*
Factor C (Ciclo)	1	0,38 ^{n.s.}	5,08 ^{n.s.}	1145,65*
Interacción AxB	1	7,66*	0,14 ^{n.s.}	31,35 ^{n.s.}
Interacción AxC	1	20,14*	0,50 ^{n.s.}	419,19 ^{n.s.}
Interacción BxC	1	1,94 ^{n.s.}	1,47 ^{n.s.}	922,66*
Interacción AxBxC	1	0,59 ^{n.s.}	0,67 ^{n.s.}	55,91 ^{n.s.}
Error	28	1,39	3,30	169,53
Total	39			

*Significativo al 5% de probabilidad por la prueba F

^{n.s.}No significativo al 5% de probabilidad por la prueba F

Según el resumen del análisis de varianza (Tabla 7), existió diferencia significativa en el contenido de calcio de los tratamientos; además, el ecotipo, la jornada y las interacciones ecotipo, jornada y ecotipo, ciclo influyeron en el contenido de calcio de los tratamientos; sin embargo, el ciclo de recolección, la interacción jornada, ciclo y la interacción ecotipo, jornada, ciclo no influyeron en el contenido, el ANOVA también permitió afirmar la no significación estadística entre los penchos muestreados (bloques o repeticiones); el contenido de calcio de la savia de *Agave* varió únicamente entre provincias, entre jornada de recolección y por las interacciones ecotipo, jornada y ecotipo, ciclo. En lo que al magnesio se refiere, no existió diferencia estadísticamente significativa para los tratamientos, no hubo efecto evidente de los factores ecotipo, jornada y ciclo ni como componentes principales ni en las interacciones que intervienen. En el contenido de

carbohidratos totales se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, diferencias significativas para bloques, para los factores ensayados (ecotipo, jornada y ciclo de recolección) así como también para la interacción jornada, ciclo y ninguna significación estadística para las interacciones ecotipo, jornada; ecotipo, ciclo y ecotipo, jornada, ciclo; es decir, el contenido de carbohidratos de los tratamientos fue influenciado por las repeticiones, la provincia, el mes y la hora de recolección de la savia de forma independiente y solo cuando interactuaron la jornada y el ciclo.

Si bien, no se observaron diferencias significativas para bloques en cuanto al contenido de minerales, no obstante hubo diferencias estadísticamente significativas para bloques en lo que a carbohidratos se refiere. Considerando que cada bloque o repetición estuvo representado por una planta de Agave, las diferencias significativas encontradas para las repeticiones pueden justificarse por la acción de las bacterias ácido lácticas identificadas en la savia de cada planta *Agave americana* L., ya que éstas se caracterizan por fermentar carbohidratos como parte de su proceso metabólico, ésto sugiere que las BAL estuvieron consumiendo los azúcares de la savia de *Agave americana* L. y se reflejó en variaciones significativas en el contenido de carbohidratos de la savia recolectada de cada planta de Agave, existiendo diferencia entre los bloques (Adams, Moss, 1995).

En la Tabla 8 se expone el contenido de calcio de los tratamientos.

Tabla 8 Contenido de calcio (mg/mL) de los tratamientos

Tratamiento	Calcio* (mg/L)
6	9,63 <i>a</i>
2	8,21 <i>ab</i>
5	5,94 <i>bc</i>
4	5,89 <i>bc</i>
8	4,96 <i>cd</i>
1	4,91 <i>cd</i>
3	4,83 <i>cd</i>
7	2,53 <i>d</i>

*Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la

prueba de Tukey.

Como se observa en la Tabla 8, según la prueba de significación de Tukey al 0,05, los tratamientos 6 y 2 fueron iguales entre sí y el 6 diferente al resto. Los tratamientos 5, 4, 8, 1 y 3 fueron estadísticamente iguales y, a su vez, los tratamientos 8, 1, 3 y 7. El tratamiento 6, correspondiente a la recolección de la savia de Agave en la provincia de Pichincha, en la tarde y al segundo mes de abierto el penco, y el tratamiento 2 que correspondió a la recolección en Pichincha, en la tarde y al primer mes de intervenida la planta, reflejaron la más alta concentración de calcio presente en la savia del Agave. Por el contrario, la recolección de la savia efectuada en la provincia de Cotopaxi, en la mañana y al segundo mes de abierto el penco (tratamiento 7), y la recolección en la misma provincia, en la mañana y al primer mes de intervenida la planta (tratamiento 3), junto con la recolección realizada en la provincia de Pichincha en la mañana y al primer mes de abierto el penco (tratamiento 1), y la recolección en Cotopaxi, en la tarde y al segundo mes de intervenida la planta (tratamiento 8) presentaron el menor contenido de calcio.

En la Tabla 9 se muestra el contenido de magnesio de los tratamientos.

Tabla 9 Contenido de magnesio (mg/mL) de los tratamientos

Tratamiento	Magnesio* (mg/L)
6	22,17
5	21,93
2	21,81
7	21,41
8	21,37
1	21,31
4	21,08
3	19,83

*Medias de cinco repeticiones.

Como se observa en la Tabla 9, el contenido de magnesio de los tratamientos varió entre 19.83 y 22.17 mg por litro de savia, sin embargo, con base en el análisis de varianza (Tabla 10, ANEXO Q), la concentración de magnesio no estuvo influenciada por los

factores en estudio y todos los tratamientos presentaron igual cantidad de magnesio. Es decir, resultó lo mismo, recolectar la savia de los Agaves de Pichincha y Cotopaxi, en la mañana y en la tarde, al primero y al segundo mes de intervenida la planta. La variable magnesio no varió significativamente de planta a planta de *Agave americana* L..

En la Tabla 10 se presenta el contenido de carbohidratos totales de los tratamientos.

Tabla 10 Contenido de carbohidratos totales (mg/mL) de los tratamientos

Tratamiento	Carbohidratos totales* (mg/mL)
5	164,28 <i>a</i>
7	136,31 <i>b</i>
1	135,14 <i>b</i>
6	132,22 <i>b</i>
2	127,01 <i>b</i>
3	124,84 <i>b</i>
4	115,53 <i>b</i>
8	112,52 <i>b</i>

*Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Tukey.

Como se observa en la Tabla 10, el tratamiento 5 fue significativamente diferente al resto de tratamientos, y éstos estadísticamente iguales entre sí, de acuerdo con la prueba de Tukey al 5%. El tratamiento 5 que corresponde a la recolección de la savia de Agave en la provincia de Pichincha, en la mañana y al segundo mes de abierto el pencho, resultó ser el que mayor cantidad de carbohidratos presentó; el resto de tratamientos tuvo la misma concentración de carbohidratos, ya que no hubo diferencia estadística, y fue inferior y diferente significativamente al tratamiento 5.

Los carbohidratos son macromoléculas muy importantes para el organismo humano cuya función principal es la de proporcionar la energía necesaria para el desarrollo de las actividades diarias y físicas, así como para mantener la temperatura corporal. La FAO (*The Food and Agriculture Organization of the United Nations*) y la WHO (*World Health Organization*) sugieren que el consumo óptimo de hidratos de carbono, obtenidos de

fuentes distintas, debe ser al menos 55% de la energía total de la dieta, para todas las edades exceptuando niños menores de dos años; sin embargo, se debe considerar la composición química del carbohidrato y su efecto fisiológico, pues, hoy en día, resulta necesario conocer qué impacto tendrá determinado alimento en el organismo humano; el índice glucémico puede ser un indicador útil para una elección más saludable de estas sustancias energéticas (Ramírez, 2010).

Con base en algunas investigaciones, el “aguamiel” es una bebida con un contenido considerable de carbohidratos como fructosa, sacarosa, fructooligosacáridos e inulina; además, contiene pequeñas cantidades de minerales, aminoácidos y vitaminas. Ortiz-Bazurto *et al.* (2008), al identificar carbohidratos en el “aguamiel” de *Agave mapisaga* encontraron fructosa, glucosa, sacarosa y fructooligosacáridos, siendo la fructosa el componente mayoritario (32.4%), seguido por la glucosa (26.5%) y la sacarosa (8.8%), y finalmente los fructooligosacáridos con un 10.2% en materia seca. En otro estudio en el que se evaluó el efecto prebiótico del “aguamiel” de *Agave salmiana* se encontró 32.130g de carbohidratos totales por litro de “aguamiel” e inulina en una cantidad de 15.981g por litro de esta bebida (Ramírez, 2010). De ahí que se le atribuyen al Agave y sus derivados propiedades funcionales, sin embargo la bibliografía acerca de la savia de *Agave americana* L. es muy limitada.

Bautista *et al.* (2008) en su estudio químico bromatológico del “aguamiel” de *Agave americana* L. encontraron que esta bebida contenía 12.03g de carbohidratos por 100g de muestra fresca; 8.60mg de magnesio y 9.72mg de calcio; Tovar-Robles *et al.* (2011), en cambio, analizaron la savia de *Agave salmiana* y hallaron valores para magnesio y calcio de 0.97 y 24.53mg/60mL, respectivamente. Es evidente que los datos obtenidos en la presente investigación varían un tanto con la bibliografía citada, si éstos se comparan con los datos reportados por Bautista *et al.* (2008), que al igual que en este estudio,

analizaron a la savia obtenida del *Agave americana* L., se pueden encontrar diferencias marcadas sobre todo en cuanto a minerales.

En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos en esta investigación química de la savia de *Agave americana* L. ecuatoriana comparados con los obtenidos en Perú (Bautista *et al.*, 2008).

Tabla 11 Comparación del contenido de minerales y carbohidratos presentes en la savia de *Agave americana* L. de Ecuador y Perú

	Ecuador		Perú*
	Pichincha	Cotopaxi	Ayacucho
Ca (mg/100g)	0,72	0,46	9,72
Mg (mg/100g)	2,18	2,09	8,60
Carbohidratos (g/100g)	13,97	12,23	12,03

*Bautista *et al.*, 2008.

Como se observa en la Tabla 11 el contenido de carbohidratos totales obtenido fue muy similar al reportado por Bautista *et al.* (2008), sin embargo los valores descritos para calcio y magnesio fueron considerablemente más altos que los obtenidos en la presente investigación. Por otra parte, Tovar-Robles *et al.*, al analizar la savia de *Agave salmiana* encontraron un valor mucho más elevado para calcio (24.53mg/60mL) y una cantidad similar para magnesio (0.97mg/60mL). Son varios los factores que pueden influir en la composición química del “aguamiel”, como la especie, la edad de la planta, las condiciones ambientales, el manejo del cultivo, etc.. Así, en la recopilación de información de Santos-Zea *et al.* (2012), se puede evidenciar, de acuerdo con algunos ensayos, que los contenidos de calcio, magnesio y otros minerales en el “aguamiel” variaron por especie de Agave.

En la Tabla 12 se exponen los porcentajes de los Valores Diarios Recomendados (VDR) obtenidos para calcio, magnesio y carbohidratos totales detectados en la savia de *Agave americana* L., considerando un tamaño de porción de 240mL para una dieta de 2000 kcal (8380 kJ).

Tabla 12 Porcentaje del Valor Diario Recomendado para calcio, magnesio y carbohidratos presentes en la savia de *Agave americana* L.

	Cantidad/ 240mL	Valor de referencia* VDR	%VDR
Ca	1,97 - 2,31 mg	800 mg	0,25 - 0,29
Mg	4,76 - 5,32 mg	300 mg	1,59 - 1,77
Carbohidratos	39,43 g	300 g	13,14

*Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1234-2:2011.

De acuerdo con la Tabla 12, considerando un tamaño de porción de 240 mL normalmente utilizado en jugos según la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1234-2:2011, la savia de *Agave americana* L. presentó porcentajes del Valor Diario Recomendado (VDR) que oscilaron de 0.25 a 0.29% para el calcio, de 1.59 a 1.77% en relación al magnesio y para carbohidratos un 13.14%.

Se detectó magnesio, calcio, y carbohidratos en la savia de *Agave americana* L. o “Chawar mishki”, sin embargo esta bebida no representa una buena fuente de estos minerales. A pesar de que existe la idea de que el “aguamiel” o “Chawar mishki” ayuda a combatir la osteoporosis, no se detectó una concentración considerable de calcio en el producto.

CONCLUSIONES

- La savia de *Agave americana* L. obtenida de los ecotipos de la provincia de Pichincha resultó ser de mejor calidad que la de la provincia de Cotopaxi, desde el punto de vista microbiológico.
- Las bacterias ácido lácticas más prevalentes en la microbiota de la savia de *Agave americana* L., de las dos provincias de estudio, pertenecieron a los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus*.
- *Leuconostoc mesenteroides* podría ser responsable de la fermentación de la savia de *Agave americana* L..
- La presencia de *Escherichia coli* en la savia de *Agave americana* L. de la provincia de Cotopaxi representa un riesgo para la salud si la bebida se ingiere sin tratamiento térmico.
- La savia del *Agave americana* L. podría ser considerada como fuente de probióticos, si se consume sin tratamiento térmico.
- Los pencos de la provincia de Pichincha, difirieron con los de Cotopaxi, ya que, en estos últimos se identificó mayor diversidad de bacterias ácido lácticas que en los pencos de Pichincha.
- La savia de *Agave americana* L. obtenida de plantas de las provincias ecuatorianas de Pichincha y Cotopaxi contiene carbohidratos y minerales como calcio y magnesio, pero considerando el porcentaje del Valor Diario Recomendado para una dieta de 2000 kcal, no constituye una fuente importante de estos minerales.
- Los factores que influyeron significativamente en el contenido de calcio de la savia de *Agave americana* L. fueron la provincia y la jornada de recolección, mientras que, el contenido de carbohidratos presentes en el “aguamiel” varió por penco,

provincia, hora y ciclo de recolección. El magnesio no tuvo influencia estadísticamente significativa de los factores en estudio.

RECOMENDACIONES

- Resulta primordial y urgente realizar campañas de concienciación a las poblaciones productoras de la savia de *Agave americana* L. sobre la importancia de un manejo inocuo de la bebida, desde la cosecha hasta la entrega del producto final.
- Estandarizar un proceso óptimo tanto para la siembra del Agave como recolección del “aguamiel”.
- Para contrarrestar el proceso de fermentación del “Chawar mishki”, provocado por los microorganismos propios del Agave, el “aguamiel” debe ser extraída del penco máximo cinco horas después de la última recolección e inmediatamente la bebida tiene que ser sometida a un tratamiento térmico.
- Realizar ensayos con el fin de analizar el posible rol probiótico de las bacterias ácido lácticas identificadas en la savia de *Agave americana* L. proveniente de las dos provincias de estudio.
- Realizar pruebas químicas para determinar la presencia de inulina en la savia del *Agave americana* L..

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M., Moss, M. (1995). *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza, España: Ediciones Acribia, S.A.
- Amores, R., Calvo, A., Maestre, J., Martínez-Hernandez, D. (2004). Probióticos. *Revista Española de Quimioterapia*, 17(2), 131-139.
- Apolinar, M. (2014). *Aislamiento y purificación de bacterias de aguamiel con capacidad de producción de la enzima celulasa*. Tesis de licenciatura no publicada, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila; México.
- Astiasarán, I., Lasheras, B., Ariño, A., Martínez, J. (2003). *Alimentos y nutrición en la práctica sanitaria*. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos S.A.
- Ballesteros, M., Ruiz, C., Fernández, C., Gutiérrez, M. (2008). Bacteriemia y sepsis por *Leuconostoc mesenteroides*. *Revista española Medicina Clínica*, 134(2).
- Bamforth, C. (2005). *Alimentos, fermentación y microorganismos*. Zaragoza, España: Ediciones Acribia, S.A.
- Bautista, J., Barboza, J., Parra, L. (2001). El Agave tequilana Weber y la producción de tequila. *Acta Universitaria*, México, 11(2), 26-34.
- Bautista, N. (2006). *Estudio químico-bromatológico y elaboración de néctar de aguamiel de Agave americana L. (maguey) procedente de Ayacucho*. Tesis de licenciatura no publicada, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Bautista, E., Bonilla, H., Durán, I., García, M., Quinteros, J. (2011). *Evaluación del proceso de pasteurización de la leche en planta de lácteos de la universidad Católica de El Salvador, regional Ilobasco, Cabañas*. Obtenido el 25 de abril de 2015 de <http://es.slideshare.net/edbautis/proceso-de-pasteurizacin>
- bioMérieux® S.A.. (2006). API® Candida Sistema de identificación de levaduras. REF 10 500. Francia.
- Blast. Basic Local Alignment Search Tool. Obtenido el 20 de diciembre de 2014 de <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Castro-Rodríguez, D., Hernández, H., Yáñez, J. (2015). Probiotic properties of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from aguamiel of *Agave salmiana*. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 7(21), 1867-1314.
- Cervantes-Contreras, M., Pedroza-Rodríguez, A. (2007). El pulque: características microbiológicas y contenido. *NOVA – Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 5(8), 101-212.
- Chao, S., Tomii, Y., Sasamoto, M., Fujimoto, J., Tsai, Y., Watanabe, K. (2008). *Lactobacillus capillatus* sp. nov., a motile bacterium isolated from stinky tofy brine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(11), 2555-2559.

- Cuervo, R., Ledesma J., Durán, J., Argote, F. (2010). Aislamiento y Control Microbiológico de *Leuconostoc mesenteroides*, en un Ingenio para Optimizar el Rendimiento de Azúcar y Etanol. *Revista de Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(2).
- Curtis, H., Barnes, S. (2000). *Biología*. Buenos Aires, Argentina: Ediciones Panamericana, S.A.
- De Bruine, K., Camu, N., De Vuyst, L., Vandamme, P. (2009). *Lactobacillus fabifermentans* sp. nov. and *Lactobacillus cacaonum* sp. nov. isolated from Ghanaian cocoa fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(1), 7-12.
- De Dios, T., Ibarra, C., Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- De las Cagigas, A., Blanco, J. (2002). Prebióticos y Probióticos, una relación beneficiosa. *Revista Cubana Alimentación y Nutrición*, 24(2), 63-8.
- Di Cagno, R., Pontonio, E., Buchin, S., De Angelis, M., Lattanzi, A., Valerico, F., Gobbetti, M., Calasso, M. (2014). Diversity of the Lactic Acid Bacterium and Yeast Microbiota in the Switch from Firm- to Liquid-Sourdough Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 3161-3172.
- Dimic, G.R. (2006). Characteristic of the *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strains from fresh vegetables. *University of Novi Sad, Faculty of Technology*, 37, 3-11.
- Escalante, A., Rodríguez M., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar F., 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.
- Hernández, E. (2009). Análisis Metagenómico y fisicoquímico de Mosto de Mezcal Tamaulipeco. *Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica*. México.
- Herrera-Solorzano, M., Lappe, P., Wachter, C. (2008). Identificación Polifásica de Levaduras y Bacterias Ácido Lácticas Aisladas de Aguamiel, Pulque y Semilla. *Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada*, Obtenido el 13 de diciembre 2014 de <http://www.smbb.com.mx/memcongresos/>
- Gable, C. (2009). Baking with Agave. Have your cake and eat it too: life is sweeter with this all-natural, good-for-you sugar alternative. *Better Nutrition*, 58.
- García, A. (2007). Los Agaves de México. *Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México*, 87, 14-23.
- García, Y., López, M., Bocourt, R. (2009). Fructanos en Agave *fourcroydes*, potencialidades para su utilización en la alimentación animal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 43(2), 175-177.

- García, G., Quintero, R., López, M. (2004). *Biotecnología Alimentaria*. México: Ediciones Limusa S.A..
- Guamán, L. (2012). Characterization and technological properties of predominant lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods from Ecuador. Quito, Ecuador.
- Jofré, L., Sakurada, A., Ulloa, T., Hormázabal, J., Godoy, V., Fernández, J., Gutiérrez, M., Monteverde, M., Castillo, M., Canales, A. (2006). Infección por *Leuconostoc* en pacientes con síndrome de intestino corto, nutrición parenteral y alimentación enteral continua. *Revista chilena de infectología*, 23 (4), 340-345.
- Jurado, S., Sarzosa, X. (2009). *Estudio de la cadena agroindustrial de la cabuya en la producción de miel y licor de cabuya*. Tesis de ingeniería no publicada, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O., Leer, R., Turchini, R., Peters, S., Sandbrink, H., Fiers, M., Stiekema, W., Lankhorst, R., Bron, P., Hoffer, S., Nierop, M., Kerkhove, R., Vries, M., Ursing, B., De Vos, W., Siezen, R. (1995). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 100(4), 1990-1995.
- Lebber, S., Vanderleyden J., De Keersmaecker, C. (2008). Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. *Microbiology and Molecular Reviews*, 72(4), 728-764.
- Lee, P., Costumbrado, J., Hsu, C., Kim, Y. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *The Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, (62).
- León de la O, D., Méndez, D., Rodríguez, D., Puente L., García, F., Salgado, R. (2012). Análisis bromatológico y aislamiento de microorganismos con potencial probiótico del pulque. *Investigación tequilana Universitaria Multidisciplinaria*. Universidad Simón Bolívar, 11(11), 115-122.
- Martínez-Rodríguez, J., Mora-Amutio, M., Plascencia-Correa, L., Audelo-Regalado, E., Guardado, R., Hernández-Sánchez, E., Peña-Ramírez, Y., Escalante, A., Beltrán-García, M., Ogura, T. (2015). Cultivable endophytic bacteria from leaf bases of agave and their role as plant growth promoters. *Brazilian Journal Microbiology*. 45(4), 1333-1339.
- MERCK. (2000). *Microbiology Manual*. Darmstadt, Germany: 12th Edition.
- Ministerio de Educación Ecuador. (2009). *KICHWA Yachakukkunapa Shimiyuk Kamu*. Quito, Ecuador.
- Nielsen, S. (2007). *Análisis de los alimentos*. Zaragoza, España: Ediciones Acribia, S.A.
- Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1234-2 (2011). Rotulado de productos alimenticios para consumo humano. Parte 2. Rotulado nutricional. Requisitos. *Instituto Ecuatoriano de Normalización*. Quito, Ecuador.

- Océano Uno. (2001). Diccionario Enciclopédico Ilustrado. Barcelona, España: Ediciones Océano S.A..
- Olivares, V., Olvera, C., Lopez, A. (2001). Identificación y caracterización de una nueva "Inulinsacarasa" de *Leuconostoc citreum*. *Universidad Nacional Autónoma de México*. Obtenido el 17 de febrero de 2015 de <http://www.smbb.com.mx/congresos>
- Ortiz-Basurto, R., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Donier, M., Belleville, M. (2008). Analysis of the Main Components of the Aguamiel Produced by the Maguey-Pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the Harvest Period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3682–3687.
- Pardo, O. (2005). El Agave americano (*Agave americana L.*): uso alimentario en el Perú. *Chloris Chilensis*, 8(2). Obtenido el 28 de diciembre 2014 de <http://www.chlorischile.cl>
- Passerini, D. (2014). Complete Genome Sequence of *Leuconostoc citreum* Strain NRRL B-742. *Genome Announcements*. 2(6), 1128-1179.
- Perera, J., Tormo, A., García, J. (2002). *Ingeniería Genética*. Madrid, España: Ediciones Síntesis S.A..
- Perna, N., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J., Mayhew, D., Mayhew, G., Evans, P., Gregor, J., Kirkpatrick, H., Pósfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E., Davis, N., Lim, A., Dimalanta, E., Potamouisis, K., Apodaca, J., Anantharaman, T., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D., Welch, R., Blattner, F. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature International weekly Journal of Science*, 409. 529-533.
- Ramesh, M. (n.d.). Conservación de alimentos por calor. *Central Food Technological Research Institute*, Mysore, India.
- Ramírez, J., Ulloa, R., Velázquez, M., Ulloa, J., Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*. 2(7), <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>
- Ramírez, R., Pérez, J. (2010). Alimentos Funcionales: principios y nuevos productos. México, D.F., México: Trillas.
- Ramos, L. (2008). Análisis de la Contaminación Microbiológica (coliformes totales y fecales) en la Bahía de Santa Marta, Caribe Colombiano. *Acta Biológica Colombiana*, 13(3).
- Reverón, I. (2013). *Estudio transcriptómico global de la respuesta a los ácidos gálico y p-cumárico en Lactobacillus plantarum WCFS1*. Universidad Autónoma de Madrid. España.
- Rodríguez-Angeles, G., (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública México*, 44(5), 464-475.

- Rodríguez, H., Curiel, J., Landete, J., De las Rivas, B., López, F., Gómez, C., Mancheño J., Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132(2-3), 79-90.
- Romero, A. (2010). *Utilización del Agave como edulcorante natural en la elaboración de una bebida hidratante a partir del suero*. Tesis de ingeniería. Escuela superior politécnica de Chimborazo. Quito, Ecuador.
- Ruiz, P., Izquierdo, P., Seseña, S., Palop, M. (2010). Analysis of lactic acid bacteria populations during spontaneous malolactic fermentation of Tempranillo wines at five wineries during two consecutive vintages. *Elsevier*, 21, 70–75.
- Ruiz, P. (2010). *Biodiversidad de la Microbiota Láctica Presente en la Fermentación Maloláctica de Vinos Tintos de la Variedad Cencibel: Caracterización Molecular y Tecnológica para la selección de Cepas*. Universidad de Castilla de la Mancha. España.
- Sampedro, M. (2009). *Estudio e investigación del Chaguarmishky (agua miel), análisis de sus propiedades, su explotación, aplicación culinaria de este producto milenario*. Tesis de licenciatura no publicada, Universidad Tecnológica Equinoccial. Quito, Ecuador.
- Santos-Zea, L., Leal-Díaz, A., Cortés-Ceballos, E., Gutiérrez-Urbe, J. (2012). Agave (Agave spp.) and its Traditional Products as a Source of Bioactive Compounds. *Current Bioactive Compounds*, (8)3, 1-14.
- Segura, J. (2006). El maguey. Memoria sobre el cultivo y beneficio de sus productos. *Revista de Geografía Agrícola*, (37), 131-150.
- Servin, A. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4), 405-440.
- Shukla, R., Iliev, I., Goyal, A. (2014). *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 as probiotic and its dextran with anticancer properties. *J. BioSci. Biotech*, 3(1), 79-87.
- Soccol, C., Lindner, J., Yamaguishi, C., Spier, M., Vandenberghe, L., Socool, V. (2012). Probiotic nondairy beverages. In. *Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology*. United States of America: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Swartz J., Lachman, M., Westveer, K., O'Neill, T., Geary, T., Kott, R., Berardinelli, J., Hatfield, P., Thomson, J., Yeoman, A., Yeaman, C. (2014). Characterization of the vaginal microbiota of ewes and cows reveals a unique microbiota with low levels of lactobacilli and near-neutral pH. *Frontiers in Veterinary Science*, 1(19), 1-10.
- Torres P., Madera C., Silva J. (2009). Mejoramiento de la calidad microbiológica de biosólidos generados en plantas de tratamientos de aguas residuales domésticas. *Revista de Ingeniería de Antioquia*, 11(22), 21-37.
- Tovar-Robles, C., Perales-Segovia, C., Nava Cedillo, A., Valera-Montero, L., Gómez-Leyva, J., Guevara-Lara, F., Hernández-Duque, J., Silos-Espino, H. (2011). Effect

of aguamiel (Agave sap) on hematic biometry in rabbits and its antioxidant activity determination. *Italian Journal of Animal Science*, 10(2).

- Treu, L., Vendramin V., Bovo, B., Giacomini, A., Corich, V., Campanaro, S. (2014). Genome Sequence of *Lactobacillus fabifermentans* Strain T30PCM01, Isolated from Fermenting Grape Marc. *Genome Announcement*, 2(1).
- UNAM. (2014). Detectan capacidades probióticas en microorganismos del pulque. *Boletín UNAM-DGCS-691*. Obtenido el 27 de diciembre de 2014 de http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2014_691.html
- Urías, J., López, M. (2004). Efecto prebiótico de los fructanos de Agave. Obtenido el 15 marzo de 2015 de <http://congresos.cio.mx/>
- Velázquez, J., González, R., Hernández, M., Campos, R., Jiménez, A., Arenas, M. (2014). Prebiotic Potential of Agave *angustifolia* Haw Fructans with Different Degrees of Polymerization. *Molecules*, 19(8).
- Vidal, J., Canizález, A., Gutiérrez, J., Navarro, F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública de México*, 49(5).
- Wacher, M. (2011). Microorganismos y chocolate. *Revista Digital Universitaria*, 12(4). Obtenido el 12 de febrero de 2015 de <http://www.revista.unam.mx/vol.12/num4/art42/art42.pdf>
- Webb, G. (2006). *Complementos Nutricionales y Alimentos Funcionales*. España: Ediciones Acribia S.A..
- Zapata, S. (2012). *Manual de Microbiología de Alimentos*. Universidad San Francisco de Quito. Quito, Ecuador.
- Zumbado, W. (2005). *Selección de una especie de levadura para la producción de proteína unicelular utilizando como sustrato el suero residual de proceso de elaboración de queso blanco tipo Turrialba*. Tesis de licenciatura no publicada, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

ANEXO A Detalle de las actividades realizadas para la caracterización microbiológica de la savia de *Agave americana* L.

Código muestras	Lugar de recolección	Numeración de cada planta	Fecha de recolección	Hora de recolección	Numeración bacterias	Medio de cultivo donde fueron aisladas	Fecha de aislamiento	Fecha de extracción de ADN	Fecha de ejecución de PCR	Identificación de la cepa
C1A1	Cotopaxi	Penco 1	16-03-2014	9:00 AM	Bacteria 1	MRS	24-09-2014	26-09-2014	20-11-2014	<i>Leuconostoc citreum</i>
C1A2	Cotopaxi	Penco 1	16-03-2014	9:00 AM	Bacteria 2	MRS	24-09-2014	26-09-2014	20-11-2014	<i>Lactobacillus fabifermentans</i>
C2A1	Cotopaxi	Penco 2	16-03-2014	9:00 AM	Bacteria 1	MRS	9-04-2014	10-04-2014	10-09-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
C2A2	Cotopaxi	Penco 2	16-03-2014	9:00 AM	Bacteria 2	MRS	24-09-2014	26-09-2014	20-11-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
C3A1	Cotopaxi	Penco 3	16-03-2014	9:00 AM	Bacteria 1	MRS	9-04-2014	10-04-2014	15-04-2014	<i>Lactobacillus kefir</i>
C3A2	Cotopaxi	Penco 3	16-03-2014	9:00 AM	Bacteria 2	MRS	9-04-2014	10-04-2014	15-04-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
C4A1	Cotopaxi	Penco 4	16-03-2014	9:00 AM	Bacteria 1	MRS	24-09-2014	26-09-2014	20-11-2014	<i>Leuconostoc citreum</i>
C4A2	Cotopaxi	Penco 4	16-03-2014	9:00 AM	Bacteria 2	MRS	9-04-2014	10-04-2014	10-09-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
C5A1	Cotopaxi	Penco 5	16-03-2014	9:00 AM	Bacteria 1	MRS	24-09-2014	26-09-2014	20-11-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

C5A2	Cotopaxi	Penco 5	16-03-2014	9:00 AM	Bacteria 2	MRS	9-04-2014	10-04-2014	15-04-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
C1P1	Cotopaxi	Penco 1	16-03-2014	2:00 PM	Bacteria 1	MRS	24-09-2014	26-09-2014	24-11-2014	<i>Lactobacillus kefir</i>
C1P2	Cotopaxi	Penco 1	16-03-2014	2:00 PM	Bacteria 2	MRS	24-09-2014	26-09-2014	20-11-2014	<i>Lactobacillus kefir</i>
C2P1	Cotopaxi	Penco 2	16-03-2014	2:00 PM	Bacteria 1	MRS	24-09-2014	26-09-2014	20-11-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
C2P2	Cotopaxi	Penco 2	16-03-2014	2:00 PM	Bacteria 2	MRS	24-09-2014	26-09-2014	20-11-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
C3P1	Cotopaxi	Penco 3	16-03-2014	2:00 PM	Bacteria 1	MRS	24-09-2014	26-09-2014	20-11-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
C3P2	Cotopaxi	Penco 3	16-03-2014	2:00 PM	Bacteria 2	MRS	24-09-2014	26-09-2014	20-11-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
C4P1	Cotopaxi	Penco 4	16-03-2014	2:00 PM	Bacteria 1	MRS	9-04-2014	10-04-2014	10-09-2014	<i>Lactobacillus plantarum</i>
C4P2	Cotopaxi	Penco 4	16-03-2014	2:00 PM	Bacteria 2	MRS	9-04-2014	10-04-2014	15-04-2014	<i>Lactobacillus capillatus</i>
C5P1	Cotopaxi	Penco 5	16-03-2014	2:00 PM	Bacteria 1	MRS	24-09-2014	26-09-2014	20-11-2014	<i>Lactobacillus fabifermentans</i>
C5P2	Cotopaxi	Penco 5	16-03-2014	2:00 PM	Bacteria 2	MRS	24-09-2014	26-09-2014	20-11-2014	<i>Lactobacillus fabifermentans</i>
P1A1	Pichincha	Penco 1	16-03-2014	9:00 AM	Bacteria 1	MRS	9-04-2014	10-04-2014	15-04-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

P1A2	Pichincha	Penco 1	16-03-2014	9:00 AM	Bacteria 2	MRS	9-04-2014	10-04-2014	15-04-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P2A1	Pichincha	Penco 2	16-03-2014	9:00 AM	Bacteria 1	MRS	9-04-2014	10-04-2014	10-09-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P2A2	Pichincha	Penco 2	16-03-2014	9:00 AM	Bacteria 2	MRS	24-09-2014	26-09-2014	24-11-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P3A1	Pichincha	Penco 3	16-03-2014	9:00 AM	Bacteria 1	MRS	9-04-2014	10-04-2014	10-09-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P3A2	Pichincha	Penco 3	16-03-2014	9:00 AM	Bacteria 2	MRS	9-04-2014	10-04-2014	15-04-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P4A1	Pichincha	Penco 4	16-03-2014	9:00 AM	Bacteria 1	MRS	9-04-2014	10-04-2014	15-04-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P4A2	Pichincha	Penco 4	16-03-2014	9:00 AM	Bacteria 2	MRS	9-04-2014	10-04-2014	10-09-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P1P1	Pichincha	Penco 1	16-03-2014	2:00 PM	Bacteria 1	MRS	9-04-2014	10-04-2014	10-09-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P1P2	Pichincha	Penco 1	16-03-2014	2:00 PM	Bacteria 2	MRS	24-09-2014	26-09-2014	24-11-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P2P1	Pichincha	Penco 2	16-03-2014	2:00 PM	Bacteria 1	MRS	9-04-2014	10-04-2014	10-09-2014	<i>Leuconostoc pseudo-mesenteroides</i>
P2P2	Pichincha	Penco 2	16-03-2014	2:00 PM	Bacteria 1	MRS	24-09-2014	26-09-2014	24-11-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P3P1	Pichincha	Penco 3	16-03-2014	2:00 PM	Bacteria 1	MRS	24-09-2014	26-09-2014	24-11-2014	<i>Leuconostoc</i>

										<i>mesenteroides</i>
P3P2	Pichincha	Penco 3	16-03-2014	2:00 PM	Bacteria 1	MRS	9-04-2014	10-04-2014	15-04-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P4P1	Pichincha	Penco 4	16-03-2014	2:00 PM	Bacteria 1	MRS	24-09-2014	26-09-2014	24-11-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P4P2	Pichincha	Penco 4	16-03-2014	2:00 PM	Bacteria 1	MRS	9-04-2014	10-04-2014	15-04-2014	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

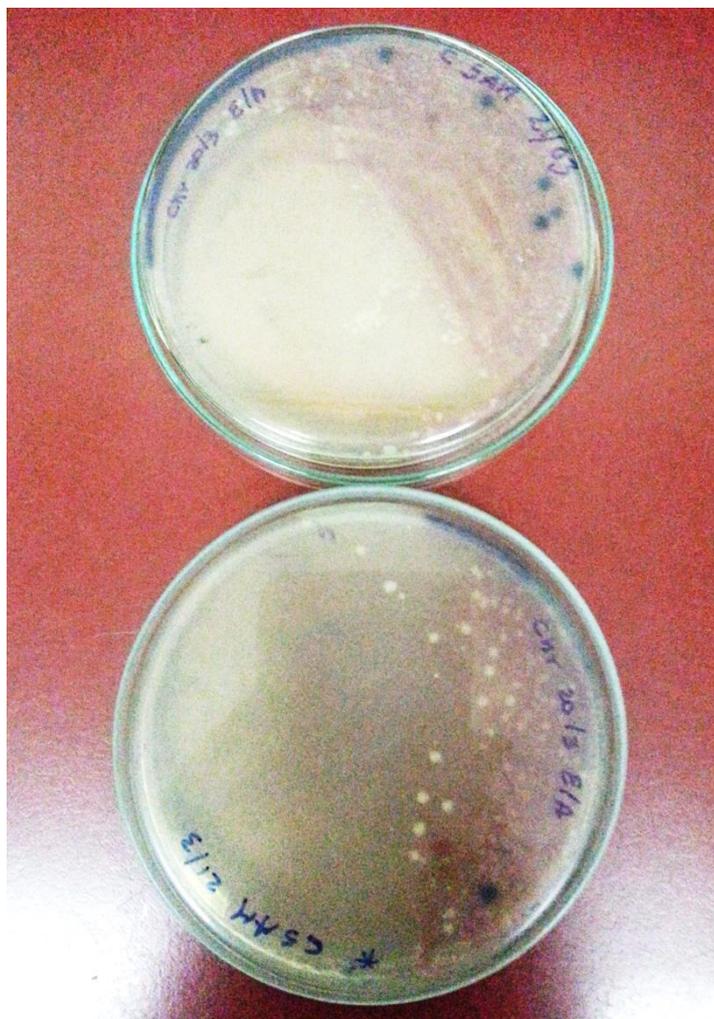
ANEXO B Presencia de Coliformes y *Escherichia coli* en la savia de *Agave americana* L. recolectada en la provincia de Cotopaxi y Pichincha.

Planta	COTOPAXI								PICHINCHA							
	9:00 AM				2:00 PM				9:00 AM				2:00 PM			
	Original		Duplicado		Original		Duplicado		Original		Duplicado		Original		Duplicado	
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
2	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
3	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
4	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
5	+	+	+	+	+	-	+	-								

C: Coliformes

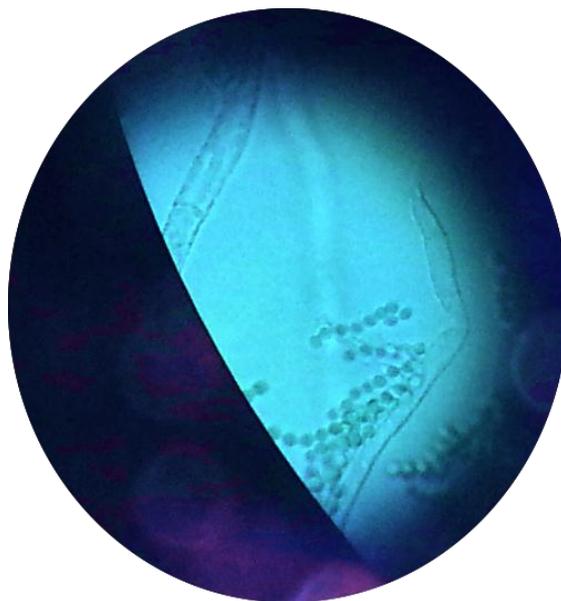
E: *Escherichia coli*

ANEXO C Crecimiento de *Escherichia coli* en el medio de cultivo Chromocult de la muestra tomada de la planta 5 en la mañana y en la provincia de Cotopaxi.

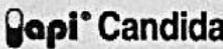


ANEXO D Mohos identificados al microscopio en las muestras de Cotopaxi y Pichincha

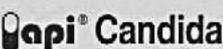
Muestra	Moho identificado
C3A1	<i>Oospora</i>
C4A1	<i>Penicillium</i>
C4A2	<i>Penicillium</i>
C5A1	<i>Penicillium</i>
C3P1	<i>Mucor</i>
C3P2	<i>Mucor</i>
C4P1	<i>Penicillium</i>
C4P2	<i>Oospora</i>
C5P1	<i>Oospora</i>
C5P2	<i>Oospora</i>
P1A1	<i>Penicillium</i>
P1A2	<i>Penicillium</i>
P1P1	<i>Mucor</i>
P2P1	<i>Penicillium</i>
P4P1	<i>Penicillium</i>
P4P2	<i>Penicillium</i>

ANEXO E *Penicillium* observado al microscopio de campo claro 40x

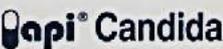
ANEXO F Resultado API® Candida de la muestra recolectada de la planta 1 en la mañana en Cotopaxi

		REF: <u>CLAM</u>	<u>2,0,1,4 / 0,4 / 0,3</u>																																																
Origen / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :																																																			
<table border="1"> <tr> <td>(+)</td><td>(+)</td><td>(+)</td><td>(+)</td><td>(+)</td><td>(-)</td><td>(-)</td><td>(+)</td><td>(-)</td><td>(-)</td><td>(+)</td><td>(+)</td> </tr> <tr> <td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td> </tr> <tr> <td>GLU</td><td>GAL</td><td>SAC</td><td>TRE</td><td>RAF</td><td>β MAL</td><td>α AMY</td><td>β XYL</td><td>β GUR</td><td>URE</td><td>β NAG</td><td>β GAL</td> </tr> <tr> <td colspan="3">7</td> <td colspan="3">3</td> <td colspan="3">2</td> <td colspan="3">4</td> </tr> </table>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	GLU	GAL	SAC	TRE	RAF	β MAL	α AMY	β XYL	β GUR	URE	β NAG	β GAL	7			3			2			4					BIOMÉRIEUX <small>Imprimé en France / Printed in France</small>
(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)																																								
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4																																								
GLU	GAL	SAC	TRE	RAF	β MAL	α AMY	β XYL	β GUR	URE	β NAG	β GAL																																								
7			3			2			4																																										
Autres tests / Other tests / Andere Tests / Outras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy :		Ident. / Ταυτοποίηση : <u>Candida kefir 99.9%</u>																																																	

ANEXO G Resultados API® Candida de la muestra recolectada de la planta 4 en la mañana en Cotopaxi

		REF: <u>C4AM</u>	<u>2,0,1,4 / 0,4 / 0,8</u>																																																
Origen / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :																																																			
<table border="1"> <tr> <td>(+)</td><td>(+)</td><td>(+)</td><td>(-)</td><td>(+)</td><td>(-)</td><td>(-)</td><td>(+)</td><td>(-)</td><td>(-)</td><td>(+)</td><td>(+)</td> </tr> <tr> <td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td> </tr> <tr> <td>GLU</td><td>GAL</td><td>SAC</td><td>TRE</td><td>RAF</td><td>β MAL</td><td>α AMY</td><td>β XYL</td><td>β GUR</td><td>URE</td><td>β NAG</td><td>β GAL</td> </tr> <tr> <td colspan="3">7</td> <td colspan="3">2</td> <td colspan="3">2</td> <td colspan="3">4</td> </tr> </table>	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	GLU	GAL	SAC	TRE	RAF	β MAL	α AMY	β XYL	β GUR	URE	β NAG	β GAL	7			2			2			4					BIOMÉRIEUX <small>Imprimé en France / Printed in France</small>
(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)																																								
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4																																								
GLU	GAL	SAC	TRE	RAF	β MAL	α AMY	β XYL	β GUR	URE	β NAG	β GAL																																								
7			2			2			4																																										
Autres tests / Other tests / Andere Tests / Outras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy :		Ident. / Ταυτοποίηση : <u>Candida kefir 99.9%</u>																																																	

ANEXO H Resultados API® Candida de la muestra recolectada de la planta 2 en la tarde en Pichincha

		REF: <u>P2 P17</u>	<u>2,0,1,4 / 0,4 / 0,8</u>																																																
Origen / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :																																																			
<table border="1"> <tr> <td>(+)</td><td>(+)</td><td>(+)</td><td>(-)</td><td>(+)</td><td>(-)</td><td>(-)</td><td>(+)</td><td>(-)</td><td>(-)</td><td>(+)</td><td>(+)</td> </tr> <tr> <td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td> </tr> <tr> <td>GLU</td><td>GAL</td><td>SAC</td><td>TRE</td><td>RAF</td><td>β MAL</td><td>α AMY</td><td>β XYL</td><td>β GUR</td><td>URE</td><td>β NAG</td><td>β GAL</td> </tr> <tr> <td colspan="3">7</td> <td colspan="3">2</td> <td colspan="3">2</td> <td colspan="3">4</td> </tr> </table>	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	GLU	GAL	SAC	TRE	RAF	β MAL	α AMY	β XYL	β GUR	URE	β NAG	β GAL	7			2			2			4					BIOMÉRIEUX <small>Imprimé en France / Printed in France</small>
(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)																																								
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4																																								
GLU	GAL	SAC	TRE	RAF	β MAL	α AMY	β XYL	β GUR	URE	β NAG	β GAL																																								
7			2			2			4																																										
Autres tests / Other tests / Andere Tests / Outras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy :		Ident. / Ταυτοποίηση : <u>Candida kefir 99.9%</u>																																																	

ANEXO I Bacterias ácido lácticas aisladas en medio MRS, asociadas a la savia de *Agave americana* L., recolectada en la provincia de Cotopaxi a las 9:00 am.

Código	Planta	Colonia	Bacteria Identificada
C1A1	1	1	<i>Leuconostoc citreum</i>
C1A2		2	<i>Lactobacillus fabifermentans</i>
C2A1	2	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
C2A2		2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
C3A1	3	1	<i>Lactobacillus kefir</i>
C3A2		2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
C4A1	4	1	<i>Leuconostoc citreum</i>
C4A2		2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
C5A1	5	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
C5A2		2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

ANEXO J Bacterias ácido lácticas aisladas en medio MRS, asociadas a la savia de *Agave americana* L., recolectado en la provincia de Cotopaxi a las 2:00 pm.

Código	Planta	Colonia	Bacteria Identificada
C1P1	1	1	<i>Lactobacillus kefir</i>
C1P2		2	<i>Lactobacillus kefir</i>
C2P1	2	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
C2P2		2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
C3P1	3	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
C3P2		2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
C4P1	4	1	<i>Lactobacillus plantarum</i>
C4P2		2	<i>Lactobacillus capillatus</i>
C5P1	5	1	<i>Lactobacillus fabifermentans</i>
C5P2		2	<i>Lactobacillus fabifermentans</i>

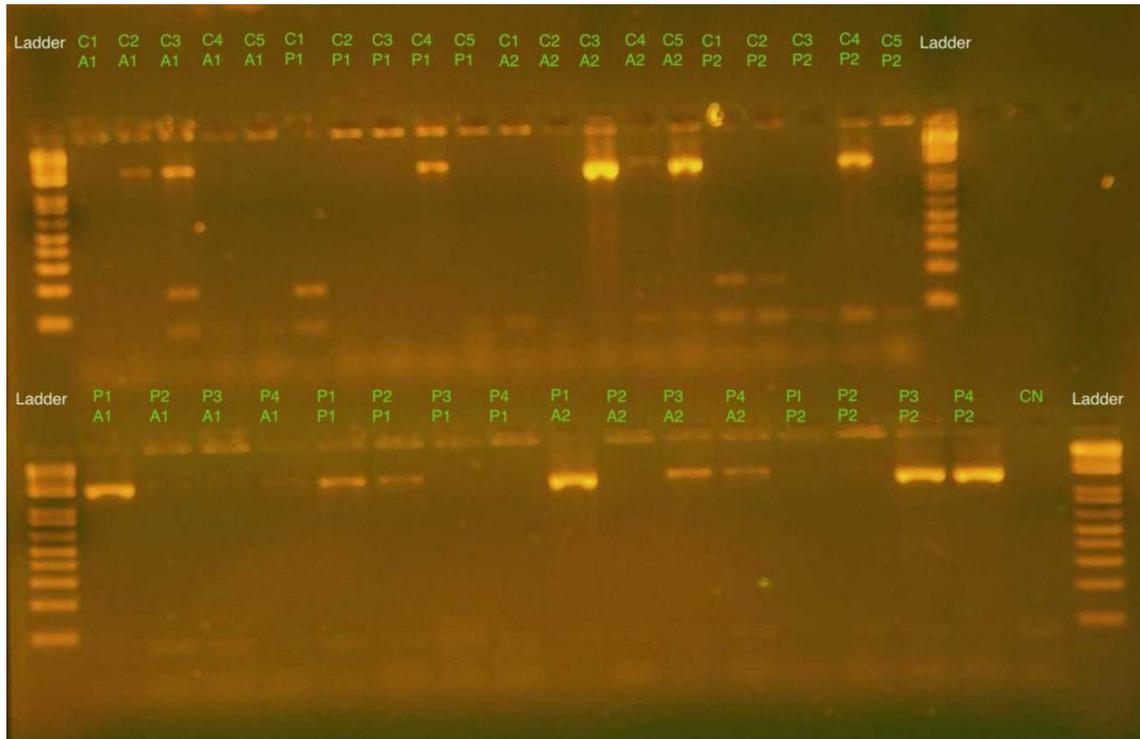
ANEXO K Bacterias ácido lácticas aisladas en el medio MRS, asociadas a la savia de *Agave americana* L., recolectado en la provincia de Pichincha a las 9:00 AM.

Código	Planta	Colonia	Bacteria Identificada
P1A1	1	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P1A2		2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P2A1	2	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P2A2		2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P3A1	3	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P3A2		2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P4A1	4	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P4A2		2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

ANEXO L Bacterias ácido lácticas aisladas en el medio MRS, asociadas a la savia de *Agave americana* L., recolectado en la provincia de Pichincha a las 2:00 pm.

Código	Planta	Colonia	Bacteria identificada
P1P1	1	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P1P2		2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P2P1	2	1	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
P2P2		2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P3P1	3	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P3P2		2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P4P1	4	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
P4P2		2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

ANEXO M PCR de ADNr 16S



ANEXO N PCR de ADNr 16S



ANEXO O PCR de ADNr 16S



ANEXO P Análisis de la varianza (ANOVA) del contenido de calcio de los tratamientos

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamientos	167,83	7	23,98	17,29*	<0,0001
Bloques	10,90	4	2,72	1,96 ^{n.s.}	0,1274
Factor A (Eco-tipo)	68,59	1	68,59	49,47*	<0,0001
Factor B (Jornada)	68,54	1	68,54	49,43*	<0,0001
Factor C (Ciclo)	0,38	1	0,38	0,27 ^{n.s.}	0,6065
Interacción AxB	7,66	1	7,66	5,52*	0,0261
Interacción AxC	20,14	1	20,14	14,52*	0,0007
Interacción BxC	1,94	1	1,94	1,40 ^{n.s.}	0,2473
Interacción AxBxC	0,59	1	0,59	0,43 ^{n.s.}	0,5194
Error	38,82	28	1,39		
Total	217,55	39			

*Significativo al 5% de probabilidad por la prueba de F

^{n.s.}No significativo al 5% de probabilidad por la prueba de F

ANEXO Q Análisis de la varianza (ANOVA) del contenido de magnesio de los tratamientos

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamientos	17,55	7	2,51	0,76 ^{n.s.}	0,6279
Bloques	9,76	4	2,44	0,74 ^{n.s.}	0,5732
Factor A (Eco-tipo)	7,78	1	7,78	2,36 ^{n.s.}	0,1359
Factor B (Jornada)	2,35	1	2,35	0,71 ^{n.s.}	0,4057
Factor C (Ciclo)	5,08	1	5,08	1,54 ^{n.s.}	0,2249
Interacción AxB	0,14	1	0,14	0,04 ^{n.s.}	0,8401
Interacción AxC	0,50	1	0,50	0,15 ^{n.s.}	0,7008
Interacción BxC	1,47	1	1,47	0,45 ^{n.s.}	0,5093
Interacción AxBxC	0,67	1	0,67	0,20 ^{n.s.}	0,6568
Error	92,41	28	3,30		
Total	120,16	39			

*Significativo al 5% de probabilidad por la prueba de F

^{n.s.}No significativo al 5% de probabilidad por la prueba de F

ANEXO R Análisis de la varianza (ANOVA) del contenido de carbohidratos de los tratamientos

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamientos	8947,52	7	1278,22	7,54*	<0,0001
Bloques	2368,90	4	592,23	3,49*	0,0196
Factor A (Eco-tipo)	3015,26	1	3015,26	17,79*	0,0002
Factor B (Jornada)	3357,51	1	3357,51	19,80*	0,0001
Factor C (Ciclo)	1145,65	1	1145,65	6,76*	0,0147
Interacción AxB	31,35	1	31,35	0,18 ^{n.s.}	0,6705
Interacción AxC	419,19	1	419,19	2,47 ^{n.s.}	0,1271
Interacción BxC	922,66	1	922,66	5,44*	0,0271
Interacción AxBxC	55,91	1	55,91	0,33 ^{n.s.}	0,5704
Error	4746,88	28	169,53		
Total	16063,30	39			

*Significativo al 5% de probabilidad por la prueba de F

^{n.s.}No significativo al 5% de probabilidad por la prueba de F