



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD
MANEJO INTEGRAL DE ECOSISTEMAS

INFLUENCIA DE LA MICROBIOTA Y EL MANEJO SOBRE LA CALIDAD DEL PULQUE

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

GONZALO DANIEL ÁLVAREZ RÍOS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEJANDRO CASAS FERNÁNDEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. MAYRA ELENA GAVITO PARDO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

DRA. ANA ISABEL MORENO CALLES

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA, UNAM

MORELIA, MICHOACÁN

MAYO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD
MANEJO INTEGRAL DE ECOSISTEMAS

INFLUENCIA DE LA MICROBIOTA Y EL MANEJO SOBRE LA CALIDAD DEL PULQUE

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

GONZALO DANIEL ÁLVAREZ RÍOS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEJANDRO CASAS FERNÁNDEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. MAYRA ELENA GAVITO PARDO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM
DRA. ANA ISABEL MORENO CALLES
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA, UNAM

MORELIA, MICHOACÁN

MAYO, 2019



OFICIO CPCB/501/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, en su sesión ordinaria del día 11 de marzo de 2019, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** al alumno **ÁLVAREZ RÍOS GONZALO DANIEL**, con número de cuenta **309047409**, con la tesis titulada, "**Influencia de la microbiota y el manejo sobre la calidad del pulque**", realizada bajo la dirección del **DR. ALEJANDRO CASAS FERNÁNDEZ**:

Presidente: Dr. Erick de la Barrera Montpellier
Vocal: Dr. José Juan Blancas Vázquez
Secretario: Dra. Mayra Elena Gavito Pardo
Suplente: Dr. Ernesto Vicente Vega Peña
Suplente: Dr. Pablo Fabián Jaramillo López

Sin otro particular, quedo de usted.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 26 de abril de 2019.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas y al Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, UNAM por permitirme realizar mis estudios de Maestría.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la realización de mis estudios. También al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) con el cual puse asistir al V Congreso Latinoamericano de Etnobiología y al XI Congreso Mexicano de Etnobiología.

A los proyectos de investigación que financiaron el trabajo de campo requerido:

- 1) Domesticación y manejo *in situ* de recursos genéticos en el Nuevo Mundo: Mesoamérica, la región andina, amazónica y del nordeste de Brasil. PAPIIT, DGAPA, UNAM Proyecto IN206217.
- 2) Domesticación y manejo *in situ* de recursos genéticos en el Nuevo Mundo: Mesoamérica, Los Andes y Amazonia. CONACYT, Proyecto CB-2013-01-221800.
- 3) Domesticación y manejo *in situ* de recursos genéticos en el Nuevo Mundo: Mesoamérica, Los Andes y Amazonia. CONACYT, Proyecto Ciencia Básica convocatoria 2018.
- 4) Red Temática del CONACYT Productos Forestales No Maderables: aportes desde la etnobiología para su aprovechamiento sostenible, Proyecto N° 293914.

El mayor agradecimiento, admiración y reconocimiento es para el Dr. Alejandro Casas Fernández, por dirigir esta tesis, darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, compartir su conocimiento, guiarme y apoyarme en todo momento. Agradezco a mi comité tutor, con su apoyo metodológico y conceptual, retroalimentaciones y sugerencias hicieron posible este trabajo, Dra. Mayra E. Gavito Pardo y Dra. Ana I. Moreno Calles muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Gracias a las familias de Tarímbaro y Santiago Undameo. Por su calidez, por su tiempo, por permitirme aprender de ustedes, por abrir las puertas de sus casas, de sus parcelas y de su memoria, por las palabras cautas, las advertencias, las explicaciones y las bromas, por invitarnos a probar la dulzura de su aguamiel y la efervescencia de sus historias.

Quiero agradecer al jurado encargado de enriquecer este trabajo con sus visiones: Dr. Ernesto V. Vega Peña, Dr. Erick de la Barrera Montppellier, Dr. José J. Blancas Vázquez y Dr. Pablo F. Jaramillo López. Agradezco también a: Dra. Carmen Julia Figueredo Urbina, Dra. Mariana Vallejo Ramos, M. en B. Ana Lidia Sandoval Pérez, M. en C. Estefanía Saucedo Correa y a la Biol. Yolanda Magdalena García Rodríguez por su apoyo en la colecta de datos en campo y en los experimentos de laboratorio.

A mi familia por su cariño, que aunque a la distancia es enorme.

A mis compañeros de laboratorio que siempre estuvieron dispuestos a ayudar tanto en las colectas de campo como en los experimentos en el laboratorio. Por sus comentarios y sugerencias a lo largo de esta investigación, la convivencia con ustedes siempre emanaba creatividad. Son rechidos: Hernán, Edna, Pau, Javier, Sele, Nacho, América, Paco, Zarazúa, Cesar, Fernando, Saúl, Vivi, Mario, gracias compas. Y al jefazo Dr. Casas, que va nuevo en esta sección por sus terapias dentro y fuera del aula, por sus brontosaurios y anécdotas que nos llenan la panza y el corazón.

A mis amigos que me acompañaron a tomar... datos. Sin ellos no habría logrado contactar a los productores, medir los magueyes, coleccionar los aguamieles y recabar tantos fantásticos testimonios entre las parcelas y los tarros de pulque. Regina, Saulo, Chava, Gerardo, Gio, Calleros, Alexis, Yessi, requetegracias por acompañarme en este proceso.

La mención honorífica se la lleva Lucía Pérez. No solo le echó varias revisadas a este documento, presencié ensayos de tutorales, midió magueyes, contó bichitos, registró grados Brix con el refractómetro y con el paladar, no le gustaba el pulque, pero como que ya le agarró cariño. Por todo el apoyo durante esos colapsos físicos y mentales, por curar toses, alergias, empachos y mal de ojo, por preparar café, compartir dulces y cocinar improvisadamente delicioso ¡gracias Lu!

La presente investigación se realizó con base en los estatutos del **Código de Ética para la investigación, la investigación-acción y la colaboración etnociencia en América Latina**, de la Sociedad Latinoamericana de Etnobiología (SOLAE).

Al inicio de la investigación se estableció un primer contacto con las personas de las comunidades, se les presentó el proyecto, sus objetivos y métodos, preguntando si estaban interesados en participar. Con las personas interesadas se estableció una comunicación sincera y cordial, respetando y asumiendo las normas, tiempos y espacios locales. Los materiales recabados para generar esta investigación (testimonios escritos, audios, fotografías, videos, muestras de tejido de agave, savia y pulque) fueron solicitados previamente a los integrantes de las comunidades y fue aprobada su utilización dentro de esta investigación, con el compromiso de entregarles los resultados y materiales derivados.

A lo largo del trabajo se ofreció información clara y asequible a los colaboradores sobre los avances del proyecto. Garantizando, que dicha colaboración no será utilizada para causar ningún tipo de perjuicio a la comunidad o a terceros. Tanto en las relaciones al interior del equipo de trabajo etnociencia, como con las comunidades, se promovió el respeto, la equidad y el buen trato, y se evitó cualquier conducta de discriminación o violencia.

Declaro que en ningún momento haré uso de la información etnociencia para beneficio económico propio, institucional o privado, sin previa autorización por escrito y firmada de las comunidades. Los recursos, prácticas y saberes presentados en esta investigación forman parte del patrimonio biocultural de las comunidades con las que se colaboró, por lo tanto no pueden ser apropiables por terceros con fines de lucro.

Gonzalo D. Álvarez Ríos

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I) INTRODUCCIÓN	5
1.1 LOS MAGUEYES EN MÉXICO, SU MANEJO Y DOMESTICACIÓN.....	5
1.2 EL PULQUE	9
1.3 EL MANEJO Y LA DOMESTICACIÓN DE MICROORGANISMOS FERMENTADORES.....	11
II. ANTECEDENTES	20
EL PULQUE EN MICHOACÁN	20
III) JUSTIFICACIÓN	26
IV) HIPÓTESIS	27
V) OBJETIVOS	27
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	27
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	27
VI) MARCO CONCEPTUAL	28
VII) METODOLOGÍA	30
7.1 SITIO DE ESTUDIO	30
7.2 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE INFORMACIÓN	31
VIII. RESULTADOS	36
8.1 EL MANEJO DEL MAGUEY Y EL PULQUE.....	36
8.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA BEBIDA.....	52
8.3 LOS MICROORGANISMOS FERMENTADORES.....	57
IX. DISCUSIÓN	69
9.1 LOS AGAVES PULQUEROS EN LOS SISTEMAS AGRÍCOLAS	69
9.2 IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS FERMENTADORES	72
9.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS, SABOR E IDENTIDAD	76
9.4 EL PAPEL DEL AGUAMIEL Y EL PULQUE EN LAS COMUNIDADES RURALES DE MÉXICO.....	81
X. CONCLUSIONES	83
EL MAGUEY COMO EJE DEL MANEJO SUSTENTABLE	83
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
XII. ANEXOS	92
ANEXO 1. ENTREVISTA A PRODUCTORES	92
ANEXO 2. PROTOCOLO PARA EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS TOTALES.....	93
ANEXO 3. PROTOCOLOS PARA DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS	94
ANEXO 4. TABLAS DE DATOS	96

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Ejemplos de los principales usos y partes de diferentes especies de magueyes aprovechadas	8
Tabla 2. Taxones de <i>Agaves</i> aprovechados como bebida fermentada, pulque	10
Tabla 3. Productores entrevistados y actividades a las que se dedican.....	36
Tabla 4. Promedio \pm error estándar de las características físicas y químicas por localidad.....	52
Tabla 5. Promedio \pm error estándar de las características físicas y químicas de las fases de la bebida	54
Tabla 6. Promedio \pm error estándar de colonias (UFC) registradas en los tres medios de cultivo.....	60
Tabla 7. Promedio \pm error estándar de la riqueza de morfotipos e índice de Shannon	60
Tabla 8. Abundancias de bacterias ácido lácticas (UFC/mL) en muestras de aguamiel y pulque.....	72
Tabla 9. Características físicas y químicas de aguamiel y el intervalo establecido por la NMX.....	76
Tabla 10. Características físicas y químicas de pulque y el intervalo establecido por la NMX	77
Tabla 11. FA (promedio \pm ES) reportados para cada tratamiento	96
Tabla 12. FA (promedio \pm ES) de los grupos de microorganismos para cada tratamiento.....	97
Tabla 13. Porcentajes de FA (promedio \pm ES) de los grupos de microorganismos.....	98
Figura 1. Ejemplos del síndrome de domesticación de los <i>Agaves</i>	9
Figura 2. Elaboración y consumo de pulque en México	11
Figura 3. Diagrama de reinoculaciones.....	13
Figura 4. Gradiente de manejo de microorganismos fermentadores.....	17
Figura 5. A) Cientos de espinas terminales de maguey.....	21
Figura 6. Lámina XXXII de “La Relación de Michoacán”	23
Figura 7. Lámina XLIV de “La Relación de Michoacán”.....	25
Figura 8. Superficie (en hectáreas) cultivada con maguey pulquero en México.....	26
Figura 9. Marco conceptual del sistema: manejo, microbiota y bebida.....	29
Figura 10. Mapa de las localidades de estudio	30
Figura 11. A) Magueyes delimitando una parcela	37
Figura 12. Variedades de maguey utilizadas para elaboración de pulque en SU y T	40
Figura 13. Análisis de componentes principales de variedades de maguey	41
Figura 14. Dendrograma de las variedades de maguey.....	43
Figura 15. A) Fila de magueyes pequeños con un año de trasplante	46
Figura 16. Maguey “Verde” (<i>A. salmiana</i> var. <i>salmiana</i>)	47
Figura 17. Maguey “Listoncillo” (<i>A. mapisaga</i> var. <i>mapisaga</i>).....	47
Figura 18. A) Colado de aguamiel fresca en olla para hervir (SU).....	50
Figura 19. Los productores venden su pulque en sus hogares, otros además lo llevan a tianguis.....	50
Figura 20. Análisis de componentes principales de los productores.....	51
Figura 21. Gráficos de caja y bigotes de las características físicas y químicas	53
Figura 22. Cinética de la bebida	56
Figura 23. Análisis de componentes principales (ACP) de las características físicas y químicas	57
Figura 24. Gráfico barras de las abundancias de A) bacterias ácido lácticas y B) de levaduras.....	59
Figura 25. Riqueza de morfotipos de UFC de A) bal y B) levaduras en los diferentes tratamientos	61
Figura 26. Gráfico de barras (promedio \pm error estándar) del índice de diversidad de Shannon.....	62
Figura 27. Gráficos de pastel acerca del porcentaje de los morfotipos presentes en cada fase-sitio.....	63
Figura 28. Fotos de M5, M8 y M19 al estereoscopio (de izquierda a derecha).....	64
Figura 29. Fotos de S10 y S16 al estereoscopio (de izquierda a derecha).....	64
Figura 30. Porcentajes (promedio \pm ES) de los grupos de microorganismos en los tratamientos	65
Figura 31. Porcentajes (promedio \pm ES) de la condición de estrés en los tratamientos.....	66
Figura 32. Análisis de componentes principales de los ácidos grasos presentes en la bebida (2017)	68
Figura 33. Análisis de componentes principales de los ácidos grasos presentes en la bebida (2018).....	68
Figura 34. Kit de destilación.....	95

RESUMEN

El género *Agave* se distribuye de manera natural desde el sur de EUA hasta Venezuela y Colombia, siendo México el principal centro de diversificación del género. De los 247 taxones registrados para el género, cerca del 75% están presentes en México, y el 57% de ellos endémicos. Estas plantas han sido intensamente utilizadas por diversos grupos humanos desde hace más de 10,000 años, y actualmente resultan recursos fundamentales pues satisfacen diferentes necesidades tales como alimentos, fibra, bebidas, medicinas, cercas vivas y bordos. El pulque es una bebida alcohólica elaborada a partir de la fermentación de la savia dulce de alrededor de 40 taxones de *Agave* spp. Hay registros de la elaboración y consumo de pulque en 20 entidades del país, exceptuando los estados del noroeste y la península de Yucatán.

La savia de los agaves al contener azúcares, aminoácidos y minerales, constituye un rico y favorable medio de cultivo para diversas especies de microorganismos. Éstos están naturalmente asociados a los agaves y se desplazan a las paredes de la cavidad o son introducidos por el aire, o a través de utensilios empleados en la extracción de la savia. La microbiota funcional (bacterias ácido lácticas y levaduras) lleva a cabo la fermentación consumiendo los azúcares de la savia y produciendo nuevos compuestos como ácido láctico, polímeros y alcohol.

El objetivo de este trabajo fue identificar los efectos conjuntos que las prácticas de manejo y los grupos microbianos tienen sobre las características del pulque, así como comprender cómo responden las comunidades de microorganismos a su manejo diferenciado. El estudio se realizó en dos localidades productoras de pulque en Michoacán: Tarímbaro (T) y Santiago Undameo (SU). Se realizaron entrevistas semi-estructuradas y estudios morfométricos de agaves para la caracterización de los sistemas de manejo y los agaves que los componen, cultivo de colonias de microorganismos y perfiles de ácidos grasos para la caracterización de la comunidad microbiana, así como una caracterización de acidez, densidad, viscosidad, contenido de alcohol y azúcar para las diferentes fases de la bebida.

En ambas localidades se registraron 4 variedades de agave, siendo la más utilizada en SU *A. salmiana*, mientras que en T fueron *A. salmiana* y *A. mapisaga*. Otras variedades son menos utilizadas debido a características que no favorecen su manejo como mayor presencia de espinas y menor volumen de savia. Cada productor tiene entre 10 y 15 magueyes en producción, de los cuales extraen en promedio 32 L (en T), y 26 L (en SU) de savia al día.

En ambas comunidades la fermentación se produce a través de una reinoculación, mezclando la savia fresca con un pulque añejo. La diferencia de manejo entre las comunidades resulta en que en SU hierven la savia una vez colectada y después mezclan con el pulque añejo, mientras que en T no hierven la savia. Las abundancias de unidades formadoras de colonias de bacterias ácido lácticas en la savia fresca fueron 2.9×10^8 en SU y 3.5×10^8 en T. Por su parte en la savia hervida se registraron 7×10^6 , mientras que en pulque resultaron 3.1×10^8 en SU y 1.9×10^8 en T. En el caso de las levaduras se reportan 3×10^8 en la savia fresca de SU y 3.4×10^8 en T, 8×10^6 en la savia hervida y en el pulque se registran 2.5×10^8 en SU y 1.5×10^8 en T.

Esta información muestra un efecto del manejo sobre la comunidad de microorganismos presentes en la savia, pues se presentó una reducción en el número de colonias, entre la savia hervida y aquella sin hervir. Se encontró una menor diversidad de morfotipos en los pulques de SU ($H' = 0.98$) que en los de T ($H' = 1.33$). Sin embargo, los resultados derivados de los perfiles de ácidos grasos no muestran una reducción en la cantidad de microorganismos presentes en las savias hervidas. La práctica del hervor aumenta la cantidad de azúcares en la savia y la torna menos ácida. En las características físicas y químicas que se midieron no se reportan diferencias entre los pulques elaborados con savia hervida (SU) y los pulques hechos con savia sin hervir (T). No obstante, el hervor de la savia resulta uno de los componentes de la cultura e identidad de estas comunidades productoras.

Los sistemas de producción de agave, los contextos de manejo de la savia y las preferencias de los manejadores resultan determinantes en los atributos de la bebida tanto microbiológicos como físicos y químicos. Se propone una documentación extensiva de los atributos de los pulques y las comunidades de microorganismos como una estrategia para caracterizar estos valiosos recursos genéticos de México, así como una base para entender procesos de manejo y domesticación de microorganismos en Mesoamérica, una de las principales regiones de domesticación en el mundo.

ABSTRACT

The botanical genus *Agave* is naturally distributed across the American continent, ranging from the southern USA to Venezuela and Colombia. Mexico is the main center of diversification of this genus. Out of 247 taxa that are registered for the genus, about 75% occur in Mexico and 57% of them are endemic. These plants have been intensely used by several human groups for more than 10,000 years, and currently they are fundamental resources because they satisfy different needs such as food, fiber and beverage. Pulque is an alcoholic beverage prepared from the fermentation of the sweet sap of approximately 40 taxa of *Agave* spp. There are records of the production and consumption of pulque in 20 Mexican states, except for the Northwestern states and those in the Yucatan peninsula.

The sap of agaves contains water, sugars, amino acids and minerals, and it is a rich and favorable medium for various species of microorganisms. These microorganisms are naturally associated with the agave and move to the walls of the cavity, or are introduced by air, or through utensils used in the extraction of the sap. The functional microbiota (lactic acid bacteria and yeasts) will carry out the fermentation by consuming sugars in the sap and producing new compounds such as lactic acid, polymers and alcohol.

This study aims to identify the joint effects that management practices and microbial diversity have on the characteristics of pulque, as well as to understand how communities of microorganisms respond to different management schemes. The study was conducted in two pulque-producing locations in Michoacán: Tarímbaro (T) and Santiago Undameo (SU). Semi-structured interviews and determination of agave morphometry were carried in order to characterization of the management practices and agave species involved. Additionally, microbial communities were cultured and their fatty acid profiles were determined. Finally, characterization of acidity, density, viscosity, content of alcohol and sugar for the various phases of the pulque production.

In both locations, 4 varieties of agave were registered, being *A. salmiana* the most used in SU, while in T, *A. salmiana* and *A. mapisaga* were preferred. The other varieties are used less due to characteristics that do not favor their management, such as greater presence of spines and lower volume of sap. Each producer has between 10 and 15 agaves in production, from which they extract an average of 32 L (in T), and 26 L (in SU) of sap per day. The fermentation in both communities

takes place through re-inoculation, which means mixing the fresh sap with an old pulque. The difference of management between the communities results in that in SU, the pulque producers boil the sap once collected and then they mix it with old pulque, while in T they do not boil the sap. The abundance of colony forming units of lactic acid bacteria in fresh sap were 2.9×10^8 in SU and 3.5×10^8 in T, in the boiled sap, 7×10^6 were recorded, while in pulque they were 3.1×10^8 in SU and 1.9×10^8 in T. Regarding yeasts abundance, 3×10^8 were reported in the fresh sap of SU and 3.4×10^8 in T, 8×10^6 in the boiled sap and in pulque, 2.5×10^8 in SU and 1.5×10^8 in T, were recorded.

Results from this study shows an effect of the management on the community of microorganisms present in the sap, since there was a reduction in the number of colonies, between the boiled and unboiled sap. In addition, a lower diversity of morphotypes was reported in SU pulques ($H' = 0.98$) than in those from T ($H' = 1.33$). However, the results derived from the fatty acid profiles do not show a reduction in the number of microorganisms present in the boiled saps. The practice of boiling increases the amount of sugar in the sap and makes it less acidic. In the physicochemical characteristics that were measured, no differences were reported between the pulques made with boiled sap (SU) and the pulques made with unboiled sap (T). However, the boiling of the sap is one of the components of the culture and identity of these pulque producing communities,

Agave production systems, sap management contexts and the preferences of producers are determinant in the microbiological and physicochemical attributes of the beverage. We suggest that extensive documentation of the attributes of pulque and its microbial communities should be a key research strategy for characterizing these valuable genetic resources of Mexico, as well as for understanding management practices and domestication of microorganisms in Mesoamerica, one of the main regions of domestication of the world.

I) INTRODUCCIÓN

1.1 Los magueyes en México, su manejo y domesticación

Los magueyes son plantas xerófitas que constituyen el género *Agave*. Estas plantas poseen adaptaciones a condiciones de periodos prolongados de sequía, entre las que destacan su característica forma de roseta, su tallo grueso y corto, así como su sistema extendido de raíces superficiales, que les permite incrementar su capacidad de captación de agua (Gentry, 1982; Eguiarte y Souza, 2007). Son plantas suculentas, cuyas hojas constituyen verdaderos almacenes de agua y poseen metabolismo CAM (Crassulacean Acid Metabolism), en el cual el intercambio gaseoso ocurre durante las noches, minimizando así la pérdida de agua de los tejidos (García-Mendoza, 2002; 2011). Además, presentan eficaces mecanismos de defensa contra herbívoros, como por ejemplo la fibrosidad de las hojas con una cutícula resistente, un elevado contenido de saponinas (metabolitos secundarios tóxicos), dientes laterales y una espina terminal prominente (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2017; Figueredo-Urbina *et al.*, 2018).

Los agaves se distribuyen de manera natural desde el sur de Estados Unidos de América, pasando por el Caribe, hasta Venezuela y Colombia, siendo México el principal centro de diversificación del género. Así, de los 247 taxones específicos e intraespecíficos registrados para el género, cerca del 75% están presentes en el territorio nacional y el 69% son endémicos (García-Mendoza *et al.*, 2019). La gran diversidad de especies de *Agave* está presente en diferentes ecosistemas del país, son mayormente representativas de los ecosistemas áridos y semiáridos, pero también se distribuyen en las zonas montañosas templadas y húmedas del Eje Neovolcánico (Figueredo *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2015; García-Mendoza *et al.*, 2019).

Su abundancia y distribución han sido aprovechadas por diferentes grupos humanos a lo largo de la historia. Hallazgos arqueológicos en cuevas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán muestran que los agaves fueron parte muy importante de la dieta de los cazadores-recolectores de esa región, especialmente durante las fases Ajuereado y El Riego, de hace aproximadamente entre 12,000 a 8,000 años (MacNeish, 1967). Tales registros se refieren a restos masticados y escupidos de magueyes cocidos, así como restos de fibras encontrados en coprolitos humanos colectados en diferentes pisos que representan distintos momentos de ocupación humana de las cuevas de la región referida (Callen, 1967; Smith, 1967).

La presencia de estas plantas continuó con el desarrollo de las sociedades agrícolas. Se cuenta con evidencia sobre el papel preponderante que tuvieron los magueyes en la satisfacción de

diferentes necesidades humanas: alimento, medicinas, bebidas, confección de vestimenta y construcción. Existen registros arqueológicos y fuentes etnohistóricas sobre estos usos en documentos prehispánicos y del periodo colonial, tales como la Tira de la Peregrinación, el Códice de la Cruz-Badiano, la Matrícula de Tributos y el Códice Florentino (Goncalves de Lima, 1986).

De tal forma que los agaves se mantuvieron como un pilar en el desarrollo de las culturas mesoamericanas y, con distintos grados de importancia, estas incorporaron diversos usos de los agaves a su medios de vida y cosmovisiones. Aunado a lo anterior, los grupos culturales mesoamericanos han detonado una diversificación del género a partir de procesos de domesticación, con base en el reconocimiento de distintas cualidades y productos de las diferentes especies. De acuerdo con Gentry (1982) “... fue aquí (en Mesoamérica), en donde la gran diversidad genética de un género rico en usos potenciales cayó en manos de los pueblos que desarrollaron el principal centro de agricultura de las Américas”.

En la actualidad los magueyes son elementos clave de los sistemas de producción y manejo de recursos naturales campesinos, satisfaciendo necesidades y siendo medios de subsistencia para miles de familias mexicanas (Tabla 1). Ejemplos de ello son los 107 taxa de agaves utilizados actualmente en México, nombrados de 570 formas distintas por 26 idiomas nativos (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2017), los 34 usos de *Agave inaequidens* que registraron en comunidades de Michoacán Torres *et al.* (2015), las miles de manos que laboran en la industria tequilera de Jalisco (Hernández-López, 2014) y en la elaboración artesanal e industrial de mezcal en cientos de comunidades rurales del país (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2007), así como los sistemas de producción de pulque en el centro de México, en los que los agricultores, tlachiqueros, distribuidores y jicareros¹ producen y manejan alrededor de 10,000 L semanales tan solo en la capital del país (Álvarez, 2015).

Para analizar el papel de los magueyes en las sociedades pasadas y vigentes es particularmente útil el concepto de “manejo”. Éste se refiere a las prácticas e intervenciones humanas que buscan transformar, adecuar o mantener elementos, procesos o sistemas de la naturaleza con un propósito cultural (Casas *et al.*, 2014). El manejo de los magueyes, a lo largo de miles de años ha propiciado la domesticación de algunas especies. La domesticación es un proceso

¹ “Tlachiquero” del náhuatl *tlahchiqui*: raspar una cosa, son las personas que se dedican a extraer la savia del maguey (Montemayor *et al.*, 2008). “Jicarero” son las personas que se dedican a atender y servir el pulque en las pulquerías, viene de jícara, con las cuales comúnmente se servía y bebía la bebida (Álvarez, 2015).

por el cual las poblaciones de plantas, animales, bacterias u hongos, experimentan una serie de cambios fenotípicos y genotípicos, que suelen ser graduales y continuos, como consecuencia de la reproducción diferencial de los individuos favorecidos por los humanos, a través de una selección consciente o inconsciente (Darwin, 1859; Pickersgill, 2007). Al conjunto de características, que diferencia a los organismos domesticados de sus ancestros silvestres de los cuales fueron domesticados, se le conoce como síndrome de domesticación (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2017).

Como consecuencia de este proceso, las poblaciones de organismos bajo domesticación llegan a divergir con respecto a las poblaciones de sus ancestros silvestres. Comúnmente los atributos seleccionados por los seres humanos confieren a los organismos domesticados una baja adecuación en los contextos silvestres, en donde son más exitosos aquellos organismos también silvestres que han sido moldeados por la selección natural. Tal divergencia es posible apreciarse en rasgos morfológicos, fisiológicos, reproductivos y genéticos (Casas *et al.*, 2016).

La antigua y continua interacción entre seres humanos y agaves ha generado en las plantas la expresión de tal síndrome de domesticación; teniendo efectos morfológicos, fisiológicos y genéticos relacionados con las necesidades que los humanos han buscado satisfacer. Para caracterizar el síndrome de domesticación de agaves se han propuesto cuatro propósitos utilitarios principales: alimento, fibra, bebidas fermentadas y no fermentadas (pulque y aguamiel, respectivamente) y bebidas destiladas o mezcales (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2017).

Dentro de las especies cultivadas para el uso de bebidas como aguamiel y pulque, tenemos que los rasgos favorecidos por la selección artificial son principalmente: 1) mayor cantidad y calidad (mayor contenido de azúcares) de la savia, 2) gigantismo de la planta, 3) disminución en cantidad y tamaño de los dientes, una característica que facilita su manipulación; 4) variantes con concentraciones bajas de saponinas, y 5) variantes con mayor producción de propágulos (Mora-López, 2011; Figueredo *et al.*, 2014; Leal-Díaz *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2015; Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2017). *Agave salmiana* y *A. mapisaga* son dos de las especies de *Agave* más cultivadas con fines pulqueros y en las cuales estas líneas de selección artificial se expresan notablemente (Figura 1).

Tabla 1. Ejemplos de los principales usos y partes de diferentes especies de magueyes aprovechadas en México. Con información de Granados (1993); Delgado (2008); García-Herrera *et al.* (2010); Torres *et al.* (2015); Colunga-GarcíaMarín *et al.* (2017).

Categoría	Uso	Parte de la planta	Ejemplos de spp. utilizadas
Alimenticio	Aguamiel	Piña	<i>A. atrovirens</i> , <i>A. salmiana</i>
	Atole	Aguamiel	<i>A. americana</i> , <i>A. salmiana</i>
	Pulque	Aguamiel	<i>A. mapisaga</i> , <i>A. salmiana</i>
	Mezcal	Piña y aguamiel	<i>A. angustifolia</i> , <i>A. potatorum</i>
	Miel	Aguamiel	<i>A. americana</i> , <i>A. inaequidens</i>
	Vinagre	Aguamiel	<i>A. atrovirens</i> , <i>A. inaequidens</i>
	Escamoles (<i>Liometopum apicalatum</i> , <i>L. occidentale</i>)	Raíz	<i>A. atrovirens</i> , <i>A. salmiana</i>
	Gusanos rojos (<i>Comadia redtenbacheri</i>)	Raíz	<i>A. mapisaga</i> , <i>A. salmiana</i>
	Gusanos blancos (<i>Aegiale hesperiaris</i>)	Penca	<i>A. salmiana</i> , <i>A. tequilana</i>
	Sal de gusano	Gusano de raíz o penca	<i>A. mapisaga</i> , <i>A. salmiana</i>
	Partes comestibles	Penca, tallo, escapo floral y flor	<i>A. kerchovei</i> , <i>A. peacockii</i>
	Mixiote	Penca	<i>A. mapisaga</i> , <i>A. salmiana</i>
	Medicinal	Desinflamar golpes o heridas	Penca
Malestares respiratorios		Penca	<i>A. potatorum</i>
Detener sangrado		Penca	<i>A. potatorum</i>
Regular la presión		Aguamiel	<i>A. inaequidens</i>
Gastritis		Aguamiel	<i>A. inaequidens</i>
Textil	Aguja	Espina	<i>A. atrovirens</i> , <i>A. salmiana</i>
	Hilos para telas	Fibra de pencas	<i>A. lechuguilla</i> , <i>A. striata</i>
	Cuerdas para caza y pesca	Fibra de pencas	<i>A. fourcroydes</i> , <i>A. lechuguilla</i>
Construcción	Vigas	Escapo seco	<i>A. kerchovei</i> , <i>A. salmiana</i>
	Tejas	Pencas secas	<i>A. atrovirens</i> , <i>A. salmiana</i>
	Aditivo para mezcla	Pencas maceradas	<i>A. atrovirens</i> , <i>A. salmiana</i>
Uso doméstico	Jabón	Raíz y penca	<i>A. lechuguilla</i>
	Recipiente para agua	Piña	<i>A. mapisaga</i> , <i>A. salmiana</i>
	Recipiente para comer o beber	Penca	<i>A. atrovirens</i> , <i>A. salmiana</i>
	Adorno	Penca, semilla y maguey completo	<i>A. potatorum</i> , <i>A. victoriae-reginae</i>
	Combustible	Pencas secas	<i>A. inaequidens</i> , <i>A. salmiana</i>
Agrícola	Abono	Restos secos	<i>A. americana</i> , <i>A. atrovirens</i>
	Protección contra erosión	Maguey completo	<i>A. mapisaga</i> , <i>A. salmiana</i>
	Deslinde de terrenos	Maguey completo	<i>A. mapisaga</i> , <i>A. salmiana</i>
Ganadero	Alimento para ganado	Penca, escapo floral y flor	<i>A. avellanidens</i> , <i>A. shawii</i>
	Control de parásitos	Penca	<i>A. inaequidens</i>
	Aliviar contusiones	Penca	<i>A. inaequidens</i>

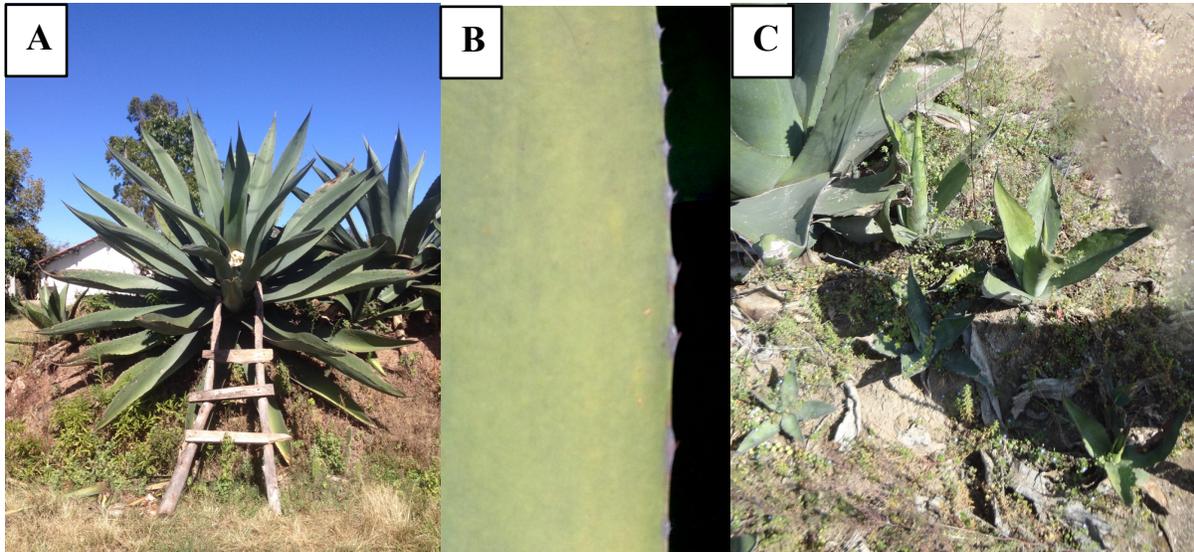


Figura 1. Ejemplos del síndrome de domesticación de los *Agaves*: A) gigantismo, B) reducción del número y tamaño de dientes laterales, C) abundante producción de propágulos.

1.2 El pulque

Uno de los principales usos que tienen los magueyes es la elaboración de bebidas consumidas en fresco, sin fermentar, o aguamiel²; o bien, bebidas fermentadas como los pulques, y los destilados de fermentos llamados mezcales. El caso que analizamos en esta investigación es el del pulque, bebida fermentada elaborada con la savia de diferentes especies de *Agave*. Su aprovechamiento y consumo se extiende por Mesoamérica, siendo éste uno de los rasgos culturales que fueron reconocidos por Kirchoff (1943) como característicos de la región, que la hacen distintiva de otras regiones bioculturales del continente americano, como la región de Aridoamérica, la Andina y la Amazonia.

Entre los magueyes de mayor vocación pulquera se encuentran *Agave salmiana*, *A. mapisaga*, *A. americana*, *A. atrovirens*, *A. inaequidens* y *A. hookeri*, domesticados y cultivados principalmente en Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Michoacán, Edo. de México y la Ciudad de México. No obstante, hay registros de la elaboración y consumo de pulque en 20 entidades del país, exceptuando los estados del noroeste y la península de Yucatán (Fig. 2; Álvarez 2015; Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2017). Se han registrado al menos 41 taxones de *Agave* entre especies,

² Nombre común que recibe la savia de los magueyes, nótese que el nombre de aguamiel denota sus atributos y valoración.

subespecies y variedades (sin contabilizar las variedades locales reconocidas por los manejadores) utilizadas para la producción de pulque en distintas regiones del territorio nacional (Tabla 2).

Tabla 2. Taxones de *Agaves* aprovechados como bebida fermentada, pulque. Con base en información de Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2007.

Especies, subespecies y variedades de <i>Agaves</i> pulqueros	
1 <i>Agave americana</i> ssp. <i>protamericana</i>	22 <i>Agave mapisaga</i> var. <i>mapisaga</i>
2 <i>Agave americana</i> var. <i>americana</i>	23 <i>Agave marmorata</i>
3 <i>Agave americana</i> var. <i>marginata</i>	24 <i>Agave maximiliana</i>
4 <i>Agave americana</i> var. <i>oaxacensis</i>	25 <i>Agave maximiliana</i> var. <i>katharinae</i>
5 <i>Agave angustifolia</i>	26 <i>Agave multiflora</i>
6 <i>Agave applanata</i>	27 <i>Agave palianthiflora</i>
7 <i>Agave atrovirens</i>	28 <i>Agave parryi</i>
8 <i>Agave atrovirens</i> var. <i>mirabilis</i>	29 <i>Agave peacockii</i>
9 <i>Agave bovicornuta</i>	30 <i>Agave salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i>
10 <i>Agave cerulata</i> ssp. <i>dentiens</i>	31 <i>Agave salmiana</i> var. <i>angustifolia</i>
11 <i>Agave cupreata</i>	32 <i>Agave salmiana</i> var. <i>ferox</i>
12 <i>Agave desmettiana</i>	33 <i>Agave salmiana</i> var. <i>salmiana</i>
13 <i>Agave fourcroydes</i>	34 <i>Agave scabra</i> ssp. <i>potosiensis</i>
14 <i>Agave hookeri</i>	35 <i>Agave schottii</i>
15 <i>Agave inaequidens</i>	36 <i>Agave shrevei</i> ssp. <i>shrevei</i>
16 <i>Agave karwinskii</i>	37 <i>Agave shrevei</i> ssp. <i>magna</i>
17 <i>Agave kerchovei</i>	38 <i>Agave striata</i>
18 <i>Agave lechuguilla</i>	39 <i>Agave vilmoriniana</i>
19 <i>Agave macroacantha</i>	40 <i>Agave wacomahi</i>
20 <i>Agave macroculmis</i>	41 <i>Agave weberi</i>
21 <i>Agave mapisaga</i> var. <i>lisa</i>	

Para el aprovechamiento del pulque, los productores dejan que el maguey se desarrolle y alcance su estado de madurez, aprovechándolo justo al iniciar la floración (generalmente entre los 8 y 12 años). En esta etapa los manejadores cortan algunas pencas de la planta con el fin de tener acceso al meristemo apical, ahí se hace una cavidad con una profundidad de aproximadamente 40 cm en el tallo basal. El orificio resultante es cubierto con trozos de las pencas removidas, y días o semanas después (dependiendo de la forma de aprovechamiento y necesidad de cada productor) comenzará a colectarse la savia, que emana y se acumula en la oquedad (Fournier, 2007; Álvarez, 2015).

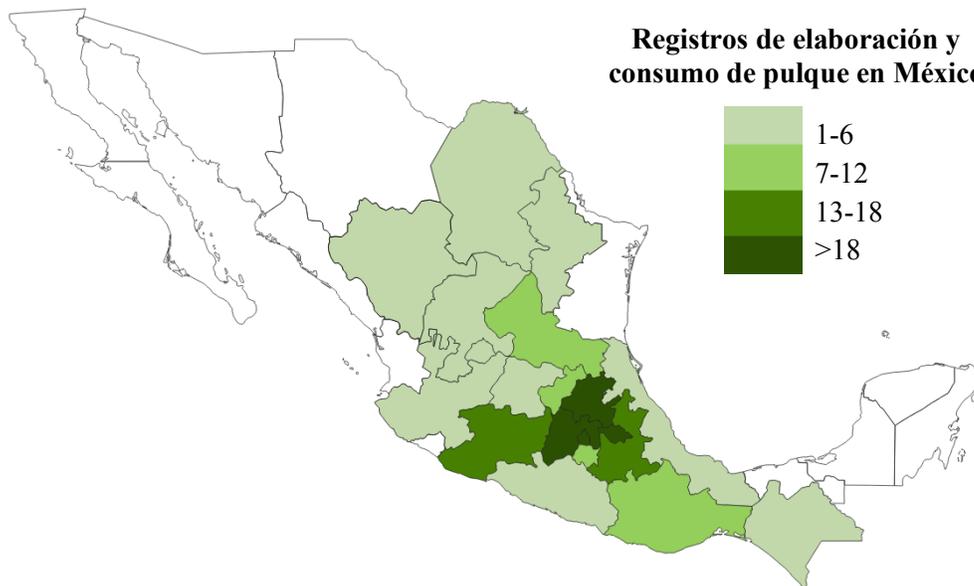


Figura 2. Elaboración y consumo de pulque en México. De una revisión de 70 trabajos (entre artículos y libros) se generó este mapa con un gradiente de color para las entidades con mayor vocación pulquera. La frecuencia de mención de mayor a menor es la siguiente: Hidalgo, Edo. de Méx. (27), Tlaxcala (25), CDMX (20), Michoacán (16), Puebla (15), Morelos (12), Oaxaca (8), SLP., Querétaro (7), Coahuila, Veracruz (6), Nvo. León, Jalisco (4), Durango, Zacatecas (4), Aguascalientes, Guanajuato (2), Chiapas y Guerrero (1). Para el resto de las entidades no se halló registro de la actividad pulquera.

La colecta de aguamiel se lleva a cabo diariamente y comprende un periodo de 3 a 8 meses, dependiendo de la especie y el tamaño del individuo, y después de este periodo, la planta que ha sido aprovechada muere. Una vez que se recolectó el aguamiel, se mezcla con un pulque añejo, denominado en diferentes regiones “semilla”, “pie” o “asiento”, el cual ha sido seleccionado y cuidado como el ideal para efectuar el delicado proceso de elaboración del pulque (Ramírez-Rodríguez, 2004; Álvarez, 2015). Este pulque añejo es el resultado de un proceso de fermentación en el que confluyen poblaciones de diversas especies de bacterias y levaduras de las que hablaremos con detalle más adelante. Sus cualidades, junto a las características del aguamiel, la especie de *Agave* utilizada, y las técnicas de los manejadores para mezclar los componentes, determinan las particularidades organolépticas de la bebida (Escalante *et al.*, 2016).

1.3 El manejo y la domesticación de microorganismos fermentadores

La fermentación de diversos frutos, tejidos vegetales, semillas y savias con fines alimenticios es una estrategia de obtención de alimentos muy antigua, la cual posiblemente involucró formas de manejo de recursos bióticos previo a las prácticas agrícolas. La fermentación de diferentes sustratos permitió aumentar el tiempo de preservación de los alimentos, así como incrementar o propiciar la

digestibilidad de estos recursos (Caplice & Fitzgerald, 1999). Restos arqueológicos de cerámicas muestran la presencia de fermentos de arroz en China hacia el 9,000 antes del presente (AP), así como la presencia de vino en Irán (8,000 AP) y en Egipto (5,000 AP) (Ross *et al.*, 2002; Cavalieri *et al.*, 2003; McGovern *et al.*, 1997, 2004).

En un principio, las fermentaciones de estos sustratos ocurrían de manera “espontánea”, simplemente aprovechando las cepas de microorganismos que se encontraban en el ambiente. Posteriormente, de la observación y la experimentación se pudieron generar prácticas generales, a partir de las cuales se comenzó la especialización en los métodos de fermentación para cada recurso. Generando condiciones con menos variación y una concentración de nutrientes disponibles para el desarrollo de algunos microorganismos en particular (Cavanagh *et al.*, 2015; Gibbons & Rinker, 2015).

El manejo de los sustratos para fermentación y las comunidades de microorganismos resulta crucial en el desarrollo de las civilizaciones, el manejo (aunque inconsciente) de bacterias, levaduras, hongos y mohos, permitió aumentar el espectro de recursos aprovechables incorporando estabilidad, calidad, nutrientes, sabor, aroma y textura a productos emergentes del manejo (Legras *et al.*, 2007).

Estos procesos fueron y siguen siendo en muchos casos artesanales, y en éstos no logra identificarse una plena conciencia del rol de los microorganismos por parte de los manejadores (Caplice & Fitzgerald, 1999). Sin embargo, la tradición y la constante experimentación han llevado al establecimiento de técnicas de manejo o “recetas”, a una forma de fermentar particular, de las condiciones de luz y temperatura del sustrato, de los materiales empleados y de la temporalidad. Esto ha permitido poseer una amplia gama de alimentos fermentados con cualidades específicas (Cavalieri *et al.*, 2003; Nie *et al.*, 2014).

Las prácticas y saberes asociadas a la elaboración de estos productos han pasado de generación en generación entre familias y entre comunidades locales, y son conocimientos que se guardan con mucho recelo, pues representan el sello distintivo de cada productor (Álvarez, 2015). Esto genera un espectro de calidades, con variaciones entre regiones y dentro de cada región, asociadas en última instancia a cada productor.

En las condiciones naturales estos microorganismos están en una intensa competencia, con heterogeneidad ambiental y una intermitente disponibilidad de recursos. En contraste con los entornos de fermentación propiciados por los humanos, éstos representan un medio estable, con

abundancia de nutrientes y baja competencia. Las prácticas humanas sobre los fermentos han creado nuevos nichos, generando contextos en los que la selección artificial de microorganismos opera de manera particular (Douglas & Klaenhammer, 2010; Gibbons & Rinker, 2015).

Los procesos de domesticación de microorganismos comenzaron con el aprovechamiento e inducción de la fermentación espontánea de ciertos sustratos; después, el manejo recurrente del reciclamiento de sustratos y productos, combinando continuamente materiales frescos con los fermentados, es decir re-inoculaciones de material fresco con otro previo. Estas formas de manejo incipiente de los fermentos eventualmente permitieron la especialización de microorganismos a ciertas condiciones ambientales, comenzando así la diferenciación de las cepas en contextos generados por los humanos (Gibbons & Rinker, 2015) (Figura 3).

Las cepas especializadas otorgan al fermento atributos particulares: nutrientes, sabor, textura, color, aroma, durabilidad. Estas características son los atributos que el productor selecciona, es decir, los productores no seleccionan directamente los microorganismos sino que seleccionan características y realizan prácticas que aseguren la presencia de tales características. De tal manera, crean ciertas condiciones para que se desarrollen ciertas cepas que finalmente son las responsables de esas características preferidas (Bokulich *et al.*, 2014; Eldarov *et al.*, 2016).

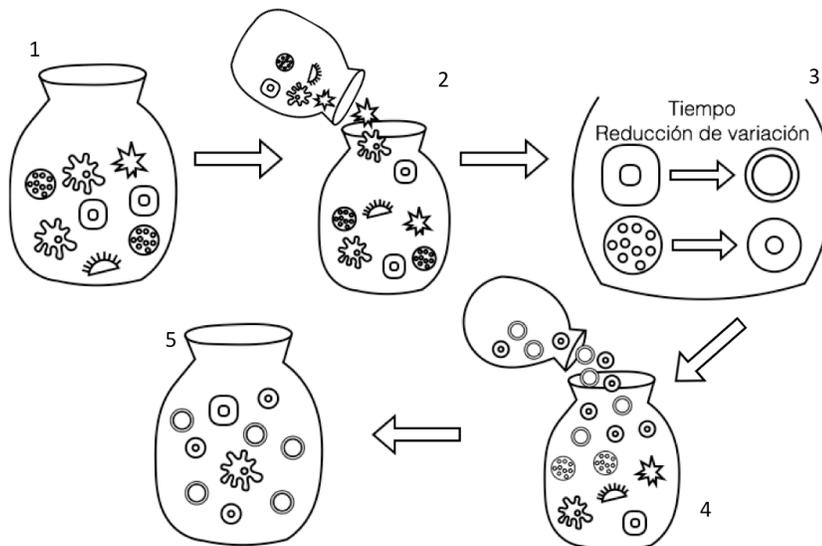


Figura 3. Diagrama de reinoculaciones. 1) Se tiene una fermentación espontánea, 2) se combina el sustrato previamente fermentado con un sustrato fresco, 3) la continua combinación de material fermentado con fresco hace que los microorganismos fermentadores se adapten a las condiciones del sustrato, se reduce la variación y comienza la diferenciación de cepas, 4) cepas ya especializadas a ciertas condiciones de fermentación son incorporadas a sustratos frescos, 5) se tienen fermentaciones con cepas especializadas.

Diversos trabajos han documentado cómo la diversidad y parentela de cepas depende del sustrato que fermentan, ya sea cebada, trigo, uva o arroz (Legras *et al.*, 2007; Gallone *et al.*, 2016). *Saccharomyces* es un género de levaduras que fermenta una amplia gama de sustratos, siendo uno de los géneros más utilizados en la actualidad para la elaboración de alimentos y bebidas, debido a los beneficios que los humanos obtenemos de su metabolismo. Estas levaduras no producen sustancias tóxicas, y sí altos niveles de alcohol y una serie de compuestos responsables de sabor como esteres y fenoles (Legras *et al.*, 2007).

Otro grupo de microorganismos con un papel crucial en la fermentación de diversos alimentos, son las bacterias ácido-lácticas (bal). Estas bacterias están presentes de manera natural en diversos sustratos vegetales (como los *Agaves*) y forman parte de la microbiota funcional del tracto digestivo de animales, incluyendo el de *Homo sapiens* (Ross *et al.*, 2002; Lappe *et al.*, 2008).

Este grupo de bacterias se caracteriza por ser hetero-fermentativo, es decir, las bacterias generan diferentes productos de su metabolismo, dióxido de carbono, ácido láctico, alcohol y exopolisacáridos que otorgan características deseables y benéficas a productos como leche, yogurt, quesos, vegetales fermentados como “sauerkraut” (col) o el “tocosh”, elaborado en Perú con diferentes especies de papa (*Solanum spp.*), oca (*Oxalis tuberosum*) o mashua (*Tropaeolum tuberosum*), así como a las bebidas fermentadas denominadas “chichas” elaboradas con maíz y otras gramíneas (principalmente trigo y cebada), y el pulque (Ross *et al.*, 2002; Douglas & Klaenhammer, 2010; Giles-Gómez *et al.*, 2016; Jiménez *et al.*, 2018).

La diversidad de cepas de microorganismos fermentadores ha sido amplificada en gran medida a través del manejo que los seres humanos efectúan, la cual se potencia significativamente debido a la gran diversidad de contextos biológicos y culturales, la difusión de técnicas de fermentación a diferentes regiones y el carácter altamente dinámico de la cultura. Los fermentos, entonces, reflejan parte de la historia de la civilización, particularmente sobre el cómo ocurrió la transferencia y adopción del aprovechamiento de recursos y la incorporación a la forma de vida de los pueblos. El estudio de la evolución de la microbiota fermentadora en ambientes creados por los seres humanos, permite identificar los siguientes rasgos como aspectos del síndrome de domesticación:

- 1) Decaimiento del genoma y pérdida de capacidad biosintética. Trabajos con las cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, aisladas de yogurt francés

y búlgaro, han mostrado una reducción y pérdida de funciones de su genoma en entornos ricos en nutrientes (Bolotin *et al.*, 2004; van de Guchte *et al.*, 2006).

2) Adaptaciones a nuevas rutas metabólicas. *Aspergillus oryzae* está presente en la fermentación de diversos alimentos en Japón, posee un alto número de enzimas para el metabolismo de aminoácidos y azúcares complejos en comparación con otras cepas de *Aspergillus*. Estas enzimas le permiten incrementar el espectro aprovechable de nutrientes y crecer en sustratos con poca disponibilidad de recursos (Machida *et al.*, 2005).

3) Especialización a ambientes alimentarios únicos. *Lactobacillus bulgaricus* posee una serie de proteasas requeridas para el metabolismo de la caseína, la presencia de estas enzimas le permiten un rápido crecimiento en ambientes lácteos. Los genes que codifican estas proteasas están ausentes en *L. delbrueckii*, lactobacilo que ha sido seleccionado y ha evolucionado en fermentos vegetales en vez de lácteos (Germond *et al.*, 2003). Otro ejemplo son los cambios en el pH, algo típico de las fermentaciones, las cepas de microorganismos deben estar adaptadas a soportar estas transiciones. *Lactobacillus plantarum* es una cepa presente en la fermentación de sustratos vegetales, posee una enzima que le permite regular su pH interno para no verse afectado por los cambios de pH en el sustrato (Kleerebezem *et al.*, 2003).

Estos caracteres asociados a la domesticación revelan la capacidad que han tenido los microorganismos para evolucionar, adaptarse y especializarse a los fermentos que los humanos preparamos como su hábitat. De este proceso las sociedades humanas se han dotado de una fuente de alimentos fermentados, sus beneficios nutricionales, texturas, aromas, sabores, así como las prácticas y complejos culturales alrededor de éstos, como ritos, celebraciones e identidades (Cavanagh *et al.*, 2015).

Este manejo de fermentos ha generado que se presente una reducción de diversidad de especies y cepas dentro de un sustrato específico, pero a su vez, ha generado un aumento en la diversidad de cepas especializadas para cada sustrato y contexto específico, diferenciando las cepas entre sustratos fermentados, regiones productoras y productores de la misma región (Legras *et al.*, 2007).

La historia y el espectro tan amplio del manejo de microorganismos para producir fermentos permite plantear un gradiente de manejo como se ha propuesto con otros grupos de organismos, como plantas y animales (Casas *et al.*, 2007; Blancas *et al.*, 2013; Zarazúa, 2016). El gradiente de

manejo de microorganismos fermentadores que se propone a continuación estará influenciado por las condiciones en las que se realiza la fermentación.

En condiciones naturales, es decir donde se fermentan sustratos sin intervención humana, la variabilidad a la que está sometida la fermentación es determinada por cuestiones ecológicas y ambientales (microorganismos fermentadores, temperatura, las cantidades del sustrato que se fermenta, la vitalidad del organismo de donde se obtiene el sustrato, y por ende los compuestos disponibles para los microorganismos). Bajo estas condiciones, al no existir un control de las múltiples variables en las que se fermenta la heterogeneidad será mayor, ejemplificando, la fermentación de la materia orgánica en descomposición.

Al presentarse un manejo de los sustratos y con ello de los microorganismos fermentadores (aunque sea inconsciente), la tendencia en el proceso está orientada a una reducción de la variación. La fermentación espontánea consiste en un manejo incipiente, se colecta un sustrato y al almacenarlo, este se fermenta gracias a los microorganismos que se encuentran asociados al sustrato o por los presentes en el ambiente. Aquí inicia el control de las condiciones de fermentación para obtener el producto deseado, al colocar el sustrato en un lugar determinado y dejarlo cierto tiempo a fermentarse hasta considerarlo listo. Es importante recalcar que en este nivel ya se presenta una intencionalidad por procurar un material y al fermentarlo obtener nuevas características deseables, este sería el caso de alimentos y bebidas que se fermentan sin agregar otro ingrediente que detone o acelere la fermentación, el tepache de frutas, vinos y cervezas elaborados exclusivamente con fermentación espontánea o alimentos como el tocosh.

En la fermentación con reinoculación, se ha preparado un inóculo con el cual se propicia y direcciona la fermentación hacia las preferencias del manejador. Con lo anterior, las condiciones de fermentación se tornan más específicas, lo cual generará una mayor especialización en las cepas que han sido las seleccionadas a través de la obtención o elaboración del inóculo, como se explica en la Figura 3. La intención de la fermentación con reinoculación es generar un producto cada vez más estandarizado, en este nivel de manejo está el pulque, donde el inóculo es el pulque añejo.

Mientras que la fermentación controlada es el extremo del manejo, con un control total de las condiciones de ambientales y los materiales empleados, el sustrato posee características homogéneas y por ende el fermento final resulta un producto totalmente estandarizado. En este nivel se controlan las cepas que intervienen, siendo estas altamente especializadas. Los sustratos se someten a procesos (como aumento de temperatura o microfiltros) para eliminar la presencia de

otros microorganismos, para después incorporar la cepa específica, este nivel de manejo integra los procesos industriales que derivan de productos estandarizados como cervezas, vinos y lácteos comercializados a gran escala (Fig. 4).

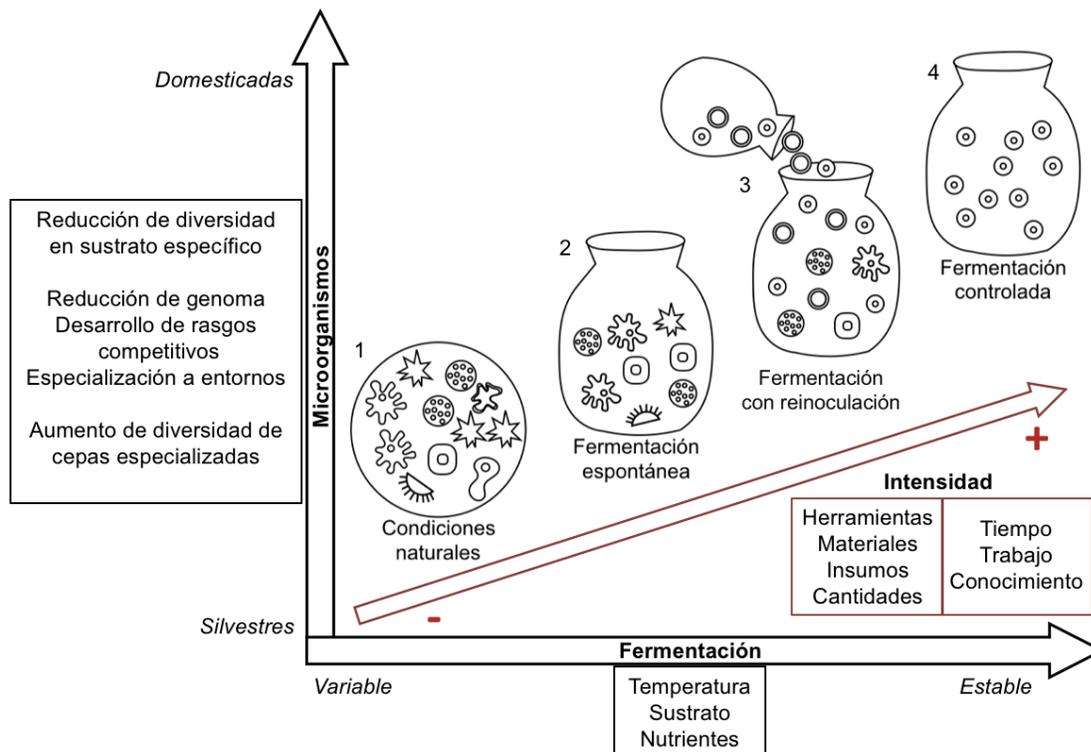


Figura 4. Gradiente de manejo de microorganismos fermentadores. La domesticación de microorganismos está en función de la variabilidad-estabilidad de las condiciones de fermentación (temperatura, humedad, tipo de sustrato, disponibilidad de nutrientes) y de la intensidad de manejo del fermento (determinado por variables como herramientas, materiales, insumos, cantidades, tiempo, trabajo y conocimiento del manejador). Las condiciones de variabilidad de la fermentación, intensidad de manejo y el gradiente de domesticación de los microorganismos determinan los tipos de fermentación: 1) condiciones naturales, 2) fermentación espontánea, 3) fermentación con reinoculaciones y 4) fermentación controlada. Con información de Gibbons & Rinker (2015).

A su vez este control de la fermentación está influenciado por la intensidad del manejo que recibe. La intensidad de manejo estará determinada por factores como: 1) herramientas: de pocas herramientas generales a herramientas especializadas; 2) materiales: de materiales generales o artesanales a materiales industriales; 3) insumos: en las fermentaciones espontáneas no son necesarios insumos, mientras que en fermentaciones con reinoculación o controlada es necesaria el uso de insumos extra, ingredientes como fruta, azúcar, sustrato añejo o cepa especializadas; 4) cantidades: el volumen requerido para realizar el fermento, de pocas a cantidades mayores; 5) tiempo: el cual es requerido para generar el fermento, de pocas horas a días o meses ; 6) trabajo: el requerido para generar el fermento, sea necesaria una persona, dos o varias personas y 7)

conocimiento: si es necesario un conocimiento incipiente o es necesario conocimiento altamente especializado, obtenido por transmisión generacional o instrucción técnica (Fig. 4).

La historia de manejo de los microorganismos fermentadores del pulque pudo haber comenzado hace más de dos milenios. El registro más antiguo que se tiene del aprovechamiento de la savia de agaves lo constituye un raspador de maguey fabricado con obsidiana (muy similar a los raspadores que los tlachiqueros utilizan en la actualidad), cuya antigüedad se remonta a 2,300 años AP, encontrado en Huapalcalco, Hidalgo (Goncalves de Lima, 1986; Fournier, 2007). Si bien este registro no permite hacer inferencias directas sobre las técnicas de fermentación del aguamiel para la elaboración de pulque, sí sugiere que la extracción y el consumo de la savia eran recurrentes. A la postre, el almacenamiento de este recurso llevó a su fermentación y así pudo haberse generado el primer pulque, siendo las culturas del preclásico mesoamericano las primeras en aprovechar la savia como bebida (Goncalves de Lima, 1986; Lorenzo-Monterrubio, 2007).

Para tiempos posteriores, ya en el periodo Clásico mesoamericano, hay evidencia de la extracción de la savia y su fermentación para elaborar pulque. Evidencias pictográficas como el mural de “los bebedores” dentro de la pirámide de Cholula muestran grandes recipientes burbujeantes, y se ilustra que los asistentes se sirven y beben pulque (Guilhem, 2012).

También existen evidencias en materiales; como la variada cerámica encontrada en diferentes zonas de la ciudad prehispánica de Teotihuacán. Ahí se hallaron restos de pulque en una serie de ollas y vasijas utilizadas para la preparación y almacenamiento de la bebida (Correa-Ascencio *et al.*, 2014; Robertson *et al.*, 2017).

Teotihuacán llegó a ser una de las ciudades más habitadas del México prehispánico, con cerca de 100,000 habitantes (Evans, 1990). Estudios arqueológicos de la zona sugieren la frecuencia e importancia que tenía el consumo de la savia del maguey en los hogares, además, de necesaria intensificación del manejo de los magueyes para satisfacer la demanda de aguamiel y pulque en una ciudad de tales dimensiones (Robertson *et al.*, 2017).

Con información como la anterior, es posible afirmar que el manejo de aguamiel y pulque se ha gestado por casi 25 siglos. Como se señaló anteriormente, la fermentación es un proceso que aprovechan los seres humanos probablemente antes que el desarrollo de la agricultura. Es por lo tanto probable que la fermentación de la savia para elaborar pulque sea una estrategia que se ha mantenido desde la prehistoria, y tanto en el pasado como en el presente sigue siendo una importante fuente de alimento y otros beneficios en diferentes regiones del país.

Los trabajos realizados con el pulque en materia microbiológica nos permiten entender el proceso de fermentación de la savia y conocer los grupos de microorganismos funcionales presentes en ésta (Escalante *et al.*, 2016), microorganismos que están siendo seleccionados indirectamente a través de prácticas de manejo y están, quizá, en proceso de domesticación.

La savia de los agaves al contener agua, azúcares, aminoácidos y minerales, constituye un rico y favorable medio de cultivo para diversas especies de microorganismos. Éstos están naturalmente asociados a los agaves y se desplazan a las paredes de la cavidad o son introducidos por el aire, o a través de utensilios empleados en la extracción de la savia (Lappe *et al.*, 2008).

Estando presente la microbiota funcional se llevará a cabo la fermentación, proceso conformado por tres aspectos principales: la fermentación viscosa, la fermentación ácida y la fermentación alcohólica (García-Garibay *et al.*, 2004; Escalante *et al.*, 2016). La fermentación viscosa ocurre a través de diferentes especies de bacterias del género *Leuconostoc*, las cuales acidifican la savia utilizando sacarosa para producir CO₂ y biopolímeros, éstos últimos son las moléculas responsables de la viscosidad del pulque (García-Garibay *et al.*, 2004).

Al tener la savia un pH progresivamente más ácido (pH= 6.5–6.0), el desarrollo de las bacterias del género *Leuconostoc* disminuye y se incrementan las poblaciones de *Lactobacillus* spp., los cuales llevan a cabo la fermentación de ácido láctico a partir de azúcares. Estas bacterias son ampliamente conocidas y relevantes en la elaboración de alimentos y bebidas, debido a su capacidad de generar compuestos aromáticos y potenciadores de sabor (Ross *et al.*, 2002). Además, las poblaciones de tales microorganismos compiten e inhiben el crecimiento de otros microbios patógenos a través de ácidos orgánicos y de bacteriocina, compuestos que previenen potenciales enfermedades por consumir la bebida (Cleveland *et al.*, 2001; Douglas & Klaenhammer, 2010).

La fermentación alcohólica del pulque, bajo las condiciones previamente descritas, se lleva a cabo debido al favorecimiento del desarrollo de *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* y de *Saccharomyces* spp., las cuales utilizan los azúcares para generar etanol, así como compuestos nutritivos (vitaminas y aminoácidos) y compuestos volátiles que influyen en el sabor y el perfil aromático del pulque (Lappe *et al.*, 2008; Escalante *et al.*, 2016).

Con la información anterior, es posible proponer que la fermentación de la savia para elaborar pulque se encuentra influenciada por los siguientes factores:

- 1) La procuración de la preservación del recurso con el fin de prolongar su disponibilidad, ampliando el periodo en que puede consumirse la bebida.

2) La obtención de nutrientes o beneficios emergentes, ya que con la fermentación de la savia se producen compuestos, nutrientes o atributos antes ausentes, como el ácido láctico o los efectos nutricionales de los microorganismos probióticos.

3) La generación de un perfil organoléptico, el cual es posible mediante la fermentación pues se generan nuevos sabores, olores y texturas. Estos atributos son valorados y seleccionados por los productores y consumidores de acuerdo a sus gustos y preferencias.

4) El desarrollo de expresiones culturales; es decir, los productos fermentados forman parte tanto de la cotidianidad, el esparcimiento e identidad de ciertos grupos (por ejemplo, el consumo de pulque en las pulquerías de la Ciudad de México), como de aspectos rituales y la celebración de fechas o acontecimientos importantes (por ejemplo, el consumo de pulque en ceremonias religiosas o como parte de la celebración de fiestas en comunidades rurales).

II. ANTECEDENTES

El pulque en Michoacán

Si bien la elaboración y consumo de pulque es uno de los rasgos de identidad mesoamericana, el grueso de los estudios técnico-científicos, así como el imaginario colectivo se han enfocado específicamente en la región central del país (estados de México, Morelos, Hidalgo, Puebla y Tlaxcala), considerándola erróneamente como la zona exclusiva del manejo pulquero. Son menos estudiados y reconocidos sistemas pulqueros en otros estados como Jalisco, Coahuila, Aguascalientes, Veracruz, Oaxaca o Michoacán, en donde existen registros de su producción y consumo (ver Fig. 2).

La idea predominante sobre la distribución de los sistemas de producción y consumo de pulque se debe en gran medida a la gran cantidad de estudios y evidencias arqueológicas que se tienen de las culturas prehispánicas en la región central del país. Los vestigios materiales que se tienen de las culturas teotihuacanas, toltecas o mexicas (así como las contemporáneas a éstas, que estuvieron sometidas e influenciadas política y culturalmente), nos permiten entender el papel de los agaves y del pulque en la vida de estos pueblos (Goncalvez de Lima, 1956; Corcuera de Mancera, 2013). Estas evidencias incluyen vasijas con restos de pulque, diversas piezas como vasos, platos y estatuillas asociadas a la bebida, puntas de maguey para ceremonias rituales, pinturas murales representando el consumo de pulque y documentos pictográficos prehispánicos y coloniales, como el Códice Borgia y el Códice Mendoza, por mencionar algunos de los numerosos ejemplos (Figura 5).



Figura 5. A) Cientos de espinas terminales de maguey encontradas en una ofrenda del Templo Mayor (CDMX); estas espinas se utilizaban en autosacrificios asociados a ceremonias de fertilidad. B) Mayahuel, diosa del maguey, en Códice Borgia, manuscrito prehispánico proveniente de la región Puebla-Tlaxcala (Recuperado de www.famsi.org/spanish/research/loubat/Borgia). C) Mural de los Bebedores dentro de la pirámide de Cholula, Pue., representa una ceremonia en la que se sirve y bebe pulque (Soto-Maní, 2018). D) Vaso para pulque en forma de maguey, nótese que la representación de las hojas del maguey están cortadas en la punta, por ello se infiere que es un maguey en producción de pulque, cultura Acolhua, Tlax. (Santana, 2018).

Asimismo, la idea referida anteriormente se debe a que la industria pulquera se desarrolló vigorosamente durante el siglo XIX y principios del XX, esta industria fue una de las más prósperas de esa época y contaba con la explotación de extensas magueyeras en los Llanos de Apan (región entre los estados de Hidalgo y Tlaxcala) (Ramírez-Rodríguez, 2017). La elaboración del pulque se centraba en grandes tinacales situados en las haciendas, para después distribuir el producto a través del sistema de ferrocarriles a asentamientos chicos y medianos, así como a grandes ciudades como las de Ciudad de México, Toluca o Puebla (Ramírez-Rancaño, 2012). Este auge pulquero se corroboraba con las dos mil pulquerías en la capital del país y un consumo diario *per capita* entre sus residentes de 0.9 l (Barbosa, 2004). Sin embargo, después de la Revolución Mexicana, el reparto agrario, el intento de modernización del país y el ingreso de otras industrias de bebidas alcohólicas, principalmente la cerveza, mermó la industria hasta su casi desaparición y precaria situación actual. Por ello, las haciendas hoy convertidas en museos u hoteles, las fotografías del Archivo Casasola de los “libadores” de pulque, las grandes extensiones de tierra antes magueyeras

ahora con cebada, o las memorias de aquellos que vivieron y trabajaron en las concurridas pulquerías y aduanas de pulque, son evidencia de la época dorada del pulque en el centro del país.

Sin embargo, el aprovechamiento de la savia los agaves y el consumo de pulque son prácticas recurrentes en otras culturas y regiones mesoamericanas, como lo son las culturas del occidente de México. En la lengua purépecha existen los términos *acamba* para el maguey y *urapi* para el pulque (Cortés-Máximo, 1999), y junto a estos elementos lingüísticos que hacen referencia a la importancia cultural de los agaves y del pulque en la región, existen también evidencias pictográficas, por ejemplo en La Relación de Michoacán, escrita por fray Jerónimo de Alcalá en el año de 1540. Este documento tenía la intención de describir la vida e historia de los pueblos purépechas de occidente. La primera parte del documento es una descripción de los usos, costumbres, celebraciones y religiosidad de los antiguos purépechas; sin embargo, esta sección se extravió o fue deliberadamente destruida por considerar al contenido un compendio de “herejías” (Miranda, 1980). De esta sección quedan unos párrafos que hacen mención a la embriaguez dentro de la ritualidad:

“El siguiente día después de la fiesta, llegabasé todas las mujeres del pueblo cerca del fuego que estaba allí y tostaban maíz y hacían cacalote y lo comían allí todas, emborrachándose...”

Si bien el texto no hace explícito qué bebida consumían para alcanzar la embriaguez se puede inferir que era el *urapi* o vino de maguey como se le hace llamar en la segunda parte de la relación. La segunda y la tercera parte, las cuales se encuentran íntegras, hablan de la historia y genealogía de los antiguos purépechas hasta su encuentro con los españoles, entre los pasajes de la narrativa, se encuentran situaciones en las cuales al recibir a un invitado se le ofrecía de comer y beber vino de maguey:

“—Señor, tu hermano Quarácuri me envía a ti. Y díjome: —Ve a mi hermano Naca, y dile que recibí mucha vergüenza en dalle tan poco de comer. Pregúntale en qué día y de aquí a qué tanto volverá, porque le espere con comida a la vuelta, y haré pan de bledos y vino de maguey, para que beba a la vuelta, porque hace calor y tienen sed los caminantes. Esto le dirás por saber el día en que ha de venir.”

También se leen otros pasajes donde se vuelve a presentar la embriaguez, en esta ocasión sí, explícitamente provocada por vino que se hace de los magueyes:

“Y díjoles Curátame: —Qué haremos, hermanos, ¿no habrá un poco de vino que bebiésemos en regocijo? Y dijeron ellos: —Por qué no, señor, sí hay; aquí tenemos vino que se ha hecho en las mismas cepas de maguey. Y diéronle a beber. Y dábale a beber Tangáxoan. Dióle cuatro tazas, y después otras cuatro, y emborrachose.”



Figura 6. Lámina XXXII de “La Relación de Michoacán”, muestra en medio de la escena bélica un personaje extrayendo aguamiel de un maguey (resaltado con ovalo rojo). Recuperado de Alcalá, 2016.

Además de estos pasajes escritos, se cuenta con información gráfica. Como se mencionó, la Relación de Michoacán es un documento pictográfico; es decir, al texto lo acompaña una serie de láminas con información relevante que complementa las relatorías recopiladas por Alcalá. En dos de las 44 láminas podemos extraer información valiosa acerca de la extracción y consumo de pulque en el pueblo purépecha. En la sección en la que se narra “cómo destruían o combatían los pueblos”, la lámina XXXII representa tres escenas, la organización militar, la procesión de los guerreros y la invasión a un pueblo. En la batalla, se muestran arqueros, el incendio de una choza, el aporreamiento de un sujeto, otros se encuentran refugiados, y ahí en medio de la batalla, como ajeno a su alrededor, un hombre extrae aguamiel de un maguey con un acocote de *Lagenaria siceraria* (Fig. 6).

La lámina XLIV acompaña el texto que narra el encuentro entre una de las adelantadas

españolas y el Cazonzi³. Asociado al texto, tenemos la representación de los españoles a caballo arribando al asentamiento purépecha, destacando la cabaña de los principales, acompañan unas colinas, canoas recorriendo un río, diferentes tipos de plantas, entre estos tres magueyes, así como varias personas de pueblos originarios de Michoacán. Entre algunas matas se oculta una pareja, se ve una mujer cargando un niño, otro personaje lleva en brazos un perro, otro un guajolote, ocho individuos cargando a sus espaldas diversos objetos y finalmente en la parte inferior derecha, una mujer sentada delante de un maguey, tiene una falda a cuadros y sosteniendo una olla se prepara para colectar aguamiel (Fig. 7).

Los ejemplos pictográficos que hemos mencionado son recursos descriptivos y discursivos en este tipo de documentos, al intercalar componentes de los cuales se está escribiendo usando escenas cotidianas, aparentemente ajenas al cuadro principal. No obstante, estos detalles permiten además reconstruir el entorno natural, la configuración social y otros componentes culturales de la época (Alberú, 2012).

Después de la conquista española, durante la época colonial y en el México independiente se siguió produciendo y consumiendo pulque. En los archivos históricos de la ciudad de Morelia encontramos diversas relatorías sobre los sistemas pulqueros del siglo XIX. Los indígenas dedicaban parte de su tiempo y trabajo a la extracción de aguamiel para la elaboración del pulque pues era *“fuente integrante del ingreso de algunas familias”*. Estas familias *“tenían grandes los sitios de sus casas, solares debidamente cercados con más menos plantas de maguelles de que subsisten los más”* (AHMM, 1826-1893).

El pulque se producía tanto en la demarcación de Morelia como en las poblaciones aledañas para después transportarlo a la capital para su comercialización: *“Los productores lo llevan a Morelia donde venden en el tejado de la plazuela de San Agustín”* (AHMM, 1841). Para finales del siglo XIX, los registros de los boletines agrícolas indican que el estado de Michoacán producía cerca de 40 mil litros al día (Segura, 1901).

Los huecos de información acerca de la producción de pulque en la región son grandes, por lo que resulta complicado describir la tendencia temporal de la producción. No obstante, los vendedores de pulque en los Mercados Municipales de Morelia, el Mercado Independencia, y el Mercado de San Juan, cuentan cómo la venta de pulque ha decaído al punto que en la actualidad venden entre 150 y 200 L a la semana (Doña Teresa y Don Rigo, comunicación personal, 2018).

³ El Cazonzi era el título del gobernante máximo del imperio purépecha a la llegada de los europeos.



Figura 7. Lámina XLIV de “La Relación de Michoacán”, en la parte inferior derecha se ilustra a una mujer con una olla en sus manos, por estar hincada frente al maguey, se infiere que está por coleccionar la savia (resaltado con ovalo rojo). Recuperado de Alcalá, 2016.

El desplome en la producción y consumo de pulque en Morelia es un espejo de la situación de la bebida en otros estados y ciudades de México. Donde antes abundaban los magueyes, tinacales, expendios, y pulquerías, hoy estos espacios se han transformado. Las parcelas han sido urbanizadas o sus cultivos se han sustituido, no se ha dado un recambio generacional en los productores, por lo que las prácticas y los conocimientos están en riesgo inminente de desaparecer; además, la demanda del producto ha perdido popularidad frente a otras bebidas y su consumo ha sido injustamente desprestigiado (Álvarez, 2015).

III) JUSTIFICACIÓN

El manejo de magueyes, la preparación y consumo de pulque han sido muy importantes entre las culturas mexicanas, llegando a ser en el siglo XX una de las actividades productivas más prósperas del país. Sin embargo, a finales del mismo siglo su éxito y popularidad se desplomaron debido a un entramado de factores políticos, económicos y ecológicos, que han llevado a los sistemas de manejo pulquero de todo el país casi a su desaparición. Entre tales factores se cuentan: (1) la desarticulación de las grandes plantaciones magueyeras, (2) la paulatina debacle de los sistemas agrícolas tradicionales agroforestales, (3) los embates sanitarios a la producción y comercialización del pulque, (4) el desprestigio cultural de esta bebida mesoamericana, en sustitución por bebidas alcohólicas de “mayor prestigio”, principalmente la cerveza; determinando así la caída de un importante elemento de identidad, de milenaria tradición e importancia económica productiva (Narro-Robles *et al.*, 1992; Altieri & Nicholls, 2000; Barbosa, 2004; Álvarez, 2015).

Las tendencias en la producción y consumo apuntan hacia una eventual extinción de los sistemas de manejo y producción de magueyes pulqueros y la elaboración de pulque (Fig. 8) pero también a la extinción de una costumbre, de una actividad económica y de un importante reservorio de recursos genéticos tanto de especies y variedades locales de magueyes como de comunidades microbianas fermentadoras de pulque (Álvarez, 2015).

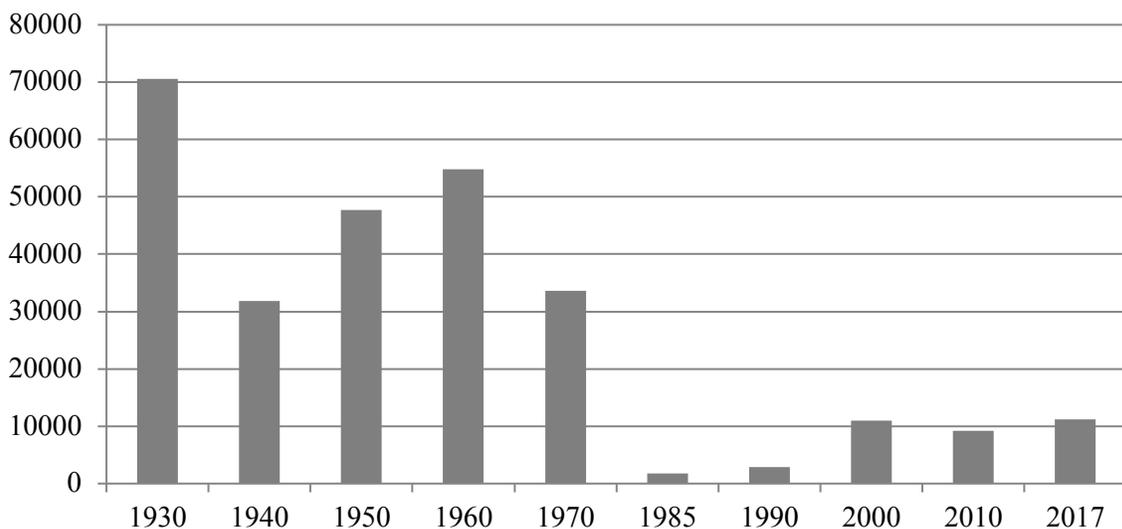


Figura 8. Superficie (en hectáreas) cultivada con maguey pulquero en México reportadas en los censos agrícolas (SAGARPA 1930-2017).

La intención de este trabajo es identificar los efectos conjuntos que las prácticas de manejo y la diversidad microbiana tienen sobre las características del pulque, así como comprender cómo

responden las comunidades de microorganismos al manejo diferenciado. Para ello se realizó un estudio de caso en dos localidades productoras de pulque en Michoacán: Tarímbaro y Santiago Undameo. Estudios como el presente aspiran a comprender cómo opera el sistema a nivel agrícola y a nivel microbiológico, brindando herramientas para identificar y propiciar los aspectos clave para asegurar la buena calidad del producto y el fomento de su consumo entre la población rural y sobre todo la creciente población urbana. Estas son condiciones necesarias para la revitalización de la actividad productiva, proyectar su desarrollo, así como el mantenimiento de usos, costumbres y recursos genéticos. Además, la caracterización de indicadores de calidad del pulque y su relación con prácticas de manejo y composición microbiana pueden aportar al campo de estudio de los fermentos en tópicos como su diversidad, unicidad de condiciones y calidades, así como entre especies de *Agave*, sitios y formas de elaboración.

Así mismo, se aspira a mostrar que no existe un solo tipo de pulque ni una sola forma estandarizada de aprovechamiento pulquero, sino una alta variedad de éstos. Cada forma con características propias que hacen que su producto final, el pulque, sea algo único regional, temporal y culturalmente. Con lo anterior, el presente estudio aspira a contribuir a la urgente necesidad por revalorar, mantener y aprovechar de manera sustentable estos sistemas, con los recursos, prácticas y saberes tradicionales que conllevan.

IV) HIPÓTESIS

El presente estudio se basa en el supuesto de que las prácticas de manejo moldean la estructura comunitaria de la microbiota del pulque, lo cual determinará las características físicas y químicas y la calidad de la bebida. Por lo tanto, esperamos que las comunidades microbianas y las características del pulque serán diferentes en cada sitio; y a mayor diferencia en las prácticas de manejo mayor diferencia habrá en las comunidades microbianas y en las características del pulque.

V) OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Analizar los efectos conjuntos del manejo y la microbiota sobre las características de calidad del pulque en dos comunidades productoras de esta bebida en Michoacán.

5.2 Objetivos particulares

- Caracterizar las prácticas de manejo en cada sistema de manejo pulquero.
- Identificar y comparar las comunidades microbianas fermentadoras.
- Evaluar características físicas y químicas del pulque en cada sitio de estudio.

VI) MARCO CONCEPTUAL

Para abordar este sistema de manejo pulquero se elaboró un marco de análisis que incorpora sus diferentes componentes (Fig. 9). Se parte de definir el concepto de manejo como el conjunto de prácticas e intervenciones humanas que buscan transformar, adecuar o mantener elementos, procesos o sistemas de la naturaleza con un propósito cultural (Casas *et al.*, 2014). En el caso de este estudio, el manejo se refiere a las prácticas que realizan los productores con la intención de extraer la savia y elaborar el pulque, considerando aspectos como la especie y variedad de maguey que se aprovecha. Como se ha expuesto anteriormente, son alrededor de 40 las taxa los utilizados con propósitos pulqueros, y en la zona de estudio se han identificado principalmente tres: *A. americana*, *A. mapisaga* y *A. salmiana*. También se aborda lo relacionado con la propagación, incluyendo las prácticas utilizadas en la reproducción vegetativa de los individuos. Esta técnica es la principalmente utilizada por los manejadores de magueyes pulqueros, ya que pueden obtener gran número de individuos en un tiempo relativamente corto, y porque la reproducción sexual es limitada pues se ve interrumpida por el corte del escapo floral.

El corte se refiere al momento en que los manejadores deciden cortar el meristemo apical de la planta, debido a que consideran que ya ha llegado a su madurez y así iniciar la extracción de la savia. La extracción contempla el “raspado” de la oquedad de la planta, así como la extracción del aguamiel. Finalmente se contempla la elaboración, la cual incluye las prácticas requeridas para el proceso de fermentación, con las cuales se transformará el aguamiel en pulque. Estos componentes del manejo poseen una temporalidad específica, que aunada al tipo de herramientas y técnicas para desarrollarlas, reflejan el amplio espectro de manejo pulquero.

Por su parte, el recuadro de la microbiota funcional contempla las tres fases principales de la fermentación: la fermentación ácida, la cual genera ácidos lácticos y se lleva a cabo principalmente por bacterias del género *Lactobacillus*; la fermentación viscosa, mayormente por organismos del género *Leuconostoc*, los cuales son responsables de generar los polisacáridos que otorgan la consistencia a la bebida y, por último, la fermentación alcohólica, en la cual se transforman los azúcares del aguamiel en etanol, y en la que intervienen levaduras como *Sacharomyces* spp.

Finalmente, el análisis del manejo se centra en la bebida. Para elaborar el pulque es necesario tener savia de aguamiel fresca, la cual se mezcla con la semilla (pulque añejo). Se decidió trabajar con 5 características físicas y químicas de la bebida que son: 1) Los grados Brix, que

representan el porcentaje de azúcar disuelta en el líquido, 2) El pH, como un indicador de la acidez de la bebida y del metabolismo de los microorganismos, 3) El ácido láctico, como el resultado del metabolismo específico de bacterias ácido lácticas, 4) La viscosidad, como resultado del metabolismo de bacterias generadoras de polisacáridos y 5) El porcentaje de alcohol, cantidad de azúcares que fueron transformados en etanol.

El manejo tanto del maguey como del pulque está dirigido a obtener ciertas características en la bebida. El conjunto de prácticas se lleva a cabo con base en aprendizajes empíricos, y en ello también influyen los gustos, las creencias, las costumbres y las iniciativas de experimentar innovaciones. Sin embargo, estas prácticas están determinando qué microorganismos fermentan la bebida, inhibiendo o favoreciendo a algunos otros, y esto tiene una repercusión medular en las características de cada pulque.

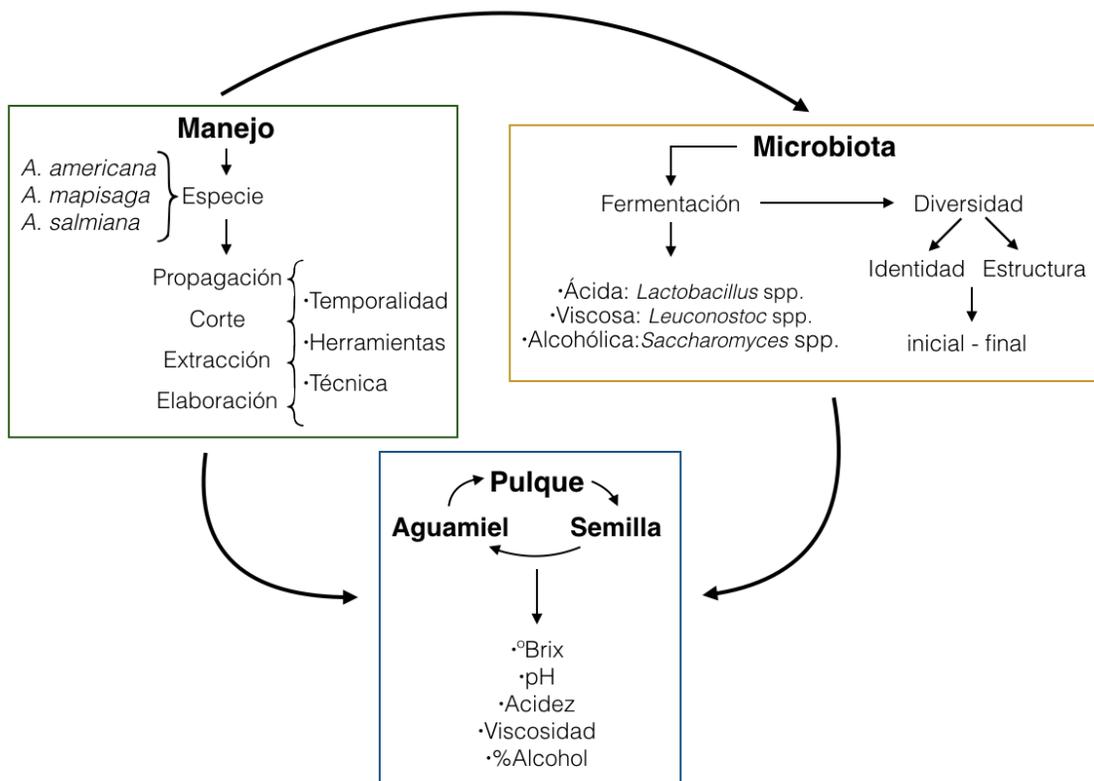


Figura 9. Marco conceptual del sistema: manejo, microbiota y bebida.

VII) METODOLOGÍA

7.1 Sitio de estudio

Para esta investigación se trabajó con dos sistemas de manejo pulquero (Fig. 10). El primero en la localidad de Tarímbaro (T), la cual cuenta con 6,049 habitantes y es cabecera municipal del municipio de Tarímbaro (SEDESOL, 2013). Se ubica al norte de la ciudad de Morelia, siendo la localidad parte de la Zona Metropolitana de Morelia (ZMM). A pesar de que la región aun cuenta con una importante producción agrícola (maíz, jitomate y hortalizas), esta ha disminuido gradualmente en la localidad debido a la expansión urbana de la ZMM, el aumento en las actividades terciarias y la oferta de servicios, por ello los espacios para la agricultura, incluyendo el cultivo de maguey para la elaboración de pulque son cada vez más reducidos. Tiene una temperatura media anual de 22°C y un periodo de lluvias que va de mayo a octubre con 600-800 mm anuales (SUMA, 2009).

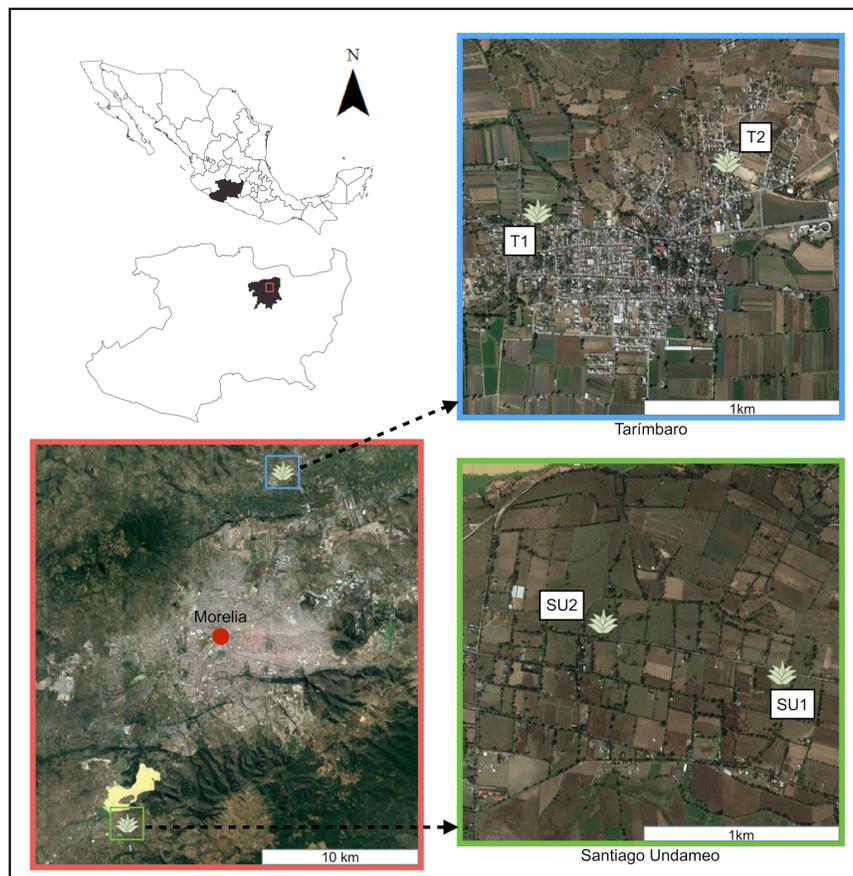


Figura 10. Mapa de las localidades de estudio: Tarímbaro al norte de la Ciudad de Morelia y Santiago Undameo al suroeste de la ciudad. Dentro de cada localidad se ubican las dos unidades productoras donde se midieron los agaves.

El segundo sitio es la localidad de Santiago Undameo (SU), ubicada dentro del municipio de Morelia al suroeste de la ciudad. Cuenta con 1,455 habitantes, las actividades dentro de esta localidad son agropecuarias, campos de cultivo y pastizales para la ganadería son las coberturas predominantes, siendo el cultivo del maguey para la elaboración de pulque una de las actividades productivas de la localidad (SEDESOL, 2013). Posee un clima templado con una temperatura media anual de 17°C y 800-1000 mm de lluvia en los meses de mayo a octubre (SUMA, 2009).

7.2 Obtención y análisis de información

Entrevistas semi-estructuradas

Se realizaron recorridos en las localidades, ubicando los puntos de cultivo de maguey y venta de pulque. En estos espacios, se contactó al productor, se le expuso el proyecto e invitó a participar.

Se contó con 12 productores (5 en SU y 7 en T), a los cuales se les realizaron entrevistas semi-estructuradas, con la intención de esquematizar información sobre las prácticas implementadas en el sistema manejado (Anexo 1). Esta herramienta metodológica permite generar información con base en un guión de preguntas con los temas a tratar, pero con la flexibilidad de que los entrevistados pueden exponer libremente sus interpretaciones de la realidad. Además, permite incursionar en aspectos que surgen de la conversación y que no estaban considerados *a priori* (Albuquerque *et al.*, 2014).

Morfometría de agaves

Para caracterizar las variedades de agave utilizadas, se midieron características morfométricas de 72 magueyes, distribuidos en 4 cuatro unidades productivas, dos en SU y dos en T. Para la selección de los individuos se realizaron caminatas en las parcelas eligiendo los magueyes de acuerdo a un estado de desarrollo avanzado, es decir magueyes que entre 1 y 2 años ya podrían ser aprovechados para la extracción de aguamiel. Las características que se midieron fueron: 1) Altura de la planta, 2) Altura del tallo, 3) Diámetro de la planta, 4) Largo de la hoja, 5) Ancho medio de la hoja, 6) Largo de la espina terminal, 7) Ancho espina terminal en la base, 8) Número total de dientes, 9) Número de dientes en 10 cm, 10) Longitud de dientes, 11) Ancho de dientes y 12) Distancia entre dientes.

Cultivo de unidades formadoras de colonias (UFC) de las fases de la bebida

Para la caracterización de la estructura de la comunidad microbiana se colectaron muestras de la bebida de diferentes productores (tres de los entrevistados en cada sitio, que contaran con la disposición de brindar las muestras) durante la temporada enero-abril del 2017 y del 2018. En SU

se colectaron las fases aguamiel (muestra obtenida de un agave en producción), hervido (muestra del aguamiel que los productores hierven), pulque (muestra del pulque que se vende) y semilla (muestra del pulque añejo que inocula el aguamiel). Mientras que en T se tuvieron las fases aguamiel, pulque y semilla, ya que en esta última localidad no hierven el aguamiel. Se tuvo así un total de 42 muestras (21 por año), 24 (12 por año) de SU y 18 (9 por año) de T.

A cada una de las muestras se le realizaron diluciones decimales seriadas hasta 10^{-6} , las cuales fueron sembradas (0.1 ml) en tres medios de cultivos distintos, uno general y dos selectivos:

- Tripteina Soya Agar. Como medio general, ya que favorece el desarrollo de una gran variedad de microorganismos.
- Sabouraud Dextrose Agar. Este medio está diseñado para el cultivo de hongos y levaduras, ya que con un pH de 5.6 permite el crecimiento de este grupo, además posee un efecto inhibitor de bacterias ya que contiene antibióticos.
- M.R.S. Agar. Este es un medio selectivo diseñado para el crecimiento de bacterias ácido lácticas, el cual contiene compuestos que inhiben el crecimiento de otros grupos microbianos, por ejemplo el citrato de amonio contenido en este medio impide el desarrollo de bacterias Gram-negativas.

Cada muestra se sembró en los tres medios con tres réplicas (9 cajas Petri por muestra). Los cultivos fueron incubados por 72 horas a una temperatura de 26°C, para después realizar una caracterización y conteo de morfotipos en cada una de ellas.

Cada morfotipo fue caracterizado a través de los atributos forma, borde, elevación, superficie, color y reflejo de luz. A cada morfotipo identificado se le asignó una clave conformada por la letra en el medio en el que creció, M (MRS), S (Sabouraud) o T (Tripteina Soya Agar) y un número.

Análisis de perfiles de ácidos grasos

Las 21 muestras colectadas por año se almacenaron a -25°C y una vez completo el muestreo se realizó la extracción de ácidos grasos totales (fatty acids, FA). Una vez realizada la extracción se realizó su lectura mediante cromatografía de gases. Para ver el protocolo completo de extracción consultar el Anexo 2. Esto se hizo en cada año, 2017 y 2018, teniendo un total de 42 muestras. El análisis de FA proporciona una descripción cuantitativa de la comunidad microbiana en una muestra, generando un perfil con la presencia y abundancia de los distintos FA extraídos, los cuales corresponden en cantidad y estructura a un grupo de microorganismos en particular, funcionando

como una especie de “huella dactilar” (Willers *et al.*, 2015).

Los FA 14:00, 16:00, 18:00 son marcadores generales de la presencia de microorganismos (Ruess & Chamberlain, 2010). Por su parte los FA ramificados como 12:0 iso, 17:1 iso i, 17:0 iso 3OH, 17:1 iso w5c y 17:0 anteiso son marcadores utilizados para la detección de las bacterias Gram-positivas, entre las cuales están las bacterias ácido lácticas (Macnaughton *et al.*, 1997; Zelles, 1999).

Para las bacterias Gram-negativas los FA que las caracterizan son el 17:0 cyclo y el 19:0 cyclo w8c, además del 16:1 w5c, este marcador generalmente está asociado a hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en muestras de suelo, mientras que, cuando se trata de medios líquidos es probable que el 16:1 w5c corresponda a bacterias Gram-negativas (Zelles, 1999, Ruess & Chamberlain, 2010; Willers *et al.*, 2015).

Los FA 18:1 w7c 11-methyl, 19:0 10-methyl son indicadores de la presencia de actinobacterias, bacterias Gram-positivas que juegan un rol relevante en la descomposición de materia orgánica y que incorporan nutrientes al medio donde se encuentran (Zelles, 1999).

Los FA 16:1 w7c y 18:1 w7c son marcadores generales microbianos que se han reportado como indicadores del estado de estrés en el cual se encuentra la comunidad de microorganismos (Kaur *et al.*, 2005; Willers *et al.*, 2015). Se ha reportado que perturbaciones como cambios en el pH, aumentos en la temperatura o falta de nutrientes generan que las bacterias produzcan estos ácidos grasos para sobrevivir ante las condiciones de estrés (Merilä *et al.*, 2002; Baath & Anderson, 2003; Kaur *et al.*, 2005). Por lo tanto, este par de FA se utilizaron para determinar el nivel de estrés al que están sometidos los microorganismos en las diferentes fases de la bebida.

Por su parte, el 18:1 w9c es un marcador que se ha reportado en hongos saprótrofos del suelo y en levaduras, incluyendo cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Macnaughton *et al.*, 1997; Pathan *et al.*, 2010; Besada-Lombana *et al.*, 2017), una de las levaduras que están involucradas en la fermentación del pulque, por lo que se consideró a este FA como un indicador de levaduras.

Mientras que los FA 18:2 w6,9c y 18:3 w6c (6,9,12) también son indicadores de hongos, en su mayoría saprótrofos (Ruess & Chamberlain, 2010; Ferrari & Wall, 2017), aunque éste FA también está presente en células de plantas, por lo que es probable que esté influenciado por las células vegetales provenientes de la savia del agave (Willers *et al.*, 2015).

Evaluación de características físicas y químicas del pulque

A las 42 muestras que se colectaron se les midieron las siguientes características:

- Grados Brix (°Bx). Es una escala para determinar la cantidad de azúcares disueltos en un líquido. Se calcularon mediante un refractómetro manual (Vee Gee, ABT-32).
- pH. Se determinó con de un potenciómetro (Denver Instrument, model 215).
- Ácido láctico. Se tituló la muestra (a la cual se añadió fenolftaleína al 2%) con una solución básica de hidróxido de sodio 0.1 N, hasta que adquirió un color rosa pálido permanente. Después se leyó en la bureta la cantidad de hidróxido de sodio usado para neutralizar la sustancia, y con este dato se calculó la acidez total de la muestra en gramos de ácido láctico. Véase Anexo 3 para consultar el protocolo completo.
- Densidad. Cálculo mediante un picnómetro de 50 ml.
- Viscosidad. Se determinó la viscosidad con un viscosímetro de Ostwald. Se colocó la sustancia en el viscosímetro, hasta llenar el compartimento inferior; enseguida, el líquido se asciende por el capilar menor, hasta que sobrepasa la marca superior. Entonces se dejó caer el líquido y se tomó el tiempo en que recorría el tramo entre las marcas superior e inferior. Para obtener la viscosidad del líquido estudiado, se usó la siguiente ecuación: $n_1: d_1t_1n_2 / d_2t_2$. Donde n_1 y n_2 son las viscosidades del líquido estudiado y el líquido de referencia (agua), t_1 y t_2 , los tiempos que tardan en fluir y d_1 y d_2 las densidades (véase Anexo 3).
- Porcentaje de alcohol. Para ello fue necesario montar un kit de destilación (Anexo 3), en el cual se colocaron 200 ml de la muestra hasta evaporarla en su totalidad, recuperando el destilado a través de un refrigerante (75-85% del volumen inicial), para después, sumergir en el destilado un alcoholímetro graduado del 1-20 en escala Gay-Lussac y así conocer el porcentaje de alcohol en la bebida.

Análisis estadísticos

El análisis de los datos y la elaboración de las figuras fueron realizados a través del software R (v. 3.5.0) y Microsoft Excel.

* ANOVA y prueba de Tukey

Se realizaron pruebas de análisis de varianza (ANOVA) acompañadas de la prueba de Tukey para evaluar a través de comparaciones pareadas la significancia de las diferencias entre tratamientos.

* Análisis de componentes principales (ACP)

Se realizaron análisis de componentes principales para generar patrones de ordenación a partir de las distintas variables evaluadas. El primero para la morfometría de los magueyes, utilizando las variables previamente mencionadas. El segundo para la caracterización de los productores de pulque, donde las variables que se consideraron fueron:

- Número de magueyes en producción, es decir a los cuales se les estaba extrayendo savia en el momento en que se realizó la entrevista.
- Número de variedades de maguey utilizadas para elaborar pulque.
- Adquisición de maguey en el mercado, si no lo compra se codificó como 1, si lo compra se codificó con el número 2.
- Edad de la planta para que se encontrara lista para capar, registrada en años.
- Tiempo en meses que un maguey produce savia para su colecta.
- Número de raspados-colectas de savia al día.
- Litros de aguamiel que un maguey produce al día en promedio.
- Litros de pulque producidos en temporada de secas (octubre-mayo).
- Litros de pulque producidos en temporada de lluvias (junio-septiembre).
- Si aplicaban calor, el hervido de su aguamiel, antes de mezclar con su “semilla”, se codificó como 1 si no hierve, mientras que si se hierve se codificó con el número 2.
- Horas que tarda el aguamiel en fermentar para que esté listo el pulque.
- Actividades a las que se dedican, considerando a la producción de pulque y aguamiel.

El tercer ACP representa la variación dada por las características físicas y químicas de la bebida. Un cuarto y quinto se realizaron para representar la variación presente en los marcadores de ácidos grasos en los años de muestreo (2017 y 2018).

* Dendograma

Se elaboró un dendograma para determinar las similitudes de las variedades de agave utilizadas, el método de agrupamiento fue el método “*complete*” (la distancia máxima entre componentes).

* NbClust y Bootstrap

Se realizaron estas pruebas a los conglomerados de las variedades de agave para evaluar el número óptimo de conglomerados, así como la cohesión de los mismos; esto, a través del índice de Jaccard (0 representa nula cohesión, 1 alta cohesión).

VIII. RESULTADOS

8.1 El manejo del maguey y el pulque

En las comunidades donde se realizó este trabajo, Santiago Undameo (SU) y Tarímbaro (T), el manejo de maguey pulquero representa una estrategia de subsistencia para las familias campesinas. Es un medio por el cual obtienen diferentes recursos: 1) alimenticios (al consumir el aguamiel y el pulque), 2) económicos (vendiendo el producto), 3) medicinales (se colocan pencas de maguey cocidas sobre heridas), 4) como forraje para el ganado (pencas cortadas en trozos pequeños), así como otros beneficios asociados a la disposición espacial de las plantas, como son 5) el bordeo de las parcelas para retener la humedad en la tierra y evitar la erosión, y 6) la delimitación/protección de terrenos y caminos a través de cercos vivos.

El sistema campesino en que se inserta el maguey para la elaboración de pulque tiene una racionalidad multipropósito, y aunque se pondrá énfasis en la colecta de aguamiel para elaboración de pulque, es pertinente destacar esta característica.

Todas las familias que se entrevistaron echan mano del maguey pulquero y de otras estrategias para satisfacer sus necesidades (Tabla 3). La mayoría son familias de agricultores que cultivan principalmente maíz, frijol, haba y forrajes para ganado; también son ganaderos, practicando la crianza de vacas y borregos, mientras que algunos han incursionado en atender un local comercial como tiendas de abarrotes, peluquerías, entre otros.

Tabla 3. Productores entrevistados y actividades a las que se dedican. SU= Santiago Undameo, T= Tarímbaro.

	Nombre	Localidad	Número de actividades reportadas	
1	Antonia	SU	4	Agricultura, Ganadería, Abarrotes, Pulque
2	Fernando	SU	4	Agricultura, Ganadería, Mercado, Pulque
3	Jesús	SU	3	Agricultura, Ganadería, Pulque
4	Pedro	SU	3	Agricultura, Ganadería, Pulque
5	Rosa	SU	4	Agricultura, Ganadería, Comida, Pulque
6	Beatriz	T	3	Agricultura, Peluquería, Pulque
7	Cata	T	4	Agricultura, Peluquería, Internet, Pulque
8	Isidro	T	2	Abarrotes, Pulque
9	María Luisa	T	3	Agricultura, Comida, Pulque
10	Rigoberto	T	2	Agricultura, Pulque
11	Simón	T	2	Agricultura, Pulque
12	Teresa	T	3	Agricultura, Mercado, Pulque

Por ejemplo, Don Fernando además de cuidar sus magueyes y producir pulque, siembra maíz, frijol, haba y pastura para sus vacas, tiene borregos, gallinas, guajolotes y sale en su camioneta a diferentes mercados y tianguis de Morelia a vender muebles. “*Así andamos de aquí para allá, uno le tiene que hacer de a todo*” comenta mientras despacha pulque a unos jóvenes en el tianguis. Don Isidro o Doña Antonia han optado por tener un local de abarrotes en su domicilio, donde además tienen mesas y bancos para los que lleguen por pulque. También está el caso de Doña Cata, quien se dedica a preparar y vender su pulque mientras sus nueras atienden una peluquería y un negocio de internet. Otra de las actividades es la venta de comida preparada, Doña Rosa deleita a los comensales con arroz y mole con pollo. Mientras que María Luisa vende botanas y antojitos fuera de su hogar.

El sistema de maguey pulquero en ambos sitios se encuentra dentro de la matriz agrícola. Los magueyes se encuentran: A) Delimitando parcelas, es decir alrededor de la milpa. B) Formando pequeñas pero densas magueyeras, en espacios donde el terreno no es apto para el cultivo de maíz. C) Bordeando caminos que se han abierto para que transiten autos o los senderos que utilizan las personas. Siendo más frecuente el caso A (Fig. 11).



Figura 11. A) Magueyes delimitando una parcela, izquierda sin cultivo, derecha con maíz. B) Magueyera. C) Magueyes al borde de la carretera.

Las razones por las cuales las personas siembran magueyes en sus parcelas son porque 1) contribuyen a delimitar parcelas, 2) retienen humedad en el suelo y 3) evitan que personas o animales entren y dañen el terreno y el cultivo.

Todos los productores se dedican a la agricultura (excepto Don Isidro, quien por su avanzada edad y por no tener alguien que le ayude ya no practica esta actividad) y, por lo tanto, tienen magueyes propios. Además hay productores (5) que compran magueyes a sus vecinos. El precio de un maguey maduro, es decir listo para producir pulque, va de los \$350 si es chico (cerca de 2 m de altura), \$500 si es grande (entre 2.5 y 3 m) y \$700 si llega a superar los 3 m de altura.

Los productores identifican y manejan diferentes variedades de maguey pulquero, las cuales categorizan a partir de su morfología y las características de su savia.

Las variedades de maguey utilizadas para pulque en SU son:

- “*Verde*” (n=17). Es la variedad más utilizada por la cantidad y calidad de su savia, produce en promedio 3 L al día durante 4 meses y es muy valorada por su alta dulzura. Este maguey tiene una altura de 209.18 ± 4.12 cm (promedio \pm error estándar), es frondoso, con pencas anchas de 26.5 ± 0.4 cm y una longitud de 153.21 ± 3.66 cm, mayormente acanaladas hacia la punta. Sus hojas tienen en promedio 38.94 ± 3.39 dientes laterales y una espina terminal prominente (7.30 ± 0.24 cm). Su coloración es de un verde intenso (Fig. 12-A).
- “*Negro*” (n=18). Es una variedad que es reconocida con los mismos atributos que “*Verde*”, solo que posee una coloración verde más oscura. Un solo productor la identificó, el resto de los productores no hizo la distinción entre “*Verde*” y “*Negro*”, los datos de morfometría tampoco muestran diferencias entre estas variedades (Fig. 12-B).
- “*Tarímbaro*” (n=2). Esta variedad es poco utilizada en SU pues, de acuerdo con los productores, su savia no es tan dulce como la del “*Verde*”, por lo cual su abundancia es reducida. Sin embargo, las personas entrevistadas comentaron que produce aguamiel en mayor cantidad, 4 L al día en promedio. Esta variedad es la más grande, tienen una altura promedio de 269 ± 11 cm, sus hojas son más delgadas y largas (24 ± 0 cm de ancho y 203 ± 19 cm de largo) que las de las otras variedades, por lo que pierden rigidez y es común verlas “vencidas” o dobladas. Esta variedad cuenta con 65.50 ± 1.5 dientes laterales, pero son muy pequeños, parecieran desaparecer, la espina terminal es de 3.88 ± 0.12 cm de largo. Recibe el nombre de “*Tarímbaro*” ya que según los pobladores del lugar este maguey lo trajeron de esa localidad (Fig. 12-C).

- “*Cenizo*” (n=2). Esta variedad casi no se encuentra en la zona, solo un productor la tenía y en una proporción ínfima (se registraron solamente dos individuos). Es poco utilizada ya que la savia es insípida y el pulque que se prepara con ésta no es tan apreciado. Esta variedad tiene una tonalidad glauca, de ahí su nombre de “*Cenizo*”. Tiene una altura promedio de 167 ± 13 cm, las hojas están erectas y más pequeñas que las de las otras variedades (21.5 ± 0.5 cm de ancho, 125.50 ± 9.5 cm de largo), posee 36.5 ± 3.5 dientes laterales, los cuales poseen una notoria forma de gancho, su espina terminal es de 3.34 ± 0.34 cm (Fig. 12-D).

Las variedades de maguey pulquero utilizadas en T son:

- “*Verde*”. Esta variedad posee las mismas características que la variedad “*Verde*” de SU. Este maguey también aquí es muy valorado por considerarse el maguey pulquero por excelencia, por lo que se encuentra con bastante frecuencia en las parcelas (Fig. 12-A).
- “*Listoncillo*” (n=27). Posee características similares a la variedad “*Tarímbaro*” descrita para SU. Aquí le nombran “listoncillo”, precisamente por lo largo, delgado y caído de sus hojas, que asemejan un listón. En T la gente también afirma que su savia es menos dulce que la de la variedad “*Verde*”, produciendo en promedio 4 L al día durante 4 y hasta 5 meses las plantas más grandes. Esta variedad es frecuentemente utilizada en T, y es tan abundante como la variedad “*Verde*”, es común encontrar manchones exclusivos de esta variedad (Fig. 12-C).
- “*Blanco*” (n=2). Es una variedad glauca, con pencas ligeramente acanaladas y erectas. Mide 238 ± 12 cm de altura; el ancho y largo de las hojas miden 29.5 ± 0.5 cm y 168.5 ± 2.50 cm respectivamente, tiene 37 ± 1 dientes laterales y en forma de gancho, la espina terminal es de 4.13 ± 0.62 cm de largo. Es menos utilizada que las dos anteriores ya que el aguamiel no es tan “rica”, pues para los productores es menos dulce (Fig. 12-E).
- “*Carrizaleño*” (n=4). Es un maguey glauco, de pencas casi planas y erectas, tiene un peculiar ensanchamiento en la parte media de la hoja. Tiene una altura de 218 ± 10.17 cm, sin ser frondoso, sus hojas miden 27.75 ± 2.29 cm de ancho por 167.75 ± 6.28 cm de largo. Se caracterizan por ser altamente fibrosos, de ahí su nombre, “*están muy duros, son como carrizos*” (Doña Cata, comunicación personal, 2018). Tiene los dientes laterales (35.75 ± 1.80) en forma de gancho, su espina terminal mide 3.26 ± 0.11 cm. Los productores entrevistados afirman que su savia es muy dulce al inicio de la producción, pero pasando el mes y medio o dos meses la savia se vuelve insípida “*se hace como agua*” (Doña Cata, com. pers., 2018). Es la variedad que se encuentra en menor proporción en T (Fig. 12-F).

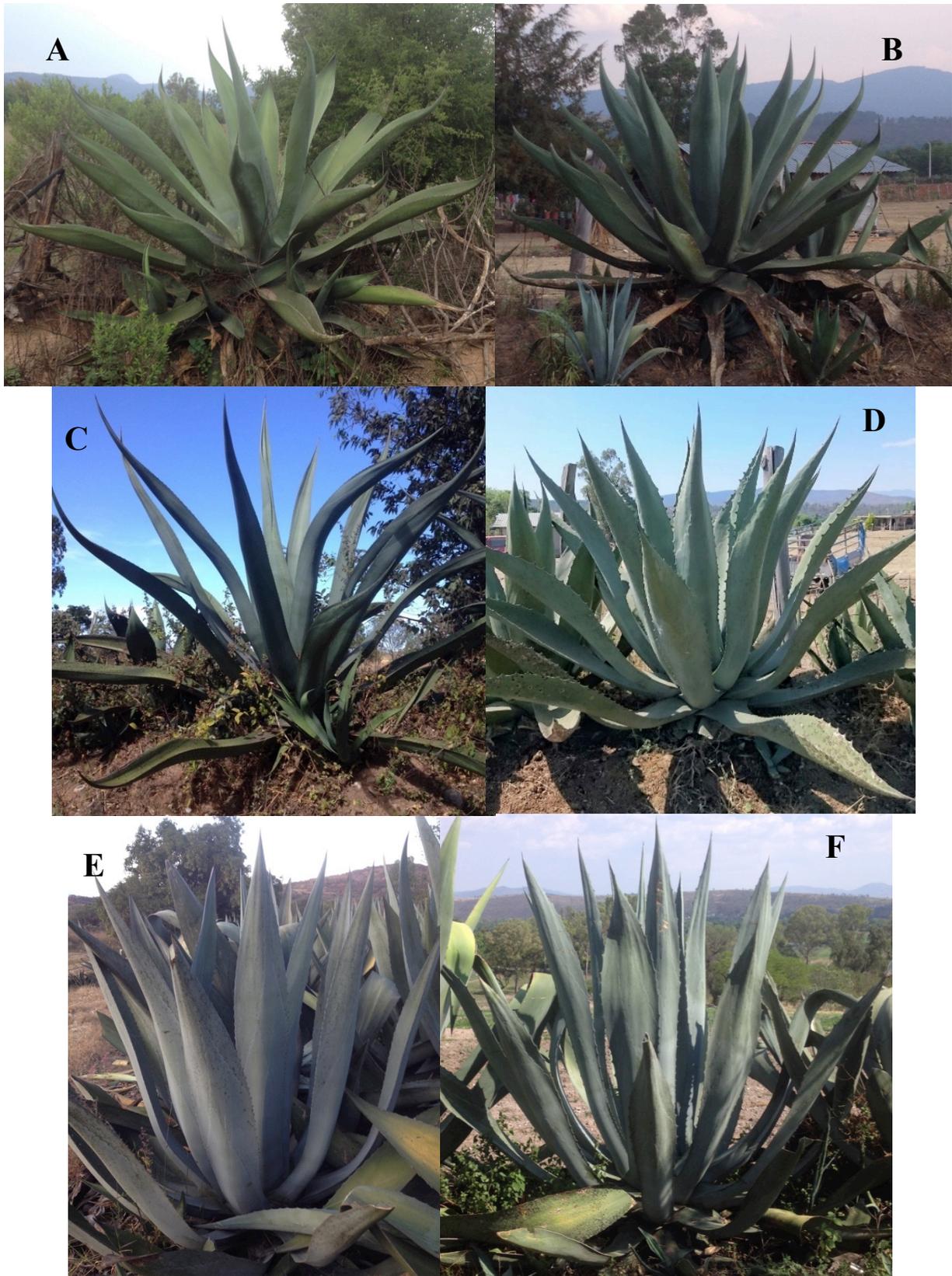


Figura 12. Variedades de maguey utilizadas para elaboración de pulque en SU y T. A) *Verde*, B) *Negro*, C) *Tarimbaro / Listoncillo*, D) *Cenizo*, E) *Blanco* y F) *Carrizaleño*.

Es importante mencionar que las variedades “Verde/Negro” y “Tarímbaro/Listoncillo” son las más utilizadas y están presentes en ambas localidades, mientras que las otras variedades son utilizadas en menor medida y no se comparten entre localidades. Además, las variedades más utilizadas son las variedades de mayor talla y con savia más dulce, aspectos que se consideran rasgos de los síndromes de domesticación en el género. En contraparte, las variedades menos utilizadas corresponden a la que otorgan menor calidad de su savia y cuyas condiciones morfológicas dificultan su manejo; por ejemplo, sus dientes laterales son más pronunciados, tienen forma de gancho o la condición fibrosa de la hoja.

La clasificación campesina de los magüeyes se analizó mediante morfometría. Mediante un ACP se identificó que el primer componente explica el 49% de la variación, mientras que el segundo explica el 16%. En el primer componente las variables relevantes del sentido positivo son el total de dientes (DTOT), largo de hoja (LH) y altura de la planta (AL), mientras que en el sentido negativo figuran el ancho de diente (AD) y largo de espina (AE). En el segundo componente, la ordenación la determina mayormente la altura del tallo (ALTA) en dirección positiva y la distancia entre dientes (DED) en la negativa (Fig. 13).

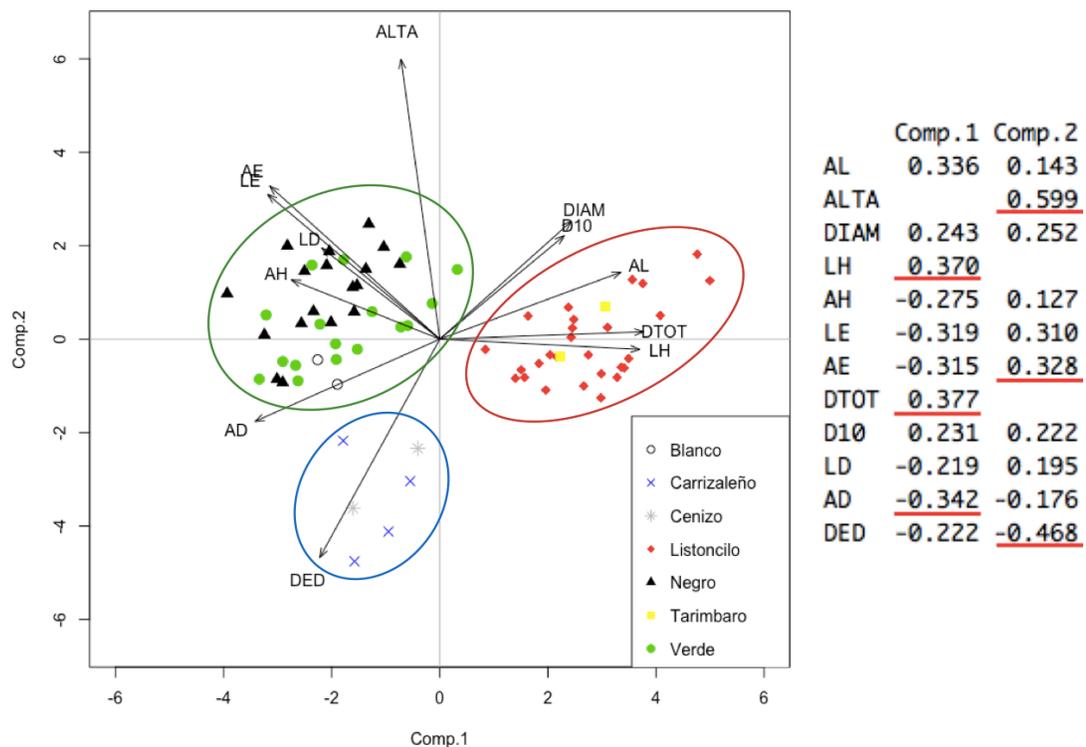


Figura 13. Análisis de componentes principales (ACP), se puede observar la conformación de 3 grupos. Las variedades “Tarímbaro” y “Listoncillo” forman el grupo rojo. Las variedades “Verde”, “Negro” y “Blanco” el grupo verde. “Carrizaleño” y “Cenizo” el azul. Acompañan el gráfico el valor de los vectores (variables) del ACP.

El patrón de ordenación generado muestra tres grupos bien definidos (Fig. 13). El primero (en el círculo rojo) en el sector de la derecha lo conforman los individuos “*Tarímbaro*” y “*Listoncillo*”. El segundo grupo (en el círculo verde) se ubica cargado hacia el cuadrante superior izquierdo lo forman las variedades “*Verde*”, “*Negro*” y “*Blanco*”. Mientras que las variedades “*Carrizaleño*” y “*Cenizo*” se ubican en la parte inferior (círculo de color azul).

Podemos observar que las características de altura (AL), diámetro promedio (DPRM) y largo de la hoja (LH) determinan en gran medida al grupo del círculo rojo, y precisamente se debe a que son individuos de las variedades más grandes.

El grupo del círculo verde se caracteriza por incluir plantas de menor talla, aunque las hojas son más cortas son más anchas que las del grupo del círculo rojo, además los dientes laterales son más grandes y tienen considerablemente una espina terminal de mayor tamaño.

Finalmente, el grupo menos cohesionado, el del círculo azul, que está conformado por los individuos de las variedades “*Carrizaleño*” y “*Cenizo*”. Este grupo se conforma principalmente por las características de su dientes más grandes y más espaciados unos de otros que los de las otras variedades, además son los magueyes de menor talla.

Para corroborar la significancia de los conglomerados, se realizó el análisis “NbClust” el cual indicó que tres es el número óptimo de grupos. Además, el análisis de “Bootstrap” arrojó un coeficiente de Jaccard de 0.77 para el grupo rojo, 0.66 para el verde y 0.16 para el azul, lo que confirma que el grupo más cohesionado y homogéneo es el rojo, seguido del verde, teniendo el azul un coeficiente de cohesión muy bajo. Esto último puede deberse, en parte, al bajo número de datos, y en parte también a que lo constituyen, muy probablemente, variedades de taxa diferentes.

Para determinar la similitud de las variedades se realizó un dendograma (Fig. 14). Con este análisis podemos apreciar la consistencia de los grupos identificados a través del ACP. El grupo del círculo rojo, conformado por las variedades “*Tarímbaro*” y “*Listoncillo*”, que con base en los análisis realizados y la revisión de las descripciones taxonómicas (Gentry, 1982) podemos afirmar que se trata de *Agave mapisaga* var. *mapisaga*, ésta es la especie que incluye los individuos más grandes del género, que se caracterizan por su hojas alargadas y generalmente dobladas, además de pequeños dientes laterales que van de los 2 a los 5 mm de largo (Gentry, 1982). Por otra parte, el grupo del círculo verde, conformado por las variedades “*Verde*” y “*Negro*” incluye individuos de *Agave salmiana* var. *salmiana*. Aunque las variedades son identificadas como diferentes debido a su coloración, la morfometría de las plantas es similar, *A. salmiana* var. *salmiana* se caracteriza

además de su gran tamaño, la peculiar forma de sus hojas: convexas en la base, cóncavas hacia arriba con el ápice curvado en forma sigmoidea (Gentry, 1982).

Con respecto al resto de las variedades de maguey pulquero utilizadas en la zona de estudio, su identidad no es tan clara. De acuerdo a las claves taxonómicas de Gentry (1982), *Agave americana* se caracteriza por tener hojas lanceoladas, estrechadas hacia la base, redondeadas hacia abajo, a partir de los 2/3 superiores de la hoja, ésta tiende a aplanarse, son firmes, gruesas, rectas y ascendentes. Posee dientes laterales en notable forma de gancho y espina terminal de 3 a 6 cm de largo, además de sus tonos glaucos y grises.

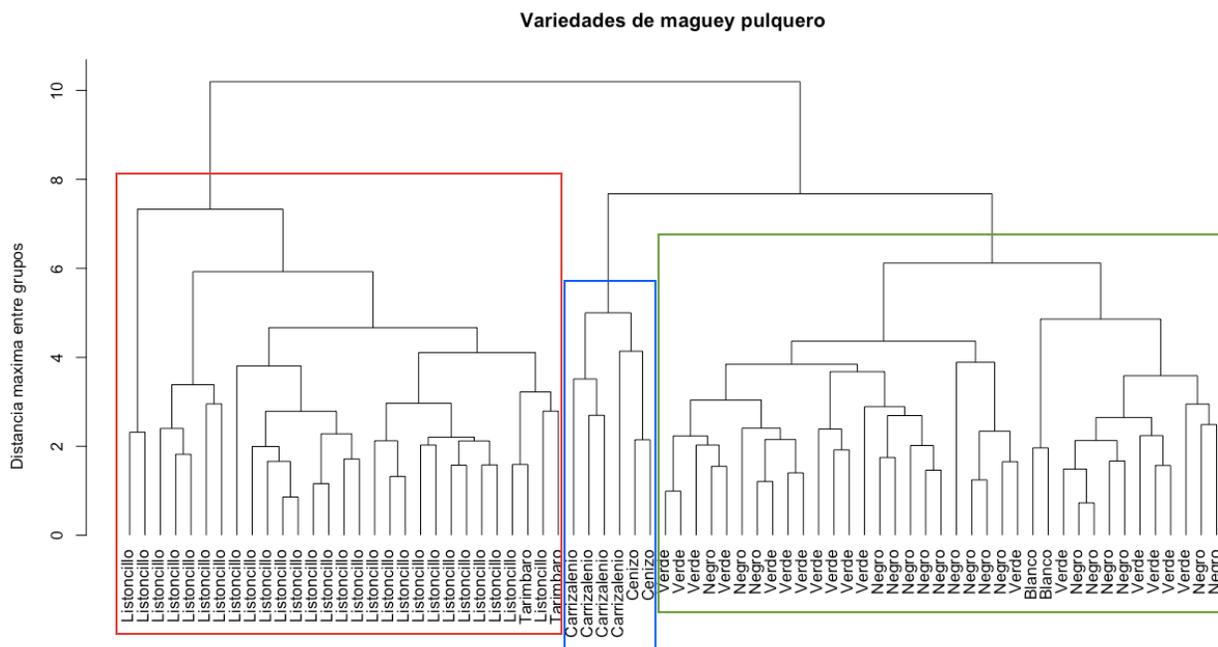


Figura 14. Dendrograma (a partir de la distancia máxima entre componentes) de las variedades de maguey utilizadas para elaborar pulque, en rojo las variedades “*Listoncillo*” y “*Tarímbaro*”, en azul las variedades “*Carrizaleño*” y “*Cenizo*”, en verde las variedades “*Negro*”, “*Verde*” y “*Blanco*”. Coeficiente de correlación cofenética= 0.77.

Con los rasgos enlistados y los análisis realizados se propone que tanto las variedades “*Carrizaleño*” como “*Cenizo*” corresponden a *Agave americana*. La variedad “*Blanco*” se agrupa con las variedades “*Verde*” y “*Negro*”, y son por lo tanto del grupo *A. salmiana*. No obstante, las fotografías y descripciones levantadas en las parcelas de los individuos observados de esta variedad, su condición glauca, lo erecto de sus pencas, así como una rugosidad distinta e impropia de *A. salmiana* hace dudar de esta identidad, pero solo fue posible medir dos individuos de la variedad “*Blanco*”. Los individuos de maguey “*Blanco*” se identificaron así por su coloración, sin embargo su morfometría los asemeja a la variedad “*Verde*”.

Con todos los elementos anteriores, la identidad de las variedades “Blanco”, “Carrizaleño” y “Cenizo” no está del todo definida. Las características medidas no describen en su totalidad a los individuos ni a la especie, pues no se registraron datos morfométricos de las estructuras reproductivas, como el escapo, las flores y los frutos. Lo que sí resulta claro es que en los sistemas estudiados las variedades más importantes por su presencia y aprovechamiento son las de *Agave salmiana* var. *salmiana*, las predilectas por sus condiciones de la savia; seguidas por las de *A. mapisaga* var. *mapisaga*, que aunque de calidad menor, es apreciada por el alto volumen de savia producido; mientras que con menor frecuencia los productores recurren a otras variedades, las cuales se asemejan a *A. americana*. La baja preferencia se debe a su menor talla, su condición más agreste y la baja calidad de su savia, en comparación con las otras variedades.

El proceso de propagación y corte de maguey, así como la colecta de savia es muy similar entre las dos comunidades. Para aprovechar estas variedades, los productores propagan los magueyes mediante trasplante de los propágulos denominados hijuelos. Estos hijuelos crecen alrededor de la planta madre y cuando “*ya se ven macizos*” (cuando están robustos y los manejadores juzgan que tienen el vigor adecuado, generalmente cuando tienen una altura de aproximadamente 30 cm) se trasplantan a otro sitio donde puedan crecer, generalmente se siembran en hileras en espacios como los que ya se han descrito (Fig. 15-A).

Ningún productor colecta las semillas de maguey para germinar y es poco común que dejen florecer a los magueyes, “...*solo alguno que otro que se olvide o se quede por ahí en una barranca o de gente que pues ya no le interesa sacar pulque*” (Don Pedro, com. pers., 2017). Estos son los individuos que se quedan rezagados y cuyos quíotes se pueden observar a la distancia.

Los productores afirman que un maguey está listo para producir pulque cuando tiene una edad de 8 años (comentan los productores de T) o 10 años (de acuerdo con la gente de SU). Esto se puede distinguir por indicadores como el adelgazamiento de la parte central de la planta “*el cogollo se vuelve delgadito*”, las pencas más alejadas del tallo se expanden mientras que las cercanas al tallo se cierran hacia este, de tal manera que los productores lo describen como si “*el maguey se empezara a esponjar*”. Otros productores lo identifican a partir del número y tamaño de las hojas “*tú puedes ver cuando ya está bueno porque tiene unas hojotas bien grandotas, está bien deshojado y ahí le cuentas las hojas, si son 40 ya está bueno*” (Don Isidro, com. pers., 2016).

Cuando un maguey alcanza el estado descrito se “*capa*”, es decir se corta el tallo central, generando una oquedad en la cual mana y se acumula la savia. Primero los productores sacrifican

un par de hojas para poder acceder al centro de la planta, después se cortan los bordes de las pencas aledañas, para evitar rasguños con los dientes laterales (Fig. 15-B).

Seguido de esto se corta el tallo desde la unión con las primeras hojas, después se excava para formar el “*cajete*”, que es la oquedad donde se acumulará la savia (Fig. 15-C, D, E). Cuando está listo el cajete, se tapa con los restos de las pencas cortadas y piedras, en los días siguientes los productores irán raspando esta oquedad con una herramienta llamada raspador, que consiste en una cuchara de metal afilado, con la que remueven el tejido que se forma a manera de cicatriz. Producir esta lesión en la planta permite que la savia emane de los poros descubiertos (Fig. 15-F, G, H, I).

La savia es colectada con una taza de plástico y se coloca en un botellón o cubeta que lleva consigo el productor. Después de cada colecta es necesario volver a raspar el cajete para coleccionar aguamiel en la próxima visita al maguey y así sucesivamente. En los primeros días de esta actividad la savia es escasa, “*nomás da un vasito*”, y no suele consumirse porque aseguran que es amarga; pero pasando unos 3 días la savia aumenta su volumen y calidad, llegando un maguey a producir entre 2.5-4 litros al día, durante 3 meses en promedio y hasta por 4-5 meses los individuos más grandes. La producción continúa hasta que el maguey se seca, esto es, cuando todas las pencas pierden su rigidez, se marchitan y la savia deja de manar (Fig. 16).

Algunos productores realizan el raspado y la colecta del aguamiel una vez al día, otros en dos ocasiones, todos aseguran que en días calurosos es mejor extraerla dos veces al día ya que el calor acelera el proceso de fermentación de la savia y se puede poner agria, mientras que en días fríos no tienen este inconveniente. Sin embargo, se apreció que los productores que coleccionan una vez al día lo hacen por las mañanas, de 5 a 7 am, y no tienen tiempo de hacerlo en la tarde porque tienen otras actividades o tienen que atender su negocio. Mientras que las personas que coleccionan por la mañana y por la tarde (5-6 pm) es porque cuentan con una mayor disponibilidad de tiempo o porque sus magueyes están a una distancia más cercana de sus viviendas. Por ejemplo, en Tarímbaro Don Rigo colecciona su aguamiel en la mañana, llega a su casa, prepara su pulque y lo lleva a vender a Morelia, regresa en la tarde y ya “no le da tiempo de irse a dar otra vuelta a sus magueyes”. Mientras que Doña Rosa en Santiago Undameo, raspa sus magueyes por las mañanas y por las tardes los magueyes que están en las parcelas aledañas a su casa, y asegura que “siempre se da un tiempo para cuidar sus plantas”.

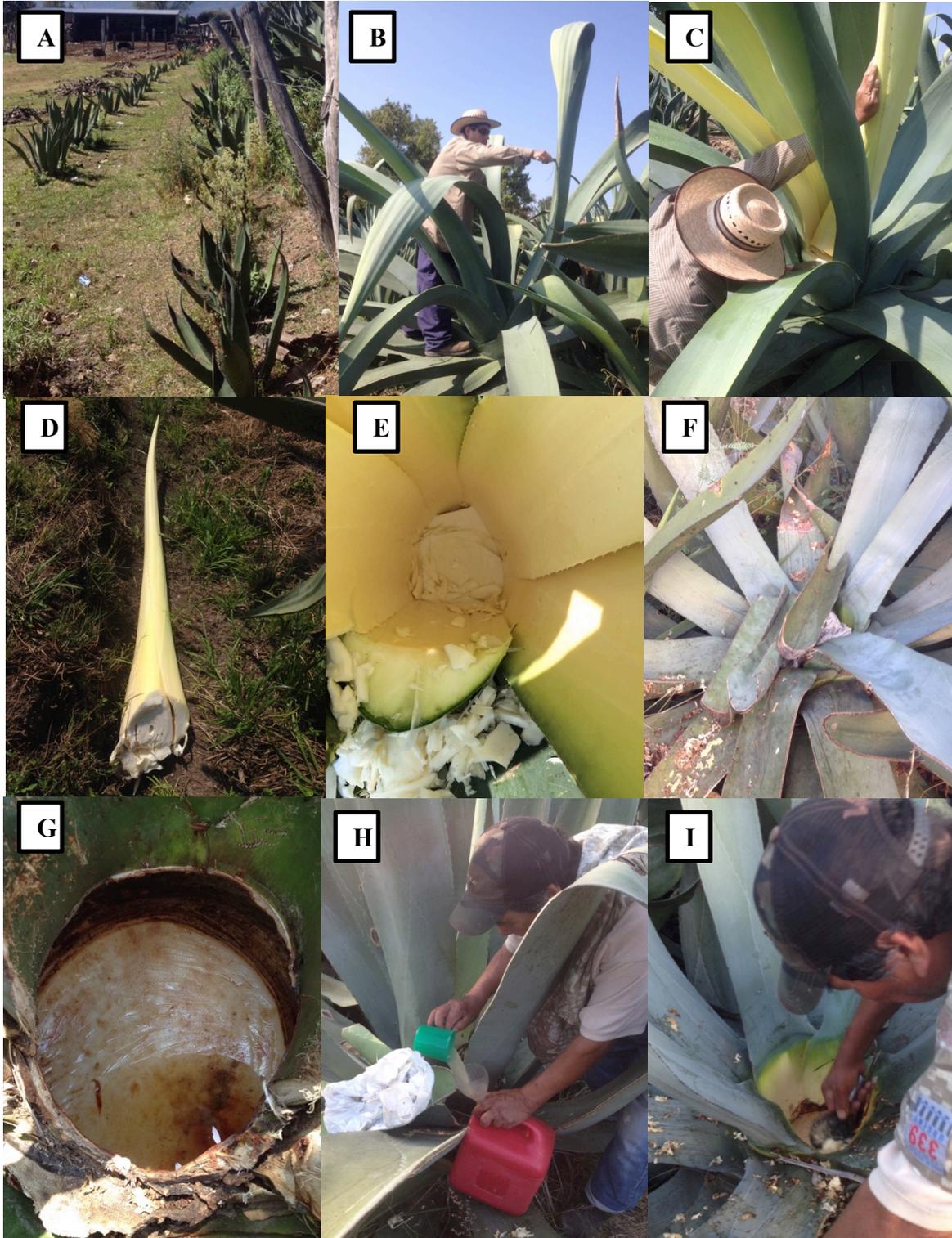


Figura 15. A) Fila de magueyes pequeños con un año de trasplante. B) Inicia el capado de maguey maduro, cortando espinas laterales. C) Corte del tallo central. D) Tallo cortado. E) Oquedad excavada en el centro del maguey, donde se acumulará la savia. F) Oquedad cubierta con pencas. G) Oquedad descubierta con savia acumulada. H) Colecta de savia. I) Raspado de maguey para que continúe manando la savia.



Figura 16. Maguey “Verde” (*A. salmiana* var. *salmiana*) al inicio de la producción de aguamiel (dic-16). El mismo individuo al final de la producción (may-17).

Los productores aseguran que la mejor época para el pulque, es la temporada de secas (de octubre a abril), ya que cuando llueve (mayo a septiembre) el agua entra en los magueyes y eso disminuye la calidad de la savia pues rebaja el sabor. Para evitar esto los productores amarran sobre los magueyes un plástico para que a manera de toldo el maguey se proteja de la lluvia y evite que entre agua en el cajete (Fig. 17).



Figura 17. Maguey “Listoncillo” (*A. mapisaga* var. *mapisaga*) cubierto con un plástico para evitar que la lluvia entre a la oquedad donde se acumula la savia.

La extracción de savia en la época de lluvias continúa y aunque la demanda de pulque disminuye, pues según la percepción de los clientes “*el pulque no sale bueno, sale aguado*” (Don Martín, com. pers., 2016), los productores siguen raspando algunos magueyes: “*No sacamos tanto*

porque no seguimos quebrando maguey, pero los que quedan siguen dando ni modo que le digamos no espérate, ahorita no des” (Don Fernando, com. pers., 2017).

Cada productor tiene entre 10 y 15 magueyes en producción, de los cuales extraen en promedio 32 L (en T), y 26 L (en SU) al día durante la época de secas. Mientras que en la época de lluvias las condiciones cambian en SU, donde los productores solamente extraen la savia de los magueyes que comenzaron a producir aguamiel en la época de secas y que continúan produciéndola en la temporada de lluvias. Este volumen en SU llega a ser muy reducido, de 10-15 L al día, hasta que los magueyes dejan de producir y se suspende la actividad durante los meses lluviosos, reanudándola al final de la temporada de lluvias. Por su parte, en T el volumen producido no se reduce tanto, si bien todos los productores entrevistados aseguraron que se extrae menos aguamiel y se vende menos pulque, ninguno suspende la actividad durante esta época, durante la cual la producción se reduce a cerca de 10 L por día.

Una vez colectada la savia, se transporta a las casas de los productores donde en algún espacio destinado a la elaboración de pulque comienza su preparación. En esta fase se presenta la mayor divergencia en técnicas de manejo entre las comunidades estudiadas.

La elaboración del pulque en T ocurre en espacios frescos, donde no entra el sol, pues resulta conveniente no tener altas temperaturas para conservar la bebida. Son cuartos dentro de la casa, semejantes a una cocina, donde se encuentran unos tambos de plástico, generalmente de 20L. En estos tambos se encuentra el *“pie del pulque”*. Este *“pie”* es un volumen de pulque menor a un litro y consiste en el sedimento derivado del pulque preparado el día anterior, los productores afirman que el *“pie”* sirve para *“que el aguamiel trabaje rápido, fermente, saca una espuma blanca y hasta se oye como trabaja, el pie hace que quede sabroso el pulque”* (Doña Beatriz, com. pers., 2016). En el *“pie”* se encuentra la comunidad de microorganismos fermentadores, adecuados para transformar las azúcares de la savia en ácido láctico, dióxido de carbono, alcohol y demás derivados de la fermentación.

Los productores procuran tener este *“pie de pulque”*, pues como comentan es lo que les permite preparar su pulque. Para generar su *“pie”* los productores colectan un volumen de aguamiel (3L) y lo dejan reposar en un recipiente tapado con una manta, con lo cual la savia tendrá una fermentación *“espontánea”* producida por los microorganismos asociados al aguamiel. Se deja fermentar el líquido de 48 a 72 horas. Después se revolverá ésta aguamiel fermentada *“espontáneamente”* con aguamiel fresca en una proporción de 1:2 (por 3 L de aguamiel fermentado,

se agregan 6 L de aguamiel fresco) y ahí generan una primer tanda de pulque; después de vender o consumir este pulque primigenio, en el recipiente va a quedar un sedimento blanquecino, el cual llega a percibirse ligeramente arenoso, este es el “*pie de pulque*”, con el cual al día siguiente al agregar aguamiel fresco, se producirá pulque.

Al momento de agregar el aguamiel fresco al “*pie*”, es necesario verterlo con una malla, con el fin de evitar que pasen restos del tejido raspado o insectos. Una vez agregado el aguamiel fresco, la mezcla resultante comienza a fermentar y a producirse una efervescencia que deriva en una espuma blanca a la boca de los recipientes, a esto le llaman “*que el pulque trabaje*” (Fig.18-C). De acuerdo al conocimiento y las preferencias de los productores, el proceso de fermentación dura 3 horas y después de este tiempo el pulque está listo para beberse.

En SU el proceso de elaboración es distinto. En esta localidad después de colectar la savia se cuele y se pone en una olla al fuego, para darle un ligero hervor (no más de un minuto). En cuanto el aguamiel comienza a hervir lo retiran del fuego y lo dejan enfriar, para después mezclarlo con el pulque añejo que en SU recibe el nombre de “*semilla*”. Usualmente la savia que es colectada durante las mañanas se hierve y deja enfriar un par de horas para después revolver con la “*semilla*”, mientras que la recolectada en la tarde se hierve y se deja enfriar durante esa noche para agregarla en la mañana siguiente (Fig. 18-A, B).

El proceso de elaborar la “*semilla*” en SU es similar al que se practica en T, consiste en dejar fermentar aguamiel un par de días para después mezclar este fermento pero con aguamiel hervido. Pasadas 2 horas y cuando se aprecia la efervescencia del pulque, se considera que la bebida está lista para consumirse.

Los productores de pulque de SU hierven su aguamiel “*Para que no dé el caramelo. Si no se cuece la aguamiel pica la garganta, como cuando sacas la aguamiel y te raspa el maguey en el brazo y eso te da harta comezón, pues así pero en la boca. Si uno la hierve ya se le quita el caramelo y queda sabroso el pulque*” (Doña Rosa, com. pers., 2016).

Los productores de SU afirman que el aguamiel provoca un ligero escozor en la garganta, el “*caramelo*”, y para eliminar esa sensación es necesario hervirlo. Con esta práctica logran que la savia y el pulque sepan como a ellos les gusta, que *no encareme o no pique*.



Figura 18. A) Colado de aguamiel fresca en olla para hervir (SU). B) Hervido de aguamiel (SU). “Pulque trabajando”, después de agregar aguamiel al “pie” se produce una espuma blanca en la bebida (T).

Una vez que el pulque está listo para tomarse, los productores lo venden en sus domicilios. Además, tres productores llevan su producto a los tianguis o mercados. El precio por litro en promedio es de \$20 en SU y de \$16 en T.



Figura 19. Los productores venden su pulque en sus hogares, otros además lo llevan a tianguis y mercados.

Se realizó un ACP para analizar las condiciones de los productores de pulque en ambas localidades (Fig. 20). El primer componente explica el 38% de la variación, mientras que el segundo explica el 25%. En el primer componente, las variables que tienen más peso en el sentido

positivo del eje son el número de variedades utilizadas (Num_var) y los litros producidos en un día de temporada de lluvias (L_lluvias), mientras que en el sentido negativo, las principales variables que influyen son la edad a la cual se aprovecha el maguey para pulque (Edad_mag) y la práctica de hervir la savia antes de revolverla con el pulque (Calor). Este resultado se debe a que en SU los manejadores de pulque hierven el aguamiel y en T no lo hacen; además, en Tarímbaro producen pulque durante la época de lluvias y utilizan mayor número de variedades que en SU.

En el segundo componente las variables de mayor peso son el número de magueyes aprovechados de manera simultánea (Num_mag), así como los litros producidos en un día de temporada de secas (L_secas), los meses que dura un maguey generando savia (Mes_prod) y el número de actividades a las que se dedican los productores (Act). Esta información permite apreciar que ambas localidades producen cantidades similares de pulque (litros) durante la temporada de secas, pero dentro de cada sitio hay productores más grandes que otros; es decir, producen y venden más litros de pulque que otros productores de la misma localidad y, por lo tanto, tienen más magueyes aprovechándose. Además, se puede apreciar que el hecho de que los productores realicen mayor número de actividades no implica que produzcan menos pulque.

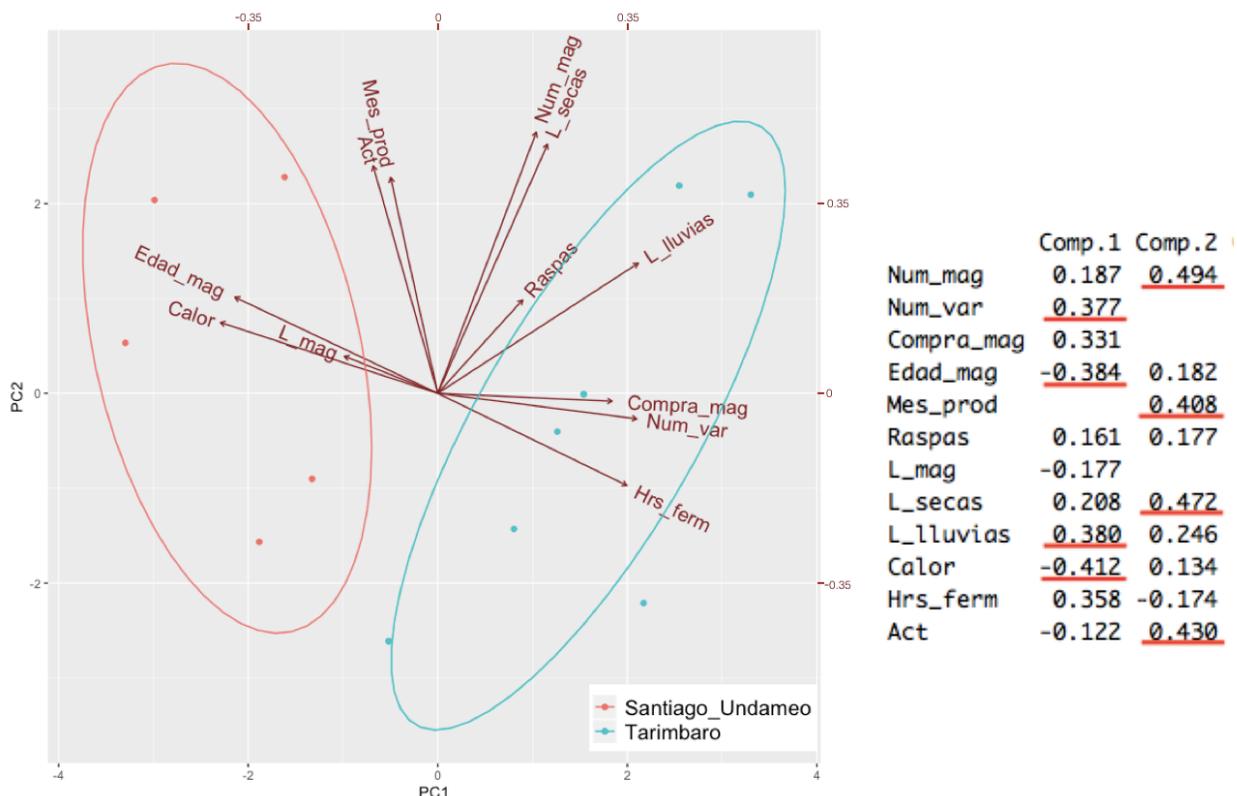


Figura 20. Análisis de componentes principales (ACP), en rojo los productores de Santiago Undameo, en azul los de Tarímbaro. Acompañan el gráfico el valor de los vectores (variables) del ACP.

8.2 Características físicas y químicas de la bebida

En esta sección se presentan las características físicas y químicas de la bebida en sus diferentes fases: A= aguamiel (savia recién extraída del maguey), H= hervido (savia después del proceso de hervor), P= pulque (savia con entre 3-5 horas de fermentación) y S= semilla (pulque añejo con el que se inocula la savia).

La Tabla 4 muestra el promedio y error estándar de las características medidas por las diferentes fases de la bebida y por la comunidad productora (el sitio). Para cada característica se realizó un ANOVA de dos vías, poniendo a prueba la significancia del efecto del factor “Fase” de la bebida (A, H, P, S) y del factor “Sitio” de proveniencia (SU o T). Este análisis no identificó diferencias significativas entre sitios para ninguna de las características analizadas (ej. Brix~Fase+Sitio, $p(\text{Sitio})= 0.54$). Sin embargo, el factor “Fase” sí establece diferencias altamente significativas (ej. Brix~Fase+Sitio, $p(\text{Fase})= 1.36e-10$). Esto se debe a que las condiciones de la savia se modifican con el tiempo y debido al manejo que realizan los productores (como el hervor del aguamiel y la inoculación mediante el “pie”), con estas prácticas la savia está en una continua fermentación y las características físicas y químicas se modifican. Por lo anterior, se optó por aplicar el modelo más sencillo y acotarse al factor Fase para discernir diferencias en los parámetros analizados (Tabla 5). Para mostrar la variación de la cada una de las características medidas, se elaboraron gráficas de caja y bigotes, en las cuales además se reporta la diferencia estadística entre las fases a través de letras distintas (Fig. 21).

Tabla 4. Promedio \pm error estándar de las características físicas y químicas de las cuatro fases de la bebida en cada localidad. En T no se realiza el procedimiento de hervor de aguamiel, por lo tanto no hay valores en este rubro.

Fase/Sitio	°Brix		pH		Densidad		Ácido láctico (gr/ 100mL)		% Alcohol		Viscosidad (cP)	
	SU	T	SU	T	SU	T	SU	T	SU	T	SU	T
Aguamiel	9.63 ± 0.99	9.57 ± 0.76	6.23 ± 0.39	4.58 ± 0.13	1.01 ± 0.001	1.00 ± 0.003	0.23 ± 0.04	0.53 ± 0.06	0.00 ± 0	0.00 ± 0	1.22 ± 0.12	1.30 ± 0.09
Hervido	11.70 ± 0.3	/	7.32 ± 0.58	/	1.02 ± 0.006	/	0.07 ± 0.04	/	0.53 ± 0.15	/	1.14 ± 0.03	/
Pulque	8.22 ± 0.49	7.48 ± 0.4	4.15 ± 0.14	3.94 ± 0.08	0.99 ± 0.007	0.98 ± 0.001	0.82 ± 0.05	0.67 ± 0.06	3.88 ± 0.47	4.92 ± 0.29	1.59 ± 0.19	1.48 ± 0.13
Semilla	5.47 ± 0.4	5.42 ± 0.29	3.87 ± 0.13	3.69 ± 0.05	0.97 ± 0.002	0.97 ± 0.003	1.02 ± 0.03	0.77 ± 0.06	6.73 ± 0.75	6.03 ± 0.35	2.92 ± 0.16	2.48 ± 0.09

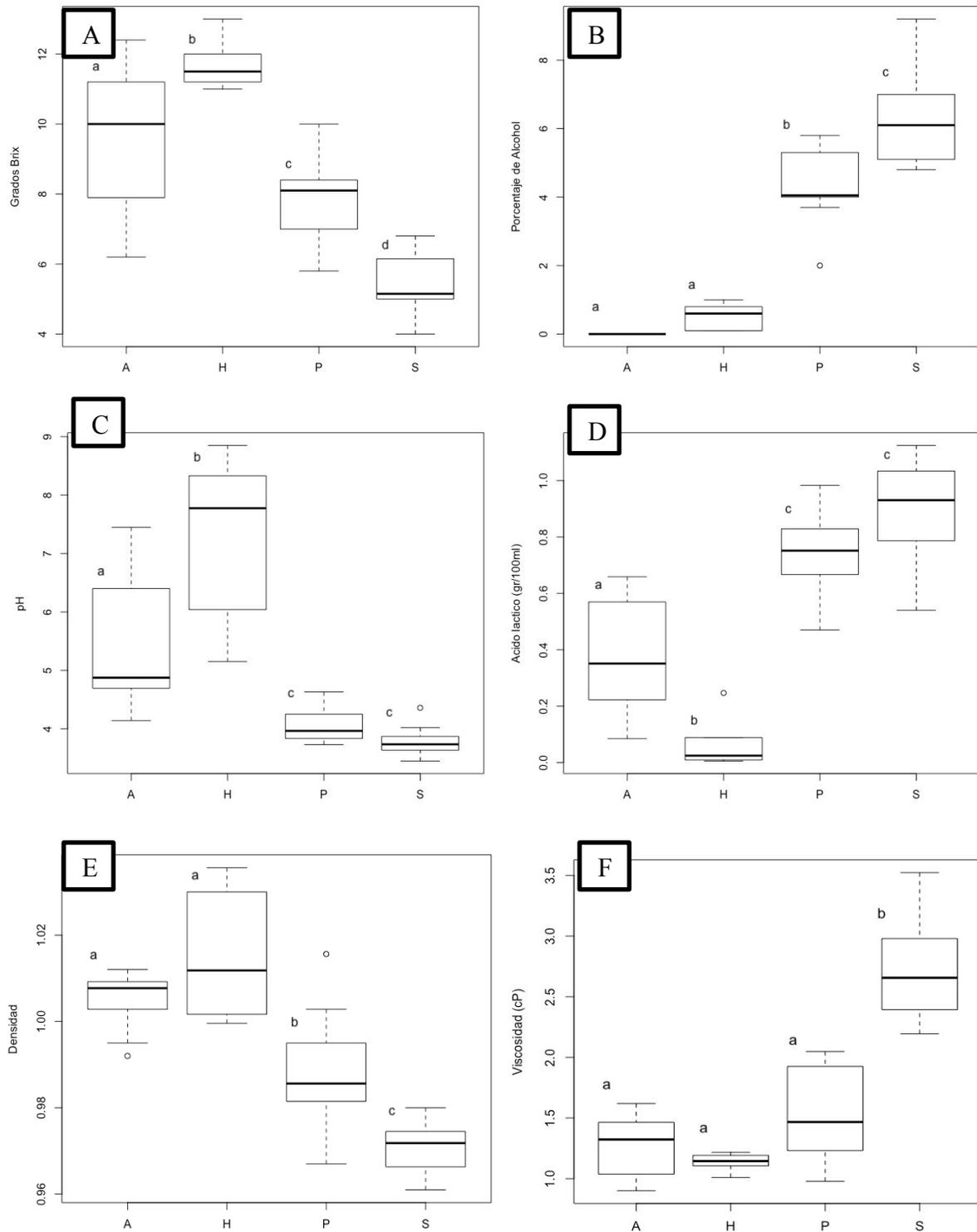


Figura 21. Gráficos de caja y bigotes de las características físicas y químicas medidas. La caja contiene el rango del 1er. al 3er. cuartil de los datos, representando a la mediana en línea negra, los bigotes muestran los datos mínimos y máximos, en círculos se muestran datos extremos. En el eje “x” se muestran las fases de la bebida: A= aguamiel, H= hervido, P= pulque, S= semilla, en el “y” la magnitud de la característica correspondiente, las letras minúsculas arriba de cada caja, muestran la diferencia entre fases. A) Grados Brix, $p= 8.2e-11$. B) Porcentaje de alcohol, $p= 2e-11$. C) pH, $p= 2.3e-10$. D) Ácido láctico, $p= 2.2 e-12$. E) Densidad, $p= 1.8e-11$. F) Viscosidad $p= 9.4e-14$.

Tabla 5. Promedio \pm error estándar de las características físicas y químicas de las cuatro fases de la bebida. Las letras entre paréntesis representan diferencias entre las fases.

Fase	°Brix	pH	Densidad	Ácido láctico (gr/100mL)	% Alcohol	Viscosidad (cP)
Aguamiel	9.60 \pm 0.6 (a)	5.41 \pm 0.32 (a)	1.01 \pm 0.002 (a)	0.38 \pm 0.06 (a)	0.00 \pm 0 (a)	1.26 \pm 0.07 (a)
Hervido	11.70 \pm 0.3 (b)	7.32 \pm 0.58 (b)	1.02 \pm 0.006 (a)	0.07 \pm 0.04 (b)	0.53 \pm 0.15 (a)	1.14 \pm 0.03 (a)
Pulque	7.85 \pm 0.32 (c)	4.05 \pm 0.08 (c)	0.99 \pm 0.004 (b)	0.75 \pm 0.04 (c)	4.40 \pm 0.31 (b)	1.53 \pm 0.11 (a)
Semilla	5.44 \pm 0.24 (d)	3.78 \pm 0.07 (c)	0.97 \pm 0.002 (c)	0.90 \pm 0.05 (c)	6.38 \pm 0.41 (c)	2.70 \pm 0.11 (b)

Los grados Brix (°Bx) representan un porcentaje de azúcares disueltos en el líquido, en las diferentes fases de la bebida se muestra una clara tendencia. En la fase A se registró un valor de 9.6 ± 0.6 (promedio \pm error estándar) (a)⁴, al pasar a P los °Bx se reducen a 7.85 ± 0.32 (c), y posteriormente en la fase S se reducen a 5.44 ± 0.24 (d). Esto se debe al consumo de los azúcares contenidos en la savia del agave por los microorganismos fermentadores que están asociados a la planta y por los que fueron incorporados en la inoculación (Fig. 21-A). La fase H rompe esta tendencia, pues registró un incremento en los °Bx, 11.7 ± 0.3 (b), este aguamiel hervido es obtenido a través del proceso previamente descrito y el incremento de los azúcares contenidos se puede deber tanto a la evaporación de agua y con ello concentración de azúcares o la hidrólisis de diferentes compuestos y con ello la liberación de azúcares, de esto se discutirá más adelante.

En el caso del pH y el contenido de ácido láctico, la tendencia conforme avanza el proceso de fermentación, es hacia una gradual acidificación. De un pH de 5.41 ± 0.32 registrado en la fase A (a), posteriormente, en la fase P se registró un valor promedio de 4.05 ± 0.08 (c), mientras que en la fase S el pH fue de 3.78 ± 0.07 (c) (Fig. 21-C). El ácido láctico (reportado en gramos de ácido láctico por 100 ml de muestra), tuvo un valor promedio de 0.38 ± 0.06 g/100 ml en A (a), durante la fermentación aumentó, en la fase P a 0.75 ± 0.04 g/100 ml (c) y en la fase S a 0.9 ± 0.05 g/100 ml (c) (Fig.21-D). Nuevamente la fase H no continuó la tendencia, pues se registró un pH de 7.32 ± 0.58 (b) y se reportaron los valores más reducidos de contenido de ácido láctico, 0.07 ± 0.04 g/100 ml (b).

⁴ La letra entre paréntesis (a) representa las diferencias estadísticas entre los tratamientos (fases de la bebida) derivadas de un ANOVA y la prueba de Tukey.

El porcentaje de alcohol en la fase de A (a) fue nulo, en la fase H comienza a estar presente un pequeño porcentaje de 0.53 ± 0.15 (a), incrementándose en la fase P en $4.4 \pm 0.31\%$ (b), en la fase S se registró $6.39 \pm 0.41\%$ (c) de alcohol (Fig. 21-B). Los cambios de los parámetros anteriores reflejan la actividad microbiana, pues una de las rutas metabólicas de los microorganismos fermentadores es transformar los azúcares en ácidos orgánicos, mientras que otra es producir alcohol.

La densidad muestra una ligera tendencia decreciente. Pasando de 1.01 ± 0.002 en la fase A (a) a 0.99 ± 0.004 en la fase P (b) y 0.97 ± 0.002 en la fase S (c). Para la fase H se reportó una densidad de 1.02 ± 0.006 (a), muy similar a la fase de aguamiel indicando que el hervor no afecta este parámetro tan drásticamente (Fig. 21-E).

Finalmente, la viscosidad permite apreciar los efectos del metabolismo de los microorganismos, pues éstos generan un conjunto de subproductos de la fermentación, tales como partículas que conforman en gran medida los sedimentos que se encuentran en la bebida, y determinan la consistencia que ésta adquiere. En la fase A la viscosidad es de 1.26 ± 0.07 cP (a), mientras que incrementa conforme avanza la fermentación, en la fase P pasa a 1.53 ± 0.11 cP (a) y en la fase S a 2.7 ± 0.11 cP (b). En la fase H la viscosidad es de 1.14 ± 0.03 cP (a), ligeramente menor que en el aguamiel (Fig. 21-F).

Como se puede apreciar, hay una clara tendencia en la modificación de las características físicas y químicas en la bebida que está determinada por las fases, es decir por el tiempo que transcurre la fermentación (Tab. 4 y 5). Teniendo al aguamiel como un “estado inicial”, pasando después gracias a la inoculación con la semilla a un pulque que es un “segundo estado”, donde la fermentación de la bebida cambia y finalmente en la semilla se acrecientan estas tendencias, pues la semilla representa a este pulque añejo más fermentado, siendo este un “tercer estado”. Sin embargo, esta es la tendencia general de “los pulques” y que aplica para el sitio T, pero en SU el hervor de la savia genera un “estado intermedio” entre A y P, el cual no obedece a la tendencia descrita arriba, pues genera un pico en la cinética de las diferentes características. Después, el aguamiel hervido se mezcla con la semilla, generando el pulque y regresando a la tendencia general de la bebida.

La Figura 22 muestra la cinética de la bebida en cada sitio, representando las fases en el eje “x” y la magnitud de las características físicas y químicas en “y”. En ella se aprecia la tendencia de transformación de la bebida, en la que los grados Brix disminuyen con el cambio de fase, el pH

tiende a una acidificación, la cantidad de ácido láctico incrementa, así como el contenido de alcohol en la bebida, además de la acumulación de sedimentos y compuestos que incrementan la viscosidad, esto para la localidad de T (derecha). Sin embargo en SU (izquierda) se observa que la fase de H rompe con las tendencias generando los picos mencionados, los cuales resultan más evidentes en los grados Brix y el pH, aunque después con la inoculación y conversión a pulque estos picos se anulan y se observan valores similares a los de T tanto para pulque como para semilla.

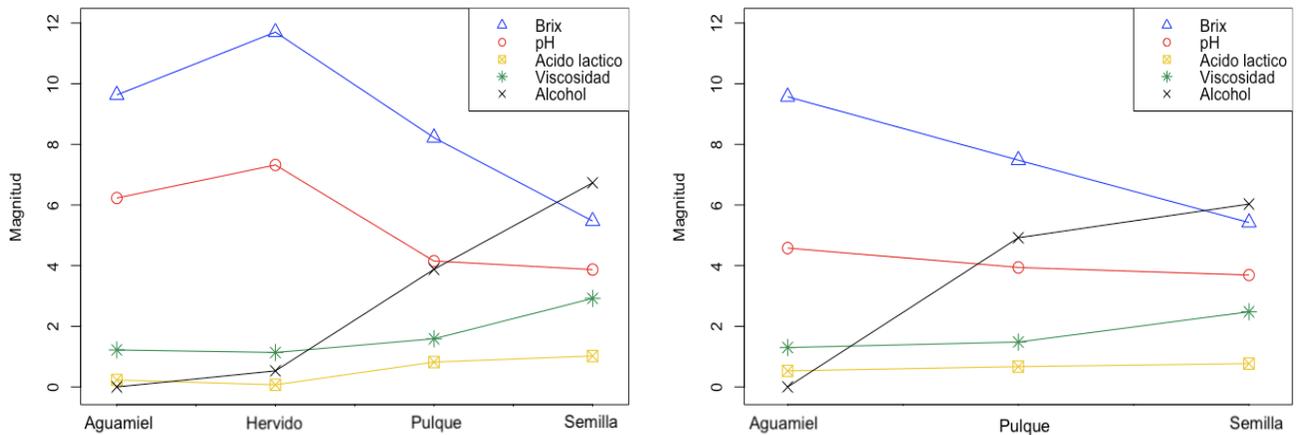


Figura 22. Cinética de la bebida, mostrando el cambio en los promedios de las características físicas y químicas conforme cambia de fase por sitio. A la izquierda SU, a la derecha T.

Con el conjunto de datos derivados de las mediciones físicas y químicas se realizó un ACP. Con el primer componente se explica el 78% de la variación, mientras que con el segundo se explica el 8%. En el primer componente las variables más relevantes en sentido positivo son densidad y °Brix, mientras que en el sentido negativo son ácido láctico y el % de alcohol contenidos. En el segundo componente la variable con mayor relevancia en el sentido negativo es el pH, seguido de la viscosidad, mientras que en dirección positiva es el ácido láctico (Fig. 23).

El ACP muestra en el extremo izquierdo del gráfico a las semillas agrupadas por el incremento en su contenido de ácido láctico, alcohol y viscosidad, así como un reducido contenido de azúcar, lo que constituye un indicador de un estado avanzado de una fermentación. Continuando el gradiente hacia la derecha, se encuentran los pulques que contienen cantidades menores de estos productos de la fermentación, pero que poco a poco tienden a incrementarlos, pues llegarán a la fase de semilla. En los cuadrantes de la derecha están los aguamieles, agrupados por mayores valores de grados Brix, una densidad mayor y un pH más neutro; por su parte, los hervidos se ubican en el grupo de los aguamieles y otros están un poco más alejados, debido a que poseen un

mayor contenido de azúcar, un bajo contenido de ácido láctico, y un pH menos ácido en comparación con los parámetros de las otras fases.

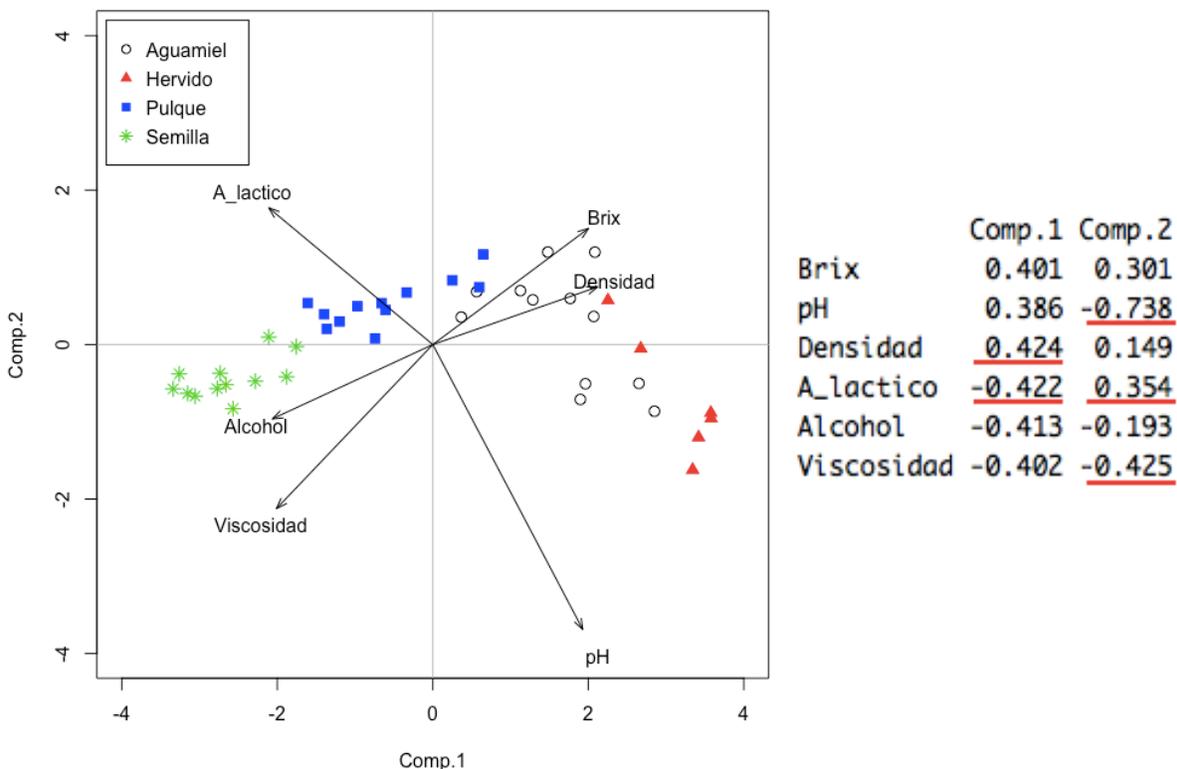


Figura 23. Análisis de componentes principales (ACP) de las características físicas y químicas. Se puede observar la tendencia de agrupamiento a partir de las fases de la bebida. Acompañan el gráfico el valor de los vectores (variables) del ACP.

8.3 Los microorganismos fermentadores

Para describir y analizar la comunidad de microorganismos presentes en la bebida, se utilizaron la abundancia de unidades formadoras de colonias (UFC), la riqueza y la diversidad de morfotipos, así como los perfiles de ácidos grasos.

Se registraron las abundancias de UFC por fase comparando entre sitios, pues el manejo es diferente entre éstos (Tabla 6). Para las bal en la fase aguamiel en SU se registraron $297.82e6 \pm 118.03$ (promedio \pm error estándar de UFC), mientras que en el aguamiel de T son $352.92e6 \pm 64.56$. En la fase de hervido, que solo está presente en SU, las colonias se reducen y pasan a ser $7.15e6 \pm 4.55$. Para la fase de pulque, en SU se registraron $315.87e6 \pm 168.44$ y $190.08e6 \pm 84.29$ en el pulque de T. Finalmente, la mayor abundancia se encontró en la fase de semilla con $490.81e6 \pm 143.58$ en la SU, por $379.53e6 \pm 92.37$ en T (Fig. 24A).

En cuanto a los cultivos de levaduras, las abundancias fueron $305.85e6 \pm 132.69$ en el aguamiel de SU, por $338.97e6 \pm 87.64$ en el aguamiel de T. En la fase de H, se presentó una notable disminución en las colonias de levaduras, pasando a las $8.72 e6$ UFC. En los pulques, se registraron $251.97e6 \pm 143.72$ para SU y $146.54e6 \pm 72.21$ para T. Para la fase de semilla, fueron $626.67e6 \pm 132.57$ colonias para SU y $432.17e6 \pm 82.87$ para T (Fig. 24B).

En el medio general se registraron las siguientes abundancias $524.44e6 \pm 117.32$ en el aguamiel de SU, por $849.33e6 \pm 228.46$ en el aguamiel de T. En la fase de H, se presentó nuevamente una disminución en las colonias, reportándose $16.56e6 \pm 10.04$ UFC. En los pulques, se registraron $896.78e6 \pm 478.52$ para SU y $520.69e6 \pm 151.29$ para T. Para la fase semilla, fueron $1633.67e6 \pm 611.11$ colonias para SU y $1716.69e6 \pm 392.38$ para T. Repitiéndose el patrón de abundancias encontrado en los medios específicos, aunque con abundancias mayores de UFC, pues es un medio que permite el crecimiento de un mayor espectro de microorganismos.

Los resultados del ANOVA muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos (fases A, P y S) ni entre sitios (SU y T), pero sí entre el resto de los tratamientos con la fase de hervor (H-SU), ya que el aumento en la temperatura elimina la presencia de microorganismos en la savia (Fig. 24). Además, se puede apreciar que la variación dentro de las fases es muy grande, lo cual no permite demostrar una diferencia en las abundancias de UFC ni entre sitios ni entre el resto de las fases, no obstante, no impide apreciar el patrón expuesto a continuación.

En A-SU, tanto las bal como las levaduras que están presentes en la savia del maguey al momento de su colecta son sometidos a un aumento de temperatura, en H-SU la savia al pasar por el proceso de hervido disminuye considerablemente la presencia de estos microorganismos. Después, esta savia hervida con pocos microorganismos es inoculada con la semilla (S-SU) la cual contiene una concentración mucho mayor de microorganismos. Esta inoculación da origen al pulque, en el cual las abundancias reportadas son originadas por un proceso de colonización de la alta concentración de UFC presentes en la semilla. Posteriormente, este pulque se fermentará durante el transcurso del día y originará a la semilla, la cual es la fase que contiene la mayor concentración de microorganismos (Fig. 24).

Para el caso de T, el aguamiel colectada es inoculada con la semilla, generando así el pulque. Se aprecia en el pulque una disminución de las UFC de ambos grupos, pero a diferencia de SU donde el hervor reduce la presencia de microorganismos drásticamente, en el aguamiel que

recibe la semilla en T sí hay una presencia alta de bal y levaduras. Por lo tanto, además del proceso de colonización de las colonias incorporadas de la semilla al aguamiel, también está presente un proceso de competencia entre las que ya estaban en el aguamiel con las incorporadas. Una vez fermentado el pulque, la tendencia se dirige a un incremento de UFC, generando así la nueva semilla que inoculará el aguamiel del día siguiente (Fig. 24).

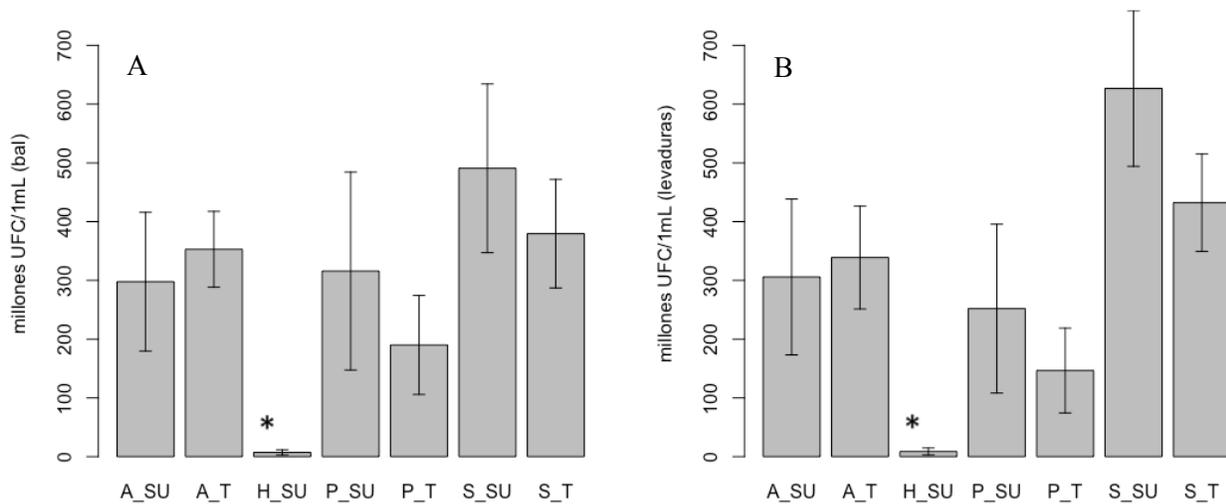


Figura 24. A) Gráfico barras de las abundancias (promedio \pm error estándar) de bacterias ácido lácticas en los distintos tratamientos. En * el único tratamiento (H-SU) que resultó distinto al resto, a través de un ANOVA ($p=5.69e-07$) y una prueba de Tukey ($p < 0.05$). B) Gráfico de barras de las abundancias (promedio \pm error estándar) de levaduras en los distintos tratamientos. En * el único tratamiento (H-SU) que resultó distinto al resto, a través de un ANOVA ($p=1.04e-06$) y una prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Aunque no se reportaron diferencias estadísticamente significativas entre las bebidas de los diferentes sitios, se puede apreciar que A-T tiene una abundancia ligeramente mayor de UFC que A-SU, sin embargo ya no es así en las siguientes fases, siendo mayor la abundancia de UFC, tanto en el pulque como en la semilla de SU (Fig. 24). Esta tendencia habría que explorarse a detalle ya que podría representar un efecto del manejo sobre los procesos de colonización y competencia en la comunidad de microorganismos, ya que mientras en SU los microorganismos de la semilla se incorporan en un medio sin competencia, estos quizá pueden desarrollarse más fácilmente en comparación con lo que sucede en T, donde los microorganismos que se incorporan de la semilla tienen que competir con los que están presentes en el aguamiel.

Tabla 6. Promedio \pm error estándar (ES) de colonias (UFC) registradas en los tres medios de cultivo para cada fase y sitio. SU= Santiago Undameo y T= Tarímbaro.

Fase - Sitio	Medio MRS (Bacterias ácido lácticas) Promedio UFC (millones/mL) \pm ES		Medio Sabouraud (Levaduras) Promedio UFC (millones/mL) \pm ES		Medio TSA (general) Promedio UFC (millones/mL) \pm ES	
	SU	T	SU	T	SU	T
Aguamiel	297.82 \pm 118.03	352.92 \pm 64.56	305.85 \pm 132.69	338.97 \pm 87.64	524.44 \pm 117.32	849.33 \pm 228.46
Hervido	7.15 \pm 4.55	/	8.72 \pm 6	/	16.56 \pm 10.04	/
Pulque	315.87 \pm 168.44	190.08 \pm 84.29	251.97 \pm 143.72	146.54 \pm 72.21	896.78 \pm 478.52	520.69 \pm 151.29
Semilla	490.81 \pm 143.58	379.53 \pm 92.37	626.67 \pm 132.57	432.17 \pm 82.87	1633.67 \pm 611.11	1716.69 \pm 392.38

Tabla 7. Promedio \pm error estándar (ES) de la riqueza de morfotipos e índice de Shannon registradas en dos medios de cultivo para cada fase y sitio. SU= Santiago Undameo y T= Tarímbaro.

Fase-Sitio	Medio MRS (Bacterias ácido lácticas) Promedio morfotipos \pm ES		Medio Sabouraud (Levaduras) Promedio morfotipos \pm ES		Índice Shannon Promedio \pm ES	
	SU	T	SU	T	SU	T
Aguamiel	4.3 \pm 0.71	4.3 \pm 0.76	4.5 \pm 0.56	4.5 \pm 0.62	1.22 \pm 0.11	1.17 \pm 0.12
Hervido	0.6 \pm 0.21	/	1.0 \pm 0.37	/	0.48 \pm 0.22	/
Pulque	3.0 \pm 0.52	4.2 \pm 0.95	1.8 \pm 0.31	3.0 \pm 0.63	0.98 \pm 0.11	1.33 \pm 0.06
Semilla	2.0 \pm 0.52	3.8 \pm 0.48	1.3 \pm 0.33	2.3 \pm 0.49	0.73 \pm 0.09	1.21 \pm 0.14

La riqueza de morfotipos de bal registrada para A-SU es de 4.3 ± 0.71 , por 4.3 ± 0.76 de A-T, en H-SU hay una notable reducción a 0.6 ± 0.21 morfotipos en las muestras de esta fase. Para P-SU se registraron 3.0 ± 0.52 , mientras que en P-T 4.2 ± 0.95 morfotipos, esta diferencia entre sitios se presenta nuevamente en la fase semilla ya que en S-SU se registran 2.0 ± 0.52 morfotipos y 3.8 ± 0.48 para S-T (Tab. 7 y Fig. 25A).

En cuanto a la riqueza de morfotipos de levaduras, fue para A-SU de 4.5 ± 0.56 , y para A-T de 4.5 ± 0.62 . Nuevamente en H-SU se presenta una disminución en la riqueza, 1.0 ± 0.37 . Para P-SU se registraron 1.8 ± 0.31 , mientras que en P-T 3 ± 0.63 morfotipos. Por último, en las semillas las riquezas fueron 1.3 ± 0.033 morfotipos en S-SU y 2.3 ± 0.49 en S-T (Tab. 7 y Fig. 25B).

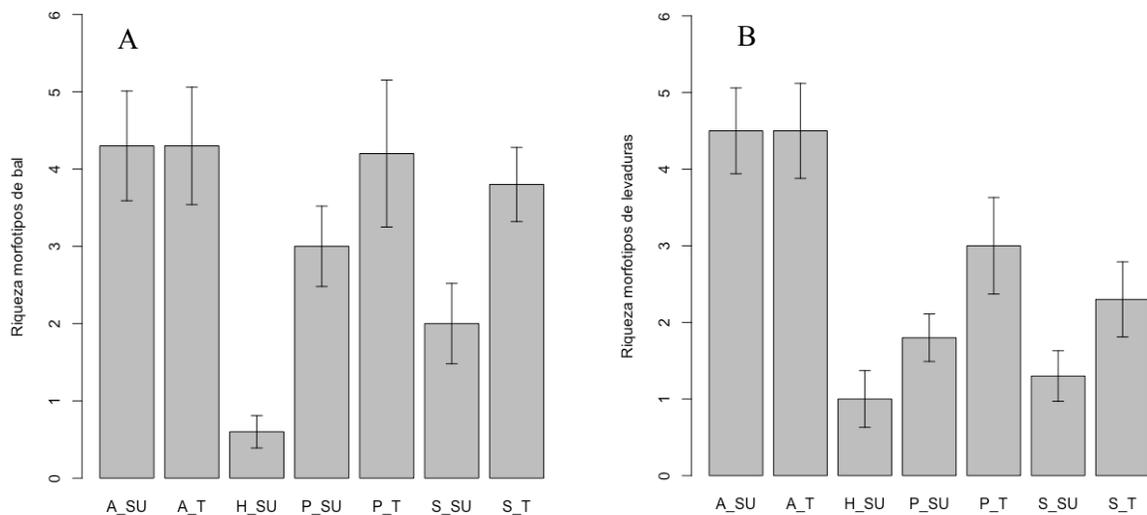


Figura 25. Riqueza de morfotipos de UFC (promedio \pm error estándar) de bal (A) y levaduras (B) en los diferentes tratamientos (fase-sitio, A= aguamiel, H= hervido, P= pulque, S= semilla, SU= Santiago Undameo, T= Tarímbaro).

Con base en el número de morfotipos y sus abundancias en cada una de las muestras se calculó el índice de diversidad de Shannon (Tabla 7 y Fig. 26). Se puede apreciar que, los valores del índice en ambos aguamieles es similar (A-SU= 1.22 ± 0.11 , A-T= 1.17 ± 0.12), después para el hervido la diversidad es menor (0.48 ± 0.22). Incrementa en los pulques, pero con una tendencia hacia mayor diversidad en P-T (1.33 ± 0.06) que en P-SU (0.98 ± 0.11) ya que existen más morfotipos en el pulque de Tarímbaro. Este patrón es similar en las semillas, en las que la diversidad es mayor en S-T (1.21 ± 0.14) que en S-SU (0.73 ± 0.09). Esto se debe al efecto del hervor, los pulques de SU no contienen los microorganismos que venían en el aguamiel, pues fueron eliminados con el hervor y solo se cuenta con los que lograron establecerse después de este

evento y los incorporados en la semilla. Por consiguiente, en los pulques de T, al no pasar por el hervor, existe una mayor diversidad de morfotipos, ya que se encuentran los que provienen del aguamiel más los incorporados en la semilla.

Los resultados del ANOVA ($p= 0.00025$) mostraron que la diferencia estadística se da principalmente con el tratamiento hervido. No se muestra diferencia estadística entre la fase de hervido con la semilla de SU (Fig. 26).

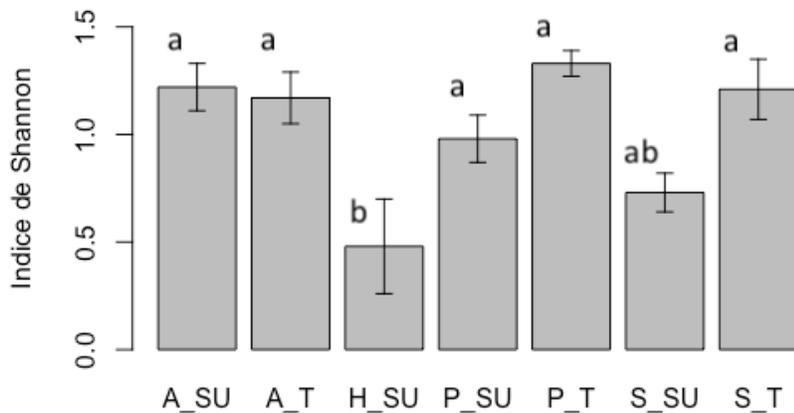


Figura 26. Gráfico de barras (promedio \pm error estándar) del índice de diversidad de Shannon para los distintos tratamientos (fase-sitio, A= aguamiel, H= hervido, P= pulque, S= semilla, SU= Santiago Undameo, T= Tarímbaro). Las letras muestran la diferencia entre tratamientos, a través de un ANOVA ($p= 0.000253$) y una prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Se registró un total de 30 morfotipos distintos de bal en el medio MRS y 31 morfotipos de levaduras en el medio Sabouraud. En la fase A se registraron 52 morfotipos distintos (24 de bal y 28 de levaduras), en H 10 morfotipos (5 de bal y 5 de levaduras), en P fueron 31 morfotipos distintos (16 de bal y 15 de levaduras) y en la fase semilla se registraron 23 morfotipos (12 de bal y 11 de levaduras). Cada morfotipo fue caracterizado y se le asignó una clave conformada por una letra, M si creció en medio MRS o S en Sabouraud, y un número.

Del total de morfotipos reportados, algunos aparecieron en frecuencias muy bajas, mientras que otros estuvieron presentes en la mayoría de las muestras y con frecuencias elevadas. Los gráficos de pastel que se muestran a continuación reflejan la proporción de los distintos morfotipos en cada uno de los tratamientos (Fig. 27).

En el pulque nuevamente M8 (27%) y S16 (21%) aparecen como los morfotipos más abundantes, seguidos de S10 (14%), M19 (10%) y M5(8%). En la fase de semilla los morfotipos dominantes se mantienen, pero los porcentajes cambian, S16 (29%), M5 (13%), M8(13%), M19 (13%) y S10 (12%) (Fig. 28 y 29).

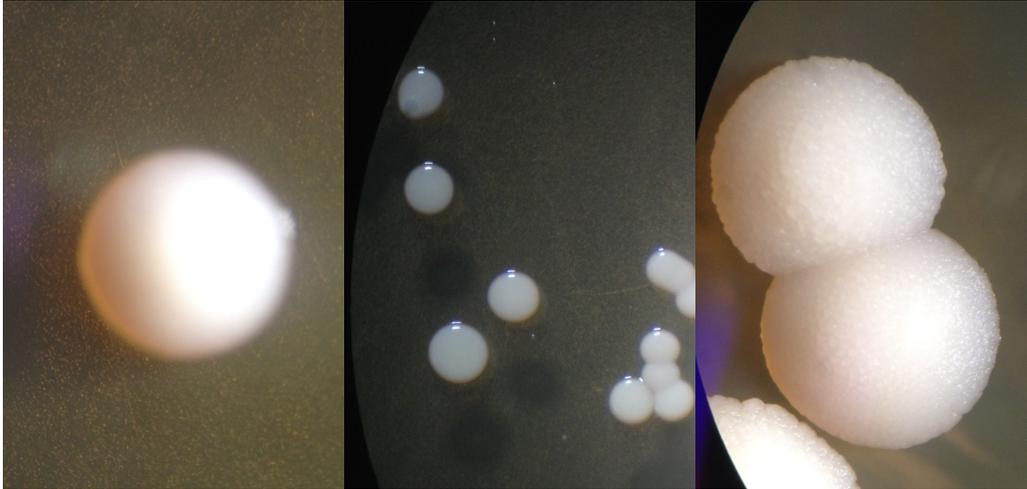


Figura 28. Fotos de M5, M8 y M19 al estereoscopio (de izquierda a derecha).

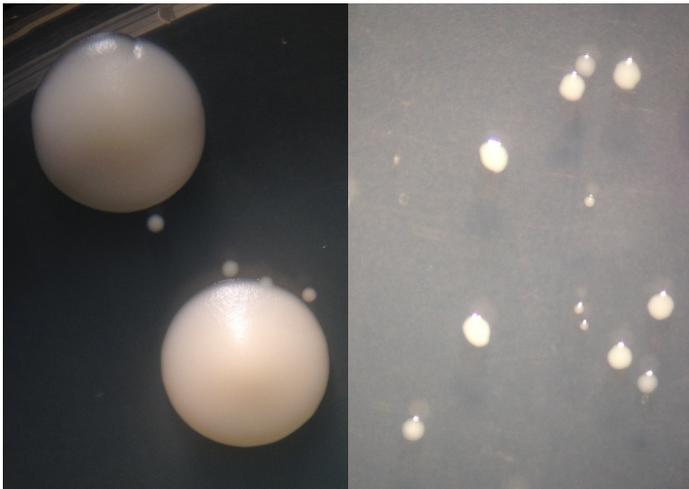


Figura 29. Fotos de S10 y S16 al estereoscopio (de izquierda a derecha).

Los perfiles de ácidos grasos están registrados en nanomol/mL de muestra y presentadas por año. Las muestras analizadas durante el año 2017 resultaron distintas por ordenes de magnitud a las reportadas en el año 2018, mientras en el año 2017 las muestras más enriquecidas llegaban a las 373 nanomol/mL para el año 2018 se reportaron muestras hasta con 5885 nanomol/mL, por ello se reportan los datos por tratamientos y por año (Ver Anexo 4, Tabla 11-12). La Tabla 12 contiene las abundancias de cada marcador de FA para los diferentes grupos funcionales identificados,

integrando los datos de ambos años como porcentajes de los diferentes grupos de microorganismos, ya que a pesar de las abruptas diferencias en las magnitudes entre años, las proporciones de los FA mantuvieron un mismo patrón entre años (Anexo 4-Tabla 13; Fig. 30 y 31).

La proporción entre grupos de microorganismos fue más equitativa en la fase aguamiel y esta condición se va perdiendo conforme avanza la fermentación (Fig. 30). En los aguamieles hay una proporción balanceada de los grupos microbianos, con poca abundancia de actinobacterias, y la composición es parecida en las dos localidades. El hervido del aguamiel en SU prácticamente no cambió la composición general o las abundancias de las comunidades microbianas. En los pulques y semillas se observó una disminución en el porcentaje de la mayoría de los grupos bacterianos y hongos, mientras que la proporción de levaduras aumentó en el pulque y predominó claramente en la semilla.

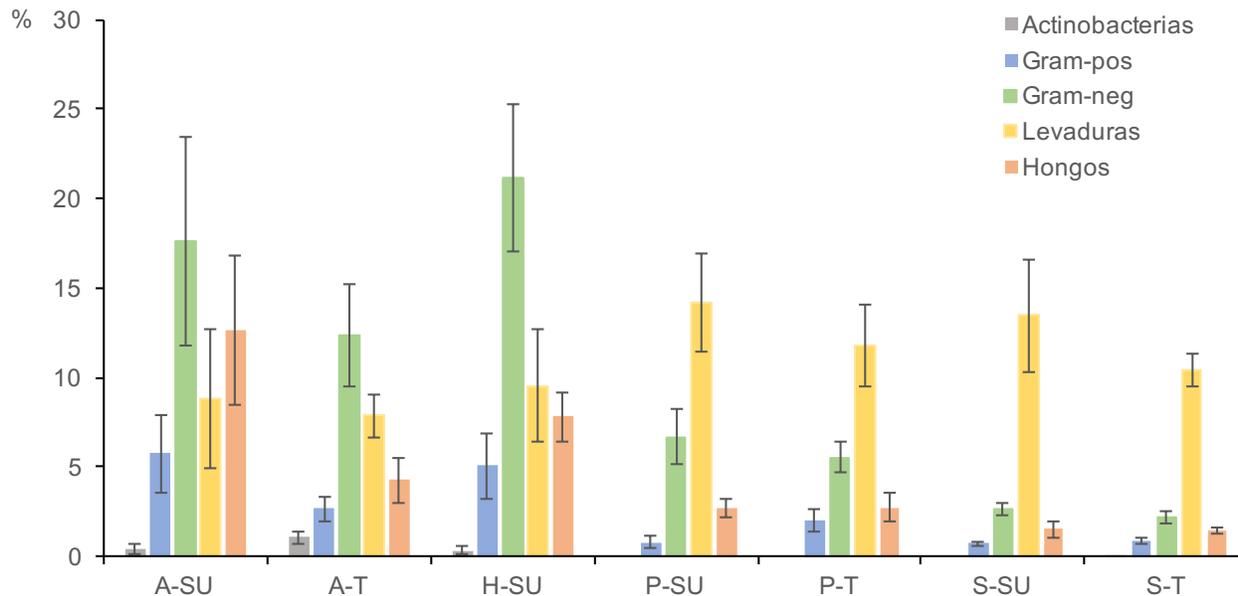


Figura 30. Porcentajes (promedio \pm ES) de los grupos de microorganismos en los tratamientos (fase-sitio, A= aguamiel, H= hervido, P= pulque, S= semilla, SU=Santiago Undameo, T= Tarímbaro).

Las levaduras (representadas por el marcador 18:1 w9c), fueron el grupo definido con mayor presencia en la comunidad de microorganismos en pulque y en semilla. La proporción de los hongos saprótrofos (18:2 w6,9c, 18:3 w6c 6,9,12) disminuyó considerablemente conforme avanza la fermentación, lo mismo sucede con los marcadores que se asociaron a Gram-positivas (12:0 iso, 17:1 iso i, 17:0 iso 3OH, 17:1 iso w5c) y Gram-negativas (17:0 cyclo, 19:0 cyclo w8c, 16:1 w5c) (Fig. 30, Tab. 13).

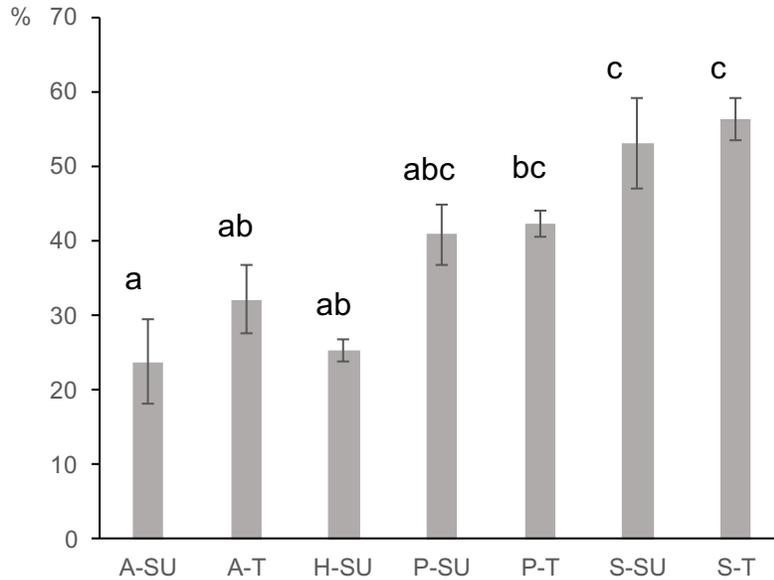


Figura 31. Porcentajes (promedio \pm ES) de la condición de estrés en los tratamientos (fase-sitio, A= aguamiel, H= hervido, P= pulque, S= semilla, SU=Santiago Undameo, T= Tarímbaro). Las letras muestran la diferencia entre tratamientos, a través de un ANOVA ($p= 3.03e-06$) y una prueba de Tukey ($p < 0.05$).

No obstante, aunque los marcadores que se asociaron a Gram-positivas (12:0 iso, 17:1 iso i, 17:0 iso 3OH, 17:1 iso w5c) y Gram-negativas (17:0 cyclo, 19:0 cyclo w8c, 16:1 w5c) disminuyeron en abundancia y en proporción (Fig. 30, Tab. 13), los marcadores 16:1w7c y el 18:1w7c (de origen bacteriano) no disminuyeron, por el contrario incrementaron de manera abrupta. Pasaron a representar juntos en el aguamiel el 23.8% (SU) y el 32.1% (T), en el pulque el 40.8% (SU) y 42.3% (T) y en semillas el 53.1% (SU) y 56.2% (T), con diferencias estadísticas entre las fases aguamiel con pulque y semilla (Fig. 31, Tab. 13). Estos marcadores, como ya se expuso, son de origen bacteriano; por lo tanto, la abundancia general de bacterias no disminuyó, sino que se incrementó en la representación de este par de FA. Estos marcadores no arrojan información sobre el grupo bacteriano específico, pero se ha documentado que están asociados a Gram-negativas principalmente y algunas Gram-positivas.

Es importante resaltar la tendencia de incremento de este par de marcadores, los cuales se utilizaron para determinar la condición de estrés en los microorganismos. Es claro el aumento en su porcentaje conforme avanza la fermentación. Esto puede indicar que las condiciones de estrés en el medio son cada vez más mayores, pues de un medio rico en nutrientes (aguamiel), se pasa a un medio acidificado, con mucha competencia y con cada vez menos recursos (semilla), lo que hace que el marcador 18:1 w7c y en mayor medida el 16:1w7c aumenten su abundancia y su

proporción en las muestras, pues las bacterias comienzan a producir este ácido graso para afrontar la escasez de nutrientes y los cambios de pH en el medio.

En el ACP del año 2017, el primer componente explica el 34% de la variación, mientras que el segundo el 30% (Fig. 32). En el primer componente las variables más relevantes en el sentido positivo son 18:1 w9c y 17:1 iso I, mientras que en sentido negativo es 17:1 iso w5c. En el segundo componente, las variables 17:0 cyclo, 18:1 w7c 11-methyl y 19:0 cyclo w8c marcando la tendencia de ordenación en sentido negativo y en el positivo 16:1 w7c.

En el ACP del 2018, el primer componente explica el 56% de la variación, mientras que el segundo el 14% de la variación (Fig. 33). En el primer componente las variables más relevantes resultan 17:0 anteiso en el sentido negativo y en el positivo el 18:1 w9c y el 16:1 w7c. Mientras que, en el segundo componente, las variables más relevantes para el ordenamiento son 18:1 w7c 11-methyl y 19:0 cyclo w8c en sentido negativo, y el 17:0 anteiso en el positivo.

El ACP muestra que en ambos años hay una gran variación en las aguamieles tanto de SU como de T, mientras que conforme avanza la fermentación ésta variabilidad se reduce, lo cual es visible en las muestras de pulque y, sobretodo, de semilla (Fig. 32 y 31). Por su parte en las semillas la cohesión es mayor, determinada por las variables 18:1 w9c y 16:1 w7c, que son las que están en mayor presencia en las muestras de semilla por su fermentación avanzada (Fig. 32).

Con lo anterior se puede apreciar que claramente hay una diferenciación entre la fase aguamiel y semilla (ubicándose en los cuadrantes opuestos en ambos ACP), como extremos de los procesos, mientras que la categoría de hervido y pulque representan la transición entre una fase y otra. Además, se puede apreciar que tanto los pulques, como las semillas de SU están ligeramente más agrupadas dentro de su respectivo grupo, que los pulques y semillas de T. Esto podría deberse al efecto del hervor que reduciría la presencia y competencia de microorganismos al momento de la reinoculación, como se ha expuesto en la sección de UFC.

Por su parte los resultados de FA de aguamiel hervido no mostraron una diferencia respecto a los aguamieles sin hervor, o algún patrón que permita dilucidar los efectos de esta práctica sobre las comunidades de microorganismos.

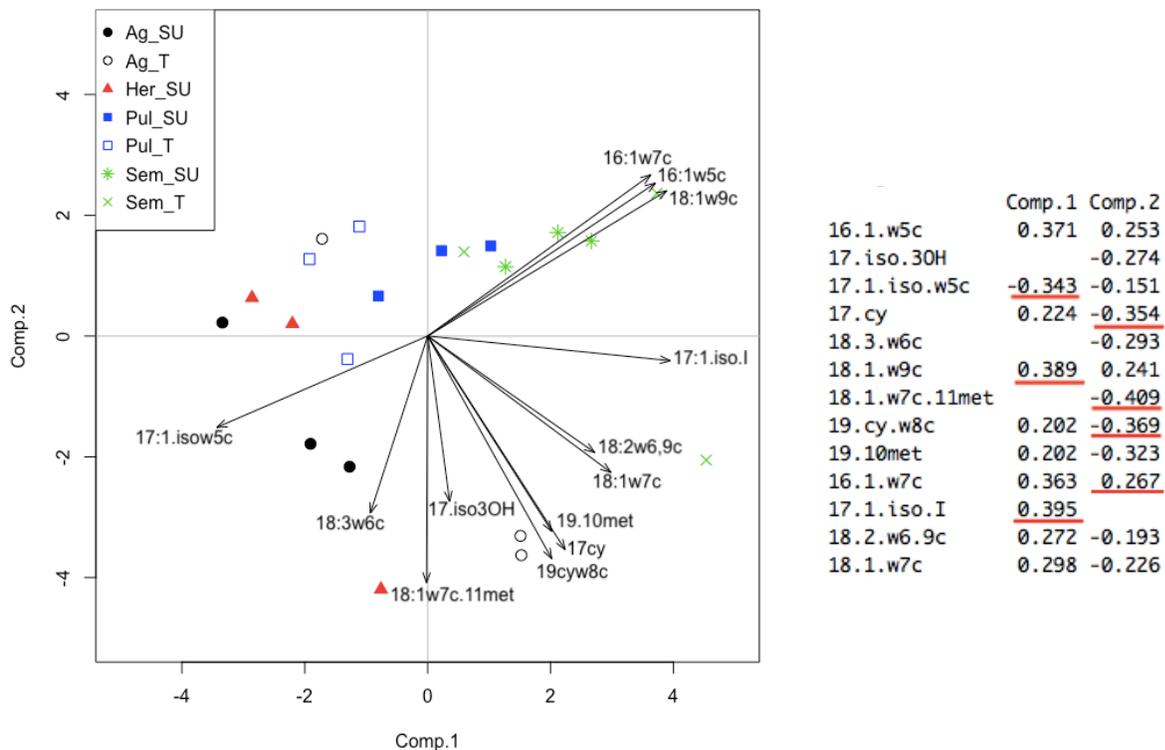


Figura 32. Análisis de componentes principales (ACP) de los ácidos grasos presentes en la bebida (2017). Acompañan al gráfico el valor de los vectores (variables) del ACP. Las etiquetas corresponden a la fase-sitio, Ag= aguamiel, Her= hervido, Pul= pulque, Sem= semilla, SU= Santiago Undameo, T= Tarímbaro.

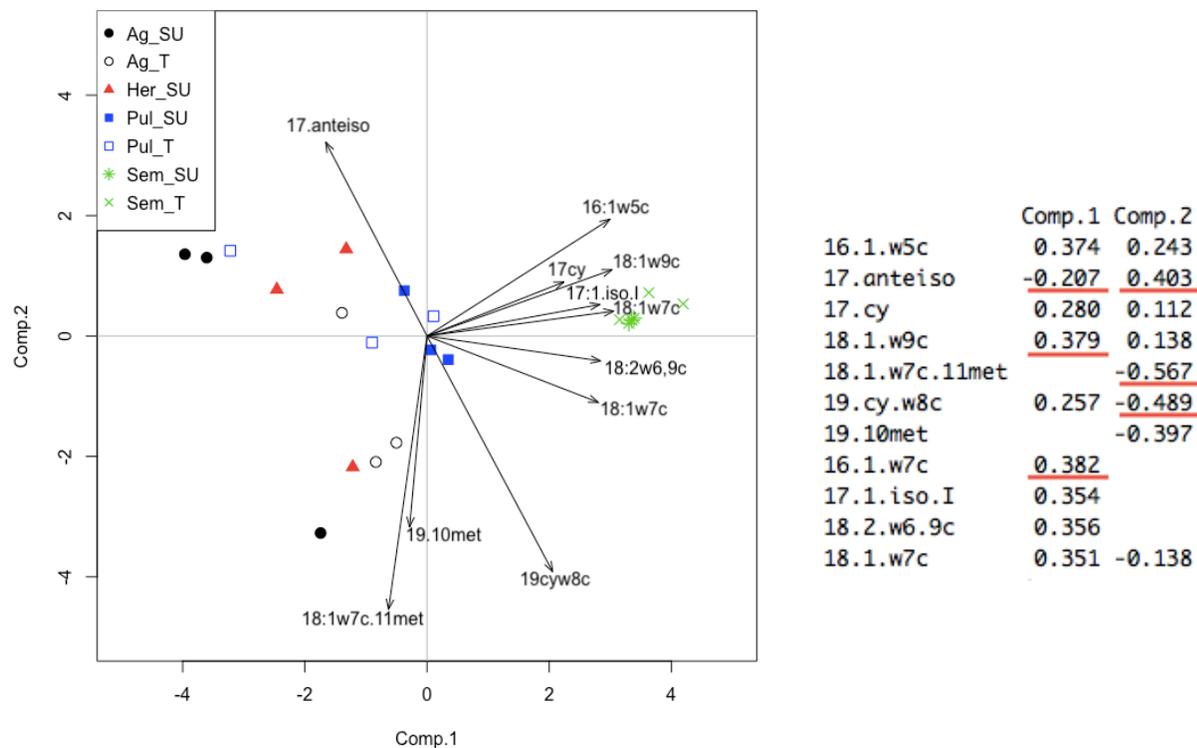


Figura 33. Análisis de componentes principales (ACP) de los ácidos grasos presentes en la bebida (2018). Acompañan al gráfico el valor de los vectores (variables) del ACP. Las etiquetas corresponden a la fase-sitio, Ag= aguamiel, Her= hervido, Pul= pulque, Sem= semilla, SU= Santiago Undameo, T= Tarímbaro.

IX. DISCUSIÓN

El presente trabajo intentó analizar los sistemas de producción de pulque en Michoacán bajo una óptica integral del manejo de los recursos maguey-savia. Un análisis que resulta relevante ante la falta de estudios que aborden a este nivel los sistemas, sus particularidades e implicaciones, y que permitan visibilizar sistemas de producción de pulque fuera del área central de México.

Si bien en la actualidad los estados de Hidalgo y Tlaxcala tienen la mayor producción de maguey y pulque, es necesario prestar atención a los sistemas que se encuentran en otras entidades, en especial las especies y variedades utilizadas, el compendio de prácticas y saberes, así como el contexto sociocultural que las envuelve. Ello no solo contribuye a documentar el panorama del manejo y aprovechamiento del maguey pulquero en México, tanto en su diversidad biológica como cultural, sino que el análisis de los diferentes sistemas puede proveer estrategias y alternativas ante las problemáticas que enfrenta el gremio magueyero-pulquero.

9.1 Los agaves pulqueros en los sistemas agrícolas

En los sistemas estudiados, el maguey para elaboración de pulque tiene una lógica multipropósito. En estos sistemas milpa-agave los manejadores tienen un cultivo principal (generalmente maíz) el cual es delimitado por los agaves, estas plantas tienen el uso de barrera viva para la protección del terreno y la retención de humedad en el suelo. El uso alimenticio que le dan a la savia (fresca y fermentada) es el más importante ya que se consume entre los integrantes de la familia y que además representa un beneficio económico al venderlo.

En los sitios de estudio se registraron 7 variedades campesinas, asociadas a tres especies: *A. americana*, *A. mapisaga* y *A. salmiana*. Siendo relevante que, aunque no todas las variedades son utilizadas con la misma intensidad, sí son mantenidas pues poseen características distintas que cumplen con necesidades diferentes. La clasificación campesina de las variedades de maguey está en función de los rasgos más notorios de cada variedad, como su color (Blanco, Cenizo, Verde o Negro) o por su forma (Listoncillo) o por la textura de la planta (Carrizaleño). Esta lógica aplica con las clasificaciones de agaves en otras regiones del país, por ejemplo el “Agave azul” de Jalisco (*A. tequilana*), el “Púa larga” de Tlaxcala (*A. salmiana*) o el “Maguey manso” de Michoacán (*A. hookeri*); y con la mayoría de variedades campesinas de cultivos (maíces, chiles, papas, guayabas, etc.), puesto que el atributo más notorio otorga la identidad a la variedad y es este atributo generalmente hacia donde está dirigido el foco de la selección, pues es la característica distintiva la que se desea mantener o exacerbar.

Otros sistemas de aprovechamiento de maguey pulquero son los metepantles, las magueyeras extensivas y la recolección de savia de magueyes silvestres. Los metepantles⁵ son sistemas de terrazas construidos en laderas y barrancas, mediante bordos que se estabilizan con agaves, logrando reducir la erosión del suelo, manteniendo su fertilidad y humedad (Moreno-Calles *et al.*, 2013; González-Jácome, 2016). Además, estos sistemas permiten generar espacios productivos y mantener la biodiversidad en diferente estratos, combinando especies con diferentes usos: los agaves para la obtención de aguamiel y pulque, cultivos anuales como maíz (*Zea mays*), haba (*Vicia faba*) y calabaza (*Cucurbita* spp.), frutales, como el tejocote (*Crataegus mexicana*) y capulín (*Prunus capulí*), especies de uso ritual como el sabino (*Juniperus deppeana*) y maderables como pinos (*Pinus* spp.) y encinos (*Quercus* spp.) (Moreno-Calles *et al.*, 2013; Pérez-Sánchez, 2016). Un ejemplo de ello son los metepantles en las barrancas de Metztlán, Hgo., allí los metepantles resultan fundamentales por la alta erosión eólica que se presenta en estos terrenos; además, el maguey pulquero representa el único recurso constante en la región, ya que la precipitación es muy baja y los cultivos anuales enfrentan una gran incertidumbre (Álvarez-Palma *et al.*, 1998). La producción de aguamiel en dicha región se genera principalmente con “maguey corriente” (*A. salmiana* ssp. *crassispina*) y “maguey de Zoqui” (*A. salmiana* var. *salmiana*), produciendo un aproximado entre los 80 y los 120 L al día (Juan Olmedo, com. pers., 2018).

En las magueyeras extensivas de Nanacamilpa, Tlaxcala, que pueden llegar a tener una extensión de hasta 50 ha repletas de maguey pulquero y producir hasta 8,000 L de aguamiel al día (Álvarez, 2015). Estos sistemas tienen un manejo intensificado y dependen del trabajo de decenas de trabajadores que propagan, abonan y cortan magueyes, colectan la savia y elaboran con ella el pulque (Álvarez-Duarte, 2018). Estos sistemas abastecen principalmente a la ciudad de Tlaxcala y a la ciudad de México. Además, estas magueyeras aunque son intensamente manejadas conservan un repertorio importante de variedades de agaves pulqueros. En estas plantaciones Álvarez (2015) reportó 4 variedades de maguey pulquero con diferencias morfológicas identificables por los productores, aunque todas pertenecen a la especie *Agave salmiana* var. *salmiana*.

En los sitios de estudio se registró una considerable diversidad de especies y variedades de agaves para el aprovechamiento pulquero en comparación con otras zonas productoras como las expuestas. Aunque este trabajo no indagó sobre las diferencias de la savia de cada una de estas

⁵ “Metepantle” del náhuatl *metl*: maguey y *pantli*: espacio entre o filas de; son sistemas agrícolas presentes en varias regiones del país, sobresaliendo Tlaxcala, Hidalgo y Estado de México (Montemayor *et al.*, 2008).

variedades, sí se identificó que las variedades correspondientes a *A. salmiana* son las más apreciadas por el volumen y calidad de la savia y de ahí que sean las variedades más frecuentes en las parcelas de los productores. Se considera necesario realizar a futuro una caracterización de los volúmenes y características de la savia de las diferentes variedades locales de maguey pulquero, para corroborar el efecto de la selección artificial de variedades específicas sobre características puntuales de la savia.

Esta selección que realizan los manejadores ha generado una diversidad de variedades campesinas de agave muy amplia, por ejemplo, Mora-López *et al.* (2011) reportaron en la región del centro-norte de México 31 variedades de magueyes pulqueros de *Agave salmiana* var. *salmiana* y 13 de variedades de *A. mapisaga*.

La especie *A. salmiana* es la más utilizada en México (así como en el sitio de este estudio) en la elaboración de pulque, esto debido al mayor tamaño de la planta, al volumen de savia producida, por la calidad de la savia (más dulce a la percepción de los manejadores), así como una disposición de dientes laterales y la espina terminal menos agreste. Por su parte, las variedades menos utilizadas son las que presentan menor tamaño, un menor volumen de savia y una mayor dificultad en su manipulación por la disposición de las espinas laterales y la espina terminal, como hemos visto ejemplificado en este sistema.

Sin embargo, no en todos los contextos las variedades más grandes son las preferidas, tal es el caso de sistemas donde magueyes silvestres son preferidos sobre magueyes cultivados. En la comunidad de San Juan Raya, Puebla, por ejemplo, la savia del maguey silvestre “pichometl” (*A. marmorata*) es más valorada y preferida que la del maguey “verde” (*A. salmiana*). Tal preferencia se debe a que los manejadores aseguran que la savia es más dulce, además se les adjudican propiedades medicinales (cura dolores internos de pulmón y riñón), las cuales están ausentes en la savia de *A. salmiana* (Don Nato, com. pers., 2018). Sin embargo, acceder a la savia del maguey “pichometl” resulta más complicado, 1) hay una menor disponibilidad de la planta, pues este agave crece en condiciones silvestres dentro de los bosques de cactáceas columnares de la región Valle de Tehuacán-Cuicatlán, 2) es un agave difícil de manejar, pues posee espinas pronunciadas y la cutícula de la planta tiene una superficie áspera que dificulta su manejo en comparación con la cutícula lisa del maguey “verde”, 3) los individuos de *A. marmorata* producen menos aguamiel (2 L al día) que los de *A. salmiana* (3.5 L al día). A pesar de estas condiciones, en San Juan Raya se aprecia más a la especie silvestre *A. marmorata*, mediando su alta demanda y menor disponibilidad

solo consumiendo su savia en ocasiones especiales como festividades o cuando se requiere tratar alguna enfermedad (Jiménez-Valdés *et al.*, 2010).

9.2 Importancia de los microorganismos fermentadores

Las comunidades de microorganismos fermentadores presentes en la bebida resultan fundamentales para entender las características de la bebida, los compuestos que aportan, así como la respuesta de las bacterias y levaduras a las prácticas de extracción de la savia y elaboración del pulque.

Escalante *et al.* (2008) reportaron en el aguamiel de Huitzilac, Mor. 3.2×10^8 UFC de bal en aguamiel y 1.5×10^8 UFC en el pulque. Por su parte Valadez-Blanco *et al.* (2012) reportan para tres comunidades de la mixteca alta en el estado de Oaxaca abundancias de bal en aguamieles y pulques (Tabla 8). Desafortunadamente, en estos trabajos no se reporta información sobre la especie o variedad de agave de la cual se obtuvieron las muestras, ni de las condiciones de elaboración del pulque, salvo que la bebida tenía 3 horas de fermentación.

Tabla 8. Abundancias de bacterias ácido lácticas (UFC/mL) en muestras de aguamiel y pulque.

	San Jerónimo, Oax.	Los Arcos, Oax.	La Plazuela, Oax.	Huitzilac, Mor.	Santiago Undameo, Mich.	Tarímbaro, Mich.
Aguamiel	6.2×10^7	3.7×10^9	4.5×10^8	3.2×10^8	2.9×10^8	3.5×10^8
Pulque	7.1×10^7	8.3×10^7	2.7×10^{11}	1.5×10^8	3.1×10^8	1.9×10^8

Podemos apreciar que al pasar de aguamiel a pulque las abundancias de bal se mantuvieron en la comunidad de San Jerónimo y en Santiago Undameo, disminuyeron en la de Los Arcos y muy ligeramente en en Huitzilac y Tarímbaro. Por su parte se incrementaron en La Plazuela.

Para el caso de nuestro sistema de estudio, el aumento de bal en SU y la disminución de bal en T se podría asociar al efecto del hervor de la savia. Por su parte los patrones presentes en las otras comunidades productoras varía ya que en unas aumenta, en otras disminuye y en otras se mantiene. De ahí nuestra propuesta de considerar al manejo fundamental para entender los patrones de las comunidades de microorganismos, pues las acciones de los manejadores tienen efectos sobre las poblaciones, si bien notorias sobre poblaciones de plantas y animales, también estas prácticas generan cambios en los patrones y en las estructuras poblacionales de los microorganismos.

Para el caso de las levaduras, los valores de Escalante *et al.* (2008) difieren a los aquí reportados, pues reporta en el aguamiel 3.1×10^4 UFC/mL, las cuales después aumentaron a 1.4×10^7 en el pulque con 3 horas de fermentación. Mientras que en SU hay una disminución al pasar de 3×10^8

de UFC en el aguamiel a 2.5×10^8 en el pulque y también una disminución de 3.4×10^8 en aguamiel a 1.5×10^8 en el pulque de T.

La presencia de estos microorganismos resulta importante, ya que además de ser los responsables de la fermentación, pueden ofrecer beneficios a la salud. Los *LAB* son microorganismos considerados alimentos probióticos, los cuales generan compuestos nutricionales, ayudan a la asimilación de otros, mejoran las condiciones gastrointestinales, por ejemplo algunos tienen efectos antiinflamatorios. Además funcionan como una protección frente a patógenos, pues generan una serie de compuestos, como las bacteriocinas, que inhiben el establecimiento de otros microbios (González-Vásquez *et al.*, 2015; Escalante *et al.*, 2016; Giles-Gómez *et al.*, 2016; Torres-Maravilla *et al.*, 2016).

Aunque en el presente trabajo no se caracterizaron los microorganismos a nivel de especie, se considera importante continuar por esta vía y en futuras investigaciones aislar los morfotipos más abundantes en las diferentes fases de la bebida para lograr identificarlos.

En cuanto a la diferenciación por manejo, la información generada mediante el cultivo de UFC mostró una reducción significativa en el número de colonias, entre las aguamieles hervidas y aquellas sin hervir, incluso siendo las abundancias de las aguamieles hervidas también más bajas si las comparamos con aguamieles de otras regiones (Tabla 8). Por lo que la práctica del hervor sí podría reducir los microorganismos en primera instancia y en un tiempo corto. Además, este hervor puede generar una selección artificial sobre las bacterias y levaduras, pues en los pulques de SU se reportó una menor riqueza y diversidad de morfotipos que en T.

Sin embargo, los resultados derivados de los perfiles de FA no muestran una reducción en la cantidad de microorganismos presentes en la fase de H, ni en el año 2017 ni el 2018, por el contrario aumentan. Esta aparente discrepancia podría explicarse por las diferencias que subyacen a ambos métodos, se estima que los medios de cultivo recuperan alrededor del 1% de los microorganismos que se encuentran en una muestra, mientras que los ácidos grasos recuperan todas las células vivas. Suponiendo que las colonias de microorganismos cultivables representan adecuadamente la diversidad que en realidad existe, el resultado indica que hervir el aguamiel eliminó algunos microorganismos pero favoreció a otros de modo que la riqueza de morfotipos disminuyó pero las abundancias de los grupos se mantuvieron. Los ácidos grasos resuelven las abundancias microbianas con excelente resolución a nivel de grupos funcionales y abundancias totales, por lo que el resultado que indica que no cambian las abundancias puede llegar a ser muy

confiable (Willers *et al.*, 2015). Sin embargo, el efecto del hervido en la diversidad microbiana a niveles taxonómicos más específicos solo podría resolverse confiablemente con un análisis de comunidades con métodos moleculares.

Es notorio en los datos que la cantidad de microorganismos aumentan conforme avanza la fermentación. En el caso de las levaduras es claro, que tanto su abundancias como su proporción dentro de las muestras aumenta conforme avanza la fermentación. No obstante, hay grupos que no reflejan este aumento de manera tan clara, por ejemplo las Gram-positivas. Esto puede deberse a que el FA 16:1 w7c, al englobar a varios grupos bacterianos, muestra un aumento general de bacterias pero no sin precisar de qué grupo fue (Gram-negativas o Gram-positivas). Recordando que el 16:1 w7c en muestras de pulque ya representaba el 40% del total de ácidos grasos y más de 50% en las semillas, es plausible que la presencia de las bal estén incluidas en la magnitud de este marcador.

Los FA 16:1 w7c y 18:1 w7c fueron utilizados como un indicador indirecto del estrés en el cual encuentra la comunidad de microorganismos, ya que si bien son marcadores reportados en bacterias Gram-negativas y positivas. Los resultados muestran una clara disminución de otros marcadores asociados a estos grupos, mientras que el 16:1 w7c y 18:1 w7c aumentaron considerablemente, tanto de la fase aguamiel a pulque y aun más a semilla. Considerando que la cinética de la bebida, también evaluada, muestra una clara tendencia a la acidificación y a la reducción de los azúcares, cuya utilización permite que rápidamente incremente la comunidad de microorganismos, pero generando en el medio una condición cada vez más limitante conforme avanza la fermentación. Es además importante mencionar que el tiempo transcurrido entre una fase y otra es de tres horas de la fase aguamiel a pulque y de 24 horas de pulque a semilla, lo cual acentúa la condición homogénea de la semilla y su aumento en la abundancia de microorganismos.

Existen otros indicadores para determinar la condición de estrés en las comunidades, como el incremento de FA ciclopropílicos (cy17:0 o cy19:0) o el cociente entre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Kaur *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2012). Si bien estos cocientes no se determinaron, se puede observar que en todas las fases de la bebida las bacterias Gram-negativas estuvieron representadas en mayor proporción que las Gram-positivas y si a esto agregamos el marcador 16:1 w7c, generalmente asociado a Gram-negativas, el cociente se vuelva aun mayor. Lo anterior no se decidió porque se ha reportado a 16:1 w7c y 18:1 w7c en Gram-positivas y porque los cultivos de UFC arrojaron abundancias considerables de bal (Gram-positivas) en todas las fases.

Con lo anterior, lo que sí podemos asegurar es que la cantidad de bacterias aumenta de manera significativa conforme avanza la fermentación y el grupo de las Gram-negativas, y en especial el marcador de las levaduras (18:1 w7c) son las que fueron asociadas con mayor claridad a través de los perfiles de FA.

Haciendo una reflexión metodológica en torno a la caracterización de las comunidades de microorganismos habría que considerar varios puntos para futuros trabajos:

1) La forma y el tiempo de almacenamiento de las muestras. Las muestras sometidas a los perfiles FA estuvieron almacenadas (-25°C) durante un par de semanas, durante el tiempo que se requirió para preparar el equipo y materiales del laboratorio y para colectar la totalidad de las muestras. Por su parte, los cultivos de colonias se realizaron al momento mismo del muestreo. Esto pudo originar que en las muestras utilizadas para los perfiles de FA se presentara una recuperación de los microorganismos presentes en la aguamiel antes del hervido, ya que algunos microorganismos, como las bacterias, tienen la capacidad de generar endoesporas ante los aumentos de temperatura, y una vez que las condiciones se vuelven óptimas éstas logran restablecerse. Es por eso que quizá el hervido muestra un contenido de microorganismos similar en los perfiles de FA al de las muestras de aguamiel sin hervir. Lo que sugiere que lo ideal es realizar la cuantificación de FA al momento de colectar.

2) Otra de las consideraciones necesarias es la gran heterogeneidad ambiental que pueden estar afectando la comunidad de microorganismos en la bebida, ya que aunque el diseño corresponde a fases y tipos de manejo, es cierto que las ligeras variaciones en las condiciones de elaboración entre años pueden generar las diferencias tan abismales reportadas en los datos de FA. Cambios en la temperatura entre un año y otro, así como diferencias entre los tiempos de fermentación entre las producciones de pulque estudiadas (por el empirismo con el cual se elabora el producto), pueden influir en la precisión de los patrones de sucesión y composición de microorganismos en la bebida, para el diseño que fue planteado con producciones en 2017 y 2018.

No obstante, estos resultados pueden dar pie a una importante línea de investigación que permita comprender cómo opera la sucesión de los grupos de microorganismos en bebidas fermentadas. Los datos obtenidos plantean futuras investigaciones sobre cuáles son las bal y las levaduras claves en el proceso de fermentación de pulque en Michoacán; en los sistemas estudiados los morfotipos con mayores abundancias son las bacterias M5, M8 y M19 y las levaduras S10 y S16. Identificar la especie de estos morfotipos resulta prioritario, de gran

importancia teórica y utilidad práctica, puesto que son los microorganismos que están siendo manejados intensamente y quizá sometidos a procesos de domesticación incipientes, además de poseer un gran potencial biotecnológico.

9.3 Características físicas, químicas, sabor e identidad

Diferentes trabajos han reportado características físicas y químicas tanto de aguamiel como de pulque; incluso las normas mexicanas NOM-199-SCFI-2017, NMX-V-022-1972 y NMX-V-037-1972 establecen las características y los rangos que el aguamiel y el pulque deben poseer para que puedan ser comercializados en el país (Tabla 9-10). Vale la pena reconocer que aunque el aguamiel y el pulque poseen características generales y que existe una norma mexicana que pretende establecer los valores que deben poseer, la variación generada por la especie de agave utilizada, las condiciones climáticas, la composición microbiana y las distintas prácticas para aprovechar el recurso también debe considerarse. De ahí la importancia de registrar los diferentes componentes del manejo que hemos abordado y discutido en este trabajo.

Tabla 9. Características físicas y químicas de aguamiel y el intervalo establecido por la NMX. Nd= no datos.

	Sánchez <i>et al.</i> , 1953 <i>Agave sp.</i>	Valadez <i>et al.</i> , 2012 <i>Agave sp.</i>	Romero <i>et al.</i> , 2015 <i>A. atrovirens</i>	Ortiz <i>et al.</i> , 2008 <i>A. mapisaga</i>	Flores <i>et al.</i> , 2008 <i>A. salmiana</i>	Enríquez <i>et al.</i> , 2017 <i>A. salmiana</i>	SU	T	Intervalo NMX
° Brix	11	16	11.1	Nd	11.44	9.83	9.63	9.57	8 a 12
pH	7	4.3	6.29	4.5	6.3	5.73	6.23	4.58	6.6 a 7.5
A. láctico g/100 mL	0.18	0.68	0.6	0.5	Nd	Nd	0.23	0.53	0.9 a 1.03

En la Tabla 9 podemos apreciar que en los grados Brix, los valores reportados por Valadez *et al.* (2012) superan los valores establecidos por los otros estudios, incluso al intervalo de la norma. En el pH también hay reportes que no entran en la norma como es el caso de T con un pH de 4.58, el de Valadez *et al.* (2012) de 4.3 o el de aguamiel de Ortiz *et al.* (2008) de 4.5. En el caso de ácido láctico ninguno de los datos reportados entra en la norma, estando todos por debajo del valor mínimo establecido, esto resulta interesante porque pareciese que la norma resulta “laxa” en este parámetro. Si tenemos en cuenta que esta norma se aplica principalmente para comercializar pulque en la Ciudad de México, puede que tenga ese intervalo más amplio debido a que el aguamiel no

llega a la ciudad de manera inmediata. En su transportación se sigue fermentando y de ahí que quizá el intervalo para ácido láctico sea más amplio para que sea posible comercializar el producto.

Para el caso del pulque (Tabla 10), sucede algo similar con los grados Brix, ya que la norma establece un intervalo entre 2 y 5 °Brix, un intervalo por debajo de los reportados y que implica un mayor tiempo de fermentación al contener menos azúcar. En cuanto al pH, sucede que el intervalo de la norma es muy acotado, aunque no hay tanta variación en el pH de los diferentes pulques reportados. Para el ácido láctico el valor reportado por Sánchez *et al.* (1953) está ligeramente por debajo de la norma y el reportado para SU por encima del intervalo. Los porcentaje de alcohol en los pulques reportados fluctúan dentro en el intervalo de la norma.

Tabla 10. Características físicas y químicas de pulque y el intervalo establecido por la NMX. Nd= no datos.

	Sánchez <i>et al.</i> , 1953 <i>Agave sp.</i>	Valadez <i>et al.</i> , 2012 <i>Agave sp.</i>	SU	T	Intervalo NMX
° Brix	6	7.4	8.22	7.48	2 a 5
pH	4.6	3.8	4.15	3.94	3.5 a 4
A. láctico g/100mL	0.348	Nd	0.82	0.67	0.4 a 0.7
% Alcohol	5.43	1.32	3.88	4.92	4 a 7.5

Este ejercicio de comparación resulta interesante porque deja en evidencia que la variación entre las diferentes características de las aguamieles y pulques se deben considerar y que la norma no representa esta variación. Esto es algo que se debe discutir al tratarse de una norma que rige la comercialización del producto a nivel nacional. Además, la norma no integra otras características como la densidad o viscosidad, las cuales también son importantes indicadores de la fermentación de la bebida. También valdría la pena discutir si estos son los criterios adecuados para categorizar y evaluar una bebida como el pulque, o si sería más adecuado generar otra escala y otros indicadores que permitan caracterizar y demostrar la variabilidad de los pulques de México. Justo esta categorización podría generarse a partir de los criterios de calidad que los productores dictaminan, como el caso del “picor” o “caramé” de la savia en SU.

Los resultados presentados hacen clara la tendencia de la fermentación con las fases de la bebida, no obstante la práctica del hervor, que además es una práctica poco común para la elaboración de pulque, aumenta la cantidad de azúcares, ya sea tanto por la evaporación de agua y con ello el aumento de porcentaje de azúcares en la savia, como por la hidrólisis de otros

compuestos que liberen azúcares, por ejemplo las saponinas (Sildana *et al.*, 2016). Las saponinas son metabolitos secundarios presentes en el tejido de los agaves que son responsables, entre otras cosas, del escozor que produce la planta. Incluso el contenido de saponinas en los agaves podría estar asociado a la intensidad de manejo que reciben las plantas; por ejemplo, Figueredo-Urbina *et al.* (2018) reportaron cantidades menores de saponinas en plantaciones cultivadas de *A. inaequidens* y *A. cupreata* en comparación con las respectivas poblaciones silvestres de esas especies.

Al estar presentes las saponinas en el tejido de los agaves y por ende en el aguamiel, cuando se hierve, las saponinas podrían hidrolizarse liberando azúcares y evitando así su propiedad urticante. De ahí que no solo el aguamiel hervido tenga más azúcar sino que también “no pique” como afirman los productores. Es necesario realizar la cuantificación e identificación de saponinas en las aguamiles sin hervir, en las hervidas y en los pulques resultantes de ambos casos para dilucidar si hay un efecto del hervor sobre las saponinas que corresponda así a la motivación campesina de hervir la savia.

Aunque en las características físicas y químicas que se midieron no se reportan diferencias entre los pulques elaborados con aguamiel hervida (SU) y los pulques hechos con aguamiel sin hervir (T); vale la pena considerar esta práctica valiosa por su importancia cultural para los habitantes de Santiago Undameo, ya que esta es la manera en que ellos consumen la bebida y les permite conformar una identidad en torno a la preparación del pulque, que los diferencia de Tarímbaro y otras comunidades productoras de pulque. La identidad resulta una construcción cultural constituida por las colectividades sociales y pretende distinguir el “nosotros” del “otros” (López-Austin, 2013). Por ello, el hervor de la savia resulta uno de los componentes de la cultura e identidad de estas comunidades: “*Aquí nosotros hacemos bien el pulque, el aguamiel se hierve antes, no como en otros lados*” (Doña Antonia, com. pers., 2016).

Los criterios para que un pulque se considere “bueno” radican en gran medida en cuestiones culturales. Por ejemplo, el pulque que se consume en la Ciudad de México es en su mayoría elaborado en localidades de Hidalgo y Tlaxcala, este pulque tiene una consistencia altamente viscosa ya que el tiempo de fermentación es mayor. Para elaborar este pulque se realiza una constante reinoculación con aguamiel en la mañana y en la tarde durante al menos tres días, de tal forma que hay una mayor acumulación de polímeros, producidos por el metabolismo de bacterias como las del género *Leuconostoc* (Álvarez, 2015; Escalante *et al.*, 2016). De tal forma que el

pulque se considera “maduro”, es decir que está en óptimas condiciones para consumirse, una vez que ha transcurrido este tiempo y una vez que adquiere dicha consistencia viscosa, es entonces cuando se comercializa, enviándolo a la ciudades. A las pulquerías que llevan este pulque, su alta viscosidad es un atributo normalizado y valorado, esto es porque corresponde al cómo se bebe pulque en este contexto, estando ésta propiedad dentro de los estándares de preferencias de los consumidores (Álvarez, 2015).

Otro ejemplo es el consumo de pulque curado, es decir licuar el pulque con frutas o semillas. Esta es una práctica antañña y se realiza para adicionar al pulque nuevas propiedades organolépticas derivadas de la mezcla. Esto ha generado toda una parafernalia entorno a la preparación y el consumo de los curados, desde la manera en cómo se preparan los ingredientes, algunos se hierven (avena, camote o tuna roja), unos se rallan (limón), otros se agregan frescos (piña, jitomate o melón), pasando por la manera de moler los ingredientes: licuado o martajado y hasta la forma de colado: con coladera o tela. Esto ha desarrollado un sinfín de recetas para que los comensales puedan experimentar y degustar el pulque de nuevas maneras, generando en las pulquerías profundos lazos de pertenencia ya que los comensales se hacen asiduos a cierto establecimiento por los curados y consumen rigurosamente el pulque de esta forma (Álvarez, 2015).

De la misma manera, en comunidades rurales al pulque se le agregan raíces, hojas o semillas para otorgarle nuevos olores y sabores. Ejemplos de lo anterior son las hojas de ruda (*Ruta graveolens*), las semillas de pirul (*Schinus molle*) o la raíz del ocpatl o timbre (*Acacia angustissima*) (Bruman, 2000; Godoy *et al.*, 2003; Álvarez, 2015). Estas prácticas están determinadas por las costumbres y las recetas de los manejadores, determinado así el cómo se “debe” preparar y beber el pulque para que esté “bueno”.

Otro ejemplo de prácticas para procurar un buen pulque, es la advertencia que se hacen los transportistas de pulque en la CDMX, quienes evitan que en los recipientes donde transportan el pulque (barriles de madera o tambos de plástico) se golpee la bebida, por lo que los recipientes deben ir completamente llenos y evitan que se muevan demasiado durante el recorrido, porque de lo contrario el pulque se descompone: “se corta”. O como los jicareros de las pulquerías, que evitan a toda costa usar cremas y perfumes porque los aromas de estos productos afectan al pulque y hacen que “se corte”, es decir que se descomponga y adquiera sabores desagradables (Álvarez, 2015).

Así el hervor de la savia en SU es una práctica que, además de sus implicaciones en las características físicas, químicas y microbiológicas, es relevante y necesaria para preparar un buen pulque para los manejadores de esta comunidad.

Además, como se ha mencionado, en la elaboración de bebidas fermentadas una de las razones fundamentales es la generación de un perfil organoléptico deseado. Esta generación de nuevas características es lo que perpetúa la constante innovación en el aprovechamiento de recursos. Los productores de SU afirman que es una práctica que permite prolongar el tiempo de vida del aguamiel y con ello aumentar la disponibilidad del recurso. El aguamiel hervido además de ser más dulce, es menos ácido, ya que el ácido láctico contenido se evapora al aumentarse la temperatura, reduciendo así la acidez y es por eso que el pH se torna neutro. Con los efectos mencionados el aguamiel hervido aumenta su digestibilidad, obteniendo atributos que no tendría sin el hervor, siendo ésta una estrategia para otorgarle a la savia nuevos atributos.

Vale la pena considerar que el hervor del aguamiel puede funcionar como una práctica que reduzca el riesgo de contaminación del aguamiel por patógenos. Es cierto que en las comunidades rurales los magueyes están expuestos a la intemperie y con la combinación de la matriz agropecuaria puede presentarse una fácil contaminación por patógenos presentes en heces fecales del ganado, por ejemplo. El hervor representaría una práctica que, al realizarse en condiciones óptimas de higiene (como hervir el aguamiel en recipientes inocuos y una vez hervido mantenerlo aislado de posibles de fuentes contaminantes), ayudaría a mantener el producto en buenas condiciones.

Además contribuiría a alejar el estigma que tiene el pulque como una bebida sucia, que enferma al que la consume, esto por un supuesto alto contenido de patógenos. Es común aún en contextos rurales y urbanos escuchar la historia de desprestigio de “la muñeca”, la muñeca es un trozo de excremento que supuestamente se le agrega al pulque para fermentarlo. Esta es una historia completamente falsa que surgió a finales del siglo XIX para desprestigiar al pulque y fomentar el consumo de otras bebidas como la cerveza (Ramírez-Rodríguez, 2015).

La práctica del hervor, aunado a los beneficios nutricionales de la bebida, así como los microorganismos fermentadores en su papel de probióticos, resultan en un collage de beneficios que visibilizándolo ayudaría a redignificar y terminar de desmentir los prejuicios que estigmatizan y dañan al pulque, a quienes lo producen y consumen.

9.4 El papel del aguamiel y el pulque en las comunidades rurales de México

Como se mencionó anteriormente, son 20 los estados del país donde se produce pulque, no obstante esto ha disminuido debido a diversos factores sociales, económicos y culturales, entre los que podemos mencionar el abandono de las actividades agrícolas, la migración de sus habitantes a entornos urbanos, al desprestigio cultural de las actividades primarias y la transformaciones culturales en las comunidades rurales.

El pulque es un elemento central dentro de la cultura mexicana, hasta la actualidad funge como un elemento de identidad tanto en contextos urbanos como rurales (Velasco, 2013; Álvarez 2015). Aunado a esto, el aguamiel y pulque tiene un rol fundamental dentro de la dieta de las familias productoras “*Mi abuelita siempre me da un vaso de aguamiel antes de ir a la escuela*” (Diego, 8 años, com. pers., 2016). El aguamiel y el pulque contienen aminoácidos, vitaminas B1, B2, B3 y C, hierro, fósforo, calcio, magnesio, además de ácido fólico, (Massieu *et al.*, 1948; Sánchez-Marroquín, 1979; Ortiz-Basurto, 2008). Además, aporta fitasa, una enzima que permite la asimilación de fósforo y zinc, con ello el consumo de pulque favorece la absorción de nutrientes que provienen de otros alimentos como las tortillas y las legumbres (Tovar *et al.*, 2008).

Estudios realizados en comunidades rurales de México muestran que el aguamiel y el pulque son parte de la dieta básica de niños y adultos (Backstrand *et al.*, 2002; 2004; Fournier, 2007). En esas comunidades el acceso a alimentos depende de lo que las familias cultivan y las fuentes de agua potable no siempre son abundantes, por lo tanto el pulque funge como un alimento y una bebida constante y accesible. En la comunidad de Valle de Solís, Edo. Méx, el pulque es la fuente principal de vitamina C, la tercera fuente de hierro, por debajo de tortillas y frijoles, además de aportar un porcentaje de la ingesta diaria de calcio, aminoácidos y otras vitaminas (Backstrand *et al.*, 2002). Por su parte, en comunidades otomíes del Valle del Mezquital, Hgo. se registró que el pulque es la fuente primaria de vitamina C, la segunda de calorías, calcio y hierro y la tercera de aminoácidos (Anderson *et al.*, 2009).

En México el problema de desnutrición es alarmante. Para el 2012 se reportó que cerca de 1.5 millones de niños menores a los 5 años tienen problemas de desnutrición (Rivera-Dommarco *et al.*, 2013), esto es, cerca del 20% de los niños de esa edad en el país. Además, la situación se agrava conjugándola con las condiciones sociales, pues en contextos rurales este porcentaje aumenta a 20.9% y crece al 33% en poblaciones indígenas (Rivera-Dommarco *et al.*, 2013). Investigaciones en materia de salud revelan que las mujeres en comunidades rurales (Valle de Solís,

Edo. Méx.) tienen deficiencias considerables de hierro y ácido fólico, con una alta incidencia de anemia (Backstrand *et al.*, 2002; 2004). En Valle de Solís, de la población de niños entre 1.5 y 3 años, el 70% tenía niveles bajos de hemoglobina, el 48% tenía deficiencia de hierro, y el 33% tenía concentraciones bajas de vitamina B (Allen *et al.*, 2010).

Para el 2015 el 57% de la población de Michoacán se encontraba en condiciones de pobreza (CONEVAL, 2017); ésta alarmante situación se escala a los municipios donde se ubican los sistemas estudiados. En el municipio de Morelia existen 319,068 personas en pobreza (41% de su población) y 45,390 (6%) en pobreza extrema. Por su parte en el municipio de Tarímbaro son 46,142 personas en situación de pobreza (44% de su población) y 7,499 (7%) en pobreza extrema (CONEVAL, 2017).

Bajo condiciones de alimentación tan adversas, la presencia del maguey y el consumo de aguamiel y pulque resulta vital para muchas localidades, aunque como se ha discutido, no es suficiente para cumplir con los niveles mínimos nutricionales de los habitantes. Resulta prioritario a nivel nacional generar estrategias para garantizar la seguridad alimentaria en las comunidades del país, donde la demanda de alimentos se cumpla a través de estrategias productivas locales, organizadas por los pobladores y acompañadas por otras instituciones gubernamentales, civiles o educativas, lo anterior acorde a las características ambientales y culturales de cada región (Ortiz-Gómez *et al.*, 2004). En muchas regiones de México el cultivo de maguey puede ser un eje de las estrategias para lograr la seguridad alimentaria.

Sin ser esta argumentación una apología al consumo de bebidas alcohólicas, es necesario reconocer que el exceso en el consumo de pulque ocasiona problemas tanto a la salud de los consumidores, como a las relaciones familiares y sociales (Taylor, 1987; Narro-Robles *et al.*, 1992); problemáticas no exclusivas al consumo del pulque, como en algún momento del siglo XX se afirmó, sino al consumo excesivo de bebidas alcohólicas (Barbosa, 2004; Ramírez-Rancaño, 2012). Por lo anterior y con la dimensión abarcada se considera que el consumo moderado y responsable del pulque representa un aporte importante de nutrientes para quien lo consume.

Además del valor nutricional, está el valor económico, muchas familias en las zonas productoras y otras tantas en las urbanas, como en la Ciudad de México dependen de los ingresos generados de esta industria (Álvarez, 2015). En la ciudad de Morelia y sus alrededores los volúmenes de producción y consumo son inferiores en comparación a los de la Ciudad de México; no obstante, la actividad pulquera representa una actividad económica importante. Pues para los

productores con los que se realizó esta investigación, el pulque es un pilar de su economía, sin el cual no podrían solventar los gastos monetarios diarios. Valdría la pena ahondar en el porcentaje que la venta de pulque representa en los ingresos económicos de las familias; no obstante, con la información recabada en esta investigación es notoria la relevancia de la actividad, pues en todos los casos los integrantes de la familia dedican horas de trabajo a esta actividad, y la reportan como una de las más importantes en su día a día

X. CONCLUSIONES

El maguey como eje del manejo sustentable

El manejo sustentable debe implicar mantener las condiciones materiales e inmateriales que ha permitido la existencia de ecosistemas, recursos y culturas (Casas *et al.*, 2016). Este manejo sustentable debe ser una directriz, un concepto operativo, que permita mantener a largo plazo sistemas ecológicos y sociales, asegurando no solo la presencia de la biodiversidad sino asegurando el respeto, la equidad, el bienestar y la autonomía de los grupos culturales que manejan los diferentes sistemas.

El maguey y el pulque son un ejemplo de lo anterior, son cerca de 25 siglos en los que la intensa y continua interacción entre humanos y agaves ha generado la diversidad del género y la diversidad de usos y beneficios que se obtienen de estas plantas. Las prácticas y los saberes acumulados por generaciones, son lo que ha permitido desarrollar los sistemas que se han presentado en este trabajo, pero también a los otros cientos de sistemas de aprovechamiento y manejo de recursos, tanto de plantas, animales y microorganismos en la historia de nuestra especie.

Actualmente muchos de los sistemas donde los agaves se insertan enfrentan graves problemáticas: la disminución y cada vez mayor escasez de los recursos naturales, el abandono y falta de financiamiento para el sector agrícola, la migración en busca de empleo o forzada por conflictos de despojo o violencia, el envejecimiento de los productores, el aumento en la desigualdad y la precariedad económica, por mencionar algunos de los más relevantes. La falta de acceso a alimentos, servicios y oportunidades en las comunidades rurales, ponen en grave peligro su existencia, la de sus recursos naturales, su cultura y su gente. Ante el escenario del México rural, de abandono y pobreza, el agave representa una apuesta para la reivindicación de los pueblos, de su economía y su cultura. El maguey y los sistemas donde se maneja no son ajenos para las poblaciones mexicanas, pues el género es utilizado a lo largo y ancho del territorio mexicano por los diferentes grupos étnicos que lo conforman. Generar estrategias que visibilicen e impulsen estos

sistemas campesinos resulta fundamental, pues son sistemas vigentes, funcionan cumpliendo con necesidades tanto a los contextos rurales como a los urbanos, por lo que resultan altamente necesarios para la vida de las comunidades, tanto a nivel de seguridad alimentaria pero también a una escala de identidad cultural.

Hemos visto cómo dentro de una región, dos localidades próximas presentan variaciones en su manejo, tanto en las variedades de agaves manejados como en las formas de elaboración del pulque. Estas variaciones otorgan diferencias al producto final, retomando, con el hervor se genera un aguamiel más dulce y un pulque con una tendencia a mayor abundancia de microorganismos pero menor riqueza de morfotipos en comparación con los no hervidos. Además de significados culturales asociados a este manejo, *el hervor es para que no pique el pulque, porque nosotros sí lo preparamos bien*, el *nosotros* cobra sentido como un elemento de identidad.

Es entonces el manejo determinante en las características que el aguamiel y el pulque poseen. Las prácticas orientadas bajo la racionalidad de un grupo de mujeres y hombres específico ha generado la gran diversidad agrícola y gastronómica del mundo; el pulque se ubica ahí, pues no existe un solo pulque, ni una manera de elaborarlo y consumirlo, sino hay muchas, diversas y estarán determinadas por cuestiones ambientales, biológicas y culturales.

Por eso es necesario incorporar la visión del manejo de los recursos en las normativas de los procesos productivos. El cómo se elabora es fundamental, ya que, tanto buenas prácticas como las estrategias que aspiran a la sustentabilidad deben ser reconocidas e implementadas. Por ejemplo, es necesario que la nom para bebidas alcohólicas incorpore un apartado de las prácticas permitidas y requeridas en la elaboración, pero no solo de la bebida, sino en el manejo del recurso de donde se obtiene (sea agave, caña, fruta o cereal).

El aprovechamiento y manejo de los recursos se enfrenta ante un enorme reto, la tendencia hacia la intensificación de los sistemas prometiendo mayores ganancias para los productores a costa de las comunidades y ecosistemas es preocupante. Es necesario romper con esa visión y aspirar a un manejo sustentable de los recursos reconociendo la independencia, el conocimiento y las prácticas de las comunidades productoras y generando los medios para que los beneficios de la comercialización vayan ellos, sin acorralarlos con normativas y reglas de operación.

Los sistemas de manejo de agave, los contextos y las preferencias particulares de la gente que maneja a los magueyes y consume el aguamiel y el pulque, son determinantes en los atributos de la bebida. Atributos que están íntimamente asociados a la composición de los ensamblajes de

microorganismos que intervienen en el proceso. Documentar con detalle la relación de estos consorcios de organismos con la calidad de la savia, su proveniencia y su manejo es una tarea de gran valor para caracterizar técnicas y recursos genéticos que son parte de la inmensa cultura mesoamericana.

Es necesario que investigaciones como estas crucen la frontera de la universidad y sirvan para empoderar a los manejadores con información científica robusta, que les ofrezca alternativas, vías de comercialización y comunicación, nuevas herramientas y estrategias de manejo que respondan a sus problemáticas, para que este sistema de maguey pulquero en Santiago Undameo y Tarímbaro como muchos otros sistemas en resistencia, permitan seguir manteniendo a su gente y enriqueciendo el patrimonio biocultural de México.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberú, G., M. del C. (2012). *Relación de Michoacán y Códice Florentino: La huella medieval en dos Códices del Siglo XVI*. Tesis de Doctorado. Facultad de Filosofía y Letras. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Albuquerque, U., Fernandes, L., De Lucena, R. & Nóbrega R. (2014). *Methods and techniques in ethnobiology and ethnoecology*. Springer Protocols Handbooks.
- Alcalá, J. de (2016). *La Relación de Michoacán*. El Colegio de Michoacán.
- Allen L.H., Rosado J., Casterline J., López P., García O., Martínez H. (2000). *Lack of hemoglobin response to iron supplementation in anemic Mexican preschoolers with multiple micronutrient deficiencies*. The American journal of clinical nutrition. Am J Clin Nutr.;71(6):1485–94.
- Altieri, M., & Nicholls, C. (2000). *Agroecología. Teoría y práctica para una agricultura sustentable*. México: Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente.
- Álvarez, G. (2015). *Del maguey al vaso: el manejo del pulque en las pulquerías del Distrito Federal y en las localidades abastecedoras*. Tesis de Licenciatura. ENES Morelia, UNAM.
- Álvarez-Duarte, M.C., García-Moya, E., Suárez-Espinosa, J., Luna-Cavazos, M., & Rodríguez-Acosta, M. (2018). *Conocimiento tradicional, cultivo y aprovechamiento del maguey pulquero en los municipios de Puebla y Tlaxcala*. Polibotánica, (45), 205-222.
- Álvarez-Palma, A. et al (1998). *La explotación del maguey pulquero en la zona de Metztlán: datos etnográficos y arqueológicos*. Dimensión Antropológica, vol. 13, mayo-agosto, pp. 7-30.
- Anderson, R. K., Calvo, J., Serrano, G., & Payne, G. C. (2009). *Estudio del estado de nutrición y los hábitos alimentarios de comunidades otomíes en el Valle del Mezquital de México*. Salud Pública de México, 51 (4), S657– S674.
- Baath, E. & Anderson, T. H. (2003). *Comparison of soil fungal/bacterial ratio in a pH gradient using physiological and PLFA based techniques*. Soil Biol. Biochem., 35, 955–963.
- Backstrand, J.R., Allen, L.H.; Black, A.K., de Mata, M.; Pelto, G.H. (2002). *Diet and iron status of nonpregnant women in rural central Mexico*. Am. J. Clin. Nutr. 76, 156–164.
- Backstrand J.R., Goodman A., Allen L.H., Pelto G.H. (2004). *Pulque intake during pregnancy and lactation in rural Mexico: Alcohol and child growth from 1 to 57 months*. Eur. J. Clin. Nutr.; 58:1626–1634.
- Barbosa, M. (2004). *Controlar y resistir. Consumo de pulque en la Ciudad de México, 1900-1920*. México: El Colegio de México. En Segundo Congreso Nacional de Historia Económica.
- Besada-Lombana, Pamela B et al. (2017) *Engineering Saccharomyces cerevisiae fatty acid composition for increased tolerance to octanoic acid*. Biotechnology and bioengineering 114 7 1531-1538.
- Blancas, J.J., Casas, A., Pérez-Salícup, D.R., Caballero, J.V., & Vega, E. (2013). *Ecological and socio-cultural factors influencing plant management in Náhuatl communities of the Tehuacán Valley, Mexico*. Journal of ethnobiology and ethnomedicine.
- Bokulich N., Ohta M., Lee M., Mills D. (2014). *Indigenous bacteria and fungi drive traditional kimoto sake fermentations*. Appl Environ Microbiol 80:5522–5529.
- Bolotin A., Quinquis B., Renault P., Sorokin A., Ehrlich S. (2004). *Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium Streptococcus thermophilus*. Nat. Biotechnol. 22:1554–58
- Bruman, H.J. 2000. *Alcohol in Ancient Mexico*. USA. The University of Utah Press.
- Callen, E. (1967). *Analysis of the Tehuacan coprolites*. The prehistory of the Tehuacan Valley, 1. University of Texas Press.
- Cano-Contreras, E., Medinaceli, A., Sanabria, O., Argueta, A. (2016). *Código de Ética para la investigación, la investigación-acción y la colaboración etnocientífica en América Latina*. Etnobiología, 14 (Suppl 1).
- Caplice, E., & Fitzgerald, G. (1999). *Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation*. International Journal of Food Microbiology, 50, 131–149.
- Casas, A., Otero-Arnaiz, A., Pérez-Negrón, E., & Valiente-Banuet, A. (2007). *In situ management and domestication of plants in Mesoamerica*. Annals of botany, 100 (5), 1101-15.

- Casas, A., Blancas, J., Pérez, E., Torres, I., Vallejo, M., Rangel, S., et al. (2014). *Manejo sustentable de recursos naturales: naturaleza y cultura*. En G. Arias, B. Farfán, C. Corral, H. Rendón, M. Herrera, H. Servín, et al. (coords). *Sustentabilidad e interculturalidad paradigmas entre la relación cultura y naturaleza*. México: Universidad Intercultural Indígena de Michoacán.
- Casas, A., & Parra, F. (2016). *La domesticación como proceso evolutivo*. En *Domesticación en el Continente Americano Vol. 1 Manejo de biodiversidad y evolución dirigida por las culturas del Nuevo Mundo*. Perú.
- Cavalieri, D., McGovern, P., Hartl, D. & Mortimer, R. & Polsinelli, M. (2003). *Evidence for S. cerevisiae Fermentation in Ancient Wine*. *Journal of molecular evolution*, 57 Suppl 1. S226-32.
- Castillo, I. (2011). *Léxico del maguey, el pulque y la pulquería en Apan, Hidalgo*. México: Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cavanagh, D., Fitzgerald, G. F., & McAuliffe, O. (2015). *From field to fermentation: The origins of Lactococcus lactis and its domestication to the dairy environment*. *Food Microbiology*, 47.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikindas, M. L. (2001). *Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation*. *International Journal of Food Microbiology*, 71(1), 1–20.
- Colunga-GarcíaMarín P., Eguiarte, L., Largué, A. & Zizumbo-Villareal D. (2007). *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros magueyes*. México: Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Colunga-GarcíaMarín, P., Zizumbo-Villarreal, D., Torres, I., Casas, A., Figueredo Urbina, C. J., Rangel-Landa, Selene Delgado-Lemus, A., Carrillo-Galván, G. (2017). *Los agaves y las prácticas mesoamericanas de aprovechamiento, manejo y domesticación*. En *Domesticación En El Continente Americano Vol. 2, Investigación Para El Manejo Sustentable de Recursos Genéticos En El Nuevo Mundo*.
- CONEVAL. Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social. (2017). *Medición de la pobreza, Michoacán, 2010-2015*. Base de datos en línea, consultada en marzo del 2019: www.coneval.org.mx/coordinacion/entidades/Michoacan/Paginas/principal.aspx
- Corcuera de Mancera, S. (2013). *El fraile, el indio y el pulque. Evangelización y embriaguez en la Nueva España (1523-1548)*. Fondo de Cultura Económica. México.
- Correa-Ascencio, M., Robertson, I. G., Cabrera-Cortés, O., Cabrera-Castro, R., & Evershed, R. P. (2014). *Pulque production from fermented agave sap as a dietary supplement in Prehispanic Mesoamerica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(39), 14223–14228.
- Cortés-Máximo, J. C. (1999). *El valle de Tarímbaro. Economía y sociedad en el siglo XIX*. UMSNH, Instituto de Investigaciones Históricas.
- Darwin, C. (1859). *The origins of species by means in natural selection or the preservation of favoured races in the struggle for life*. Wiley, London.
- Delgado, A. (2008). *Aprovechamiento y disponibilidad espacial de Agave potatorum en San Luis Atlotitlán, Puebla, México*. México: Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Douglas, G. L., & Klaenhammer, T. R. (2010). *Genomic Evolution of Domesticated Microorganisms*. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), 397–414.
- Eguiarte, L., & Souza, V. (2007). *Historia natural del Agave y sus parientes: Evolución y ecología*. En P. Colunga-García, L. Eguiarte, A. Largué & D. Zizumbo-Villareal (eds). *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros magueyes*. México: Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Eldarov, A. M & A. Kishkovskaia, S & N. Tanaschuk, T & V. Mardanov, A. (2016). *Genomics and Biochemistry of Saccharomyces cerevisiae Wine Yeast Strains*. *Biochemistry (Moscow)*. 81. 1650-1668.
- Enríquez-Salazar, M., Veana, F., Aguilar, C.N. (2017). *Microbial diversity and biochemical profile of aguamiel collected from Agave salmiana and A. atrovirens during different seasons of year*. *Food Sci Biotechnol* 26: 1003
- Escalante, A., Giles-Gómez, Hernández, Córdova-Aguilar, López-Munguía, Gosset, Bolívar. (2008). *Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach*. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 124, Issue 2.
- Escalante, A., López Soto, D. R., Velázquez Gutiérrez, J. E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., & López-Munguía, A. (2016). *Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage: Historical, microbiological, and technical aspects*. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN), 1–18.

- Evans, S. T. (1990). *The Productivity of Maguey Terrace Agriculture in Central Mexico during the Aztec Period*. Latin American Antiquity. 1. 117
- Ferrari A. E and Wall Luis G. (2017). *Analysis of Soil Lipids for Studies of Microbial Communities*. Innovative Techniques in Agriculture 1.6 262-266.
- Figueredo, C. J., A. Casas, P. Colunga, A. González y J. Nassar. (2014). *Morphological variation, management and domestication of 'maguey alto' (Agave inaequidens) and 'maguey manso' (A. hookeri) in Michoacán, México*. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 10: 66.
- Figueredo-Urbina, C. J., Casas, A., Martínez-Díaz, Y., Santos-Zea, L., & Gutiérrez-Urbe, J. (2018). *Domestication and saponins contents in a gradient of management intensity of agaves: Agave cupreata, A. inaequidens and A. hookeri in central Mexico*. Genetic Resources and Crop Evolution.
- Fournier, P. (2007). *Los hñāññü del Valle del Mezquital: maguey, pulque y alfarería*. México: Instituto Nacional de Antropología e Historia.
- Gallone, B., Steensels, J., Prahl, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Verstrepen, K. J. (2016). *Domestication and Divergence of Saccharomyces cerevisiae Beer Yeasts*. Cell, 166(6), 1397–1410.
- García-Garibay, M., Quintero-Ramírez, R., & López-Mungía, A. (2004). *Biología Alimentaria*. México: Limusa.
- García-Herrera, J., Méndez-Gallegos, S., & Talavera-Magaña, D. (2010). *El género Agave spp. en México: Principales usos e importancia socioeconómica y agroecológica*. México: Revista Salud Pública y Nutrición.
- García-Mendoza, A. J., (2002). *Distribution of Agave (Agavaceae) in Mexico*. Cactus and Succulent Journal. 74:177-187.
- García-Mendoza, A. J. (2011). *Agavaceae. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Instituto de Biología, UNAM. D. F, México.
- García-Mendoza, A. J., Franco-Martínez, S., Sandoval-Gutiérrez, D. (2019). *Cuatro especies nuevas de Agave (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México*. Acta Botánica Mexicana, [S.1.], n. 126.
- Gentry, H. S. (1982). *Agaves of Continental North America*. Tucson: The University of Arizona Press.
- Germond JE, Lapierre L, Delley M, Mollet B, Felis GE, Dellaglio F. (2003). *Evolution of the bacterial species Lactobacillus delbrueckii: a partial genomic study with reflections on prokaryotic species concept*. Mol. Biol. Evol. 20:93–104
- Giles-Gómez, J. G. S. García, V. Matus, I. C. Quintana, F. Bolívar, and A. Escalante. (2016). *In vitro and in vivo probiotic assessment of Leuconostoc mesenteroides P45 isolated from pulque, a Mexican traditional alcoholic beverage*, SpringerPlus, vol. 5, no. 1.
- Gibbons, J. G., & Rinker, D. C. (2015). *The genomics of microbial domestication in the fermented food environment*. Current Opinion in Genetics and Development, 35, 1–8.
- Godoy, A., Herrera, T. & Ulloa, M. (2003). *Más allá del pulque y el tepache. Las bebidas alcohólicas no destiladas indígenas de México*. Instituto de Investigaciones Antropológicas. UNAM.
- Goncalves de Lima, (1986). *El maguey y el pulque en los códices mexicanos*. México: FCE.
- González-Jácome, A. (2016) *Sistemas agrícolas en orografías complejas: Las terrazas de Tlaxcala*. En Etnoagroforestería en México (Comp.) Moreno-Calles A., I., Casas, A., Toledo, V. M., Vallejo-Ramos, M. Universidad Nacional Autónoma de México.
- González-Vázquez R, Azaola-Espinosa A, Mayorga-Reyes L, Reyes-Nava LA, Shah NP, Rivera-Espinoza Y. (2015). *Isolation, identification and partial characterization of a Lactobacillus casei strain with bile salt hydrolase activity from pulque*. Probiotics Antimicrob. Proteins;7:242–248.
- Granados, D. (1993). *Los agaves en México*. México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Guilhem, O. (2012). *Los dioses ebrios del México antiguo. De la transgresión a la inmortalidad*. Arqueología Mexicana , XIX (114), 26-33.
- Hernández-López, J. J., (2014). *La jornalización en el paisaje agavero. Actividades simples, organización compleja*. México: Centro de Investigaciones y Estudios Superiores en Antropología Social.
- Jiménez, E., Yépez, A., Pérez-Cataluña, A., Ramos, E., Zúñiga, D., Vignolo, G., & Aznar, R. (2018). *Exploring diversity and biotechnological potential of lactic acid bacteria from tocosh - traditional Peruvian*

fermented potatoes - by high throughput sequencing (HTS) and culturing. LWT - Food Science and Technology, 87, 567–574.

- Jiménez-Valdés, M. et al. (2010) *Population Dynamics of Agave marmorata Roez. under Two Contrasting Management Systems in Central Mexico*. Economic Botany, pp. 149–160
- Kaur, A., Chaudhary, A., Kaur, A., Choudhary, R. and Kaushik, R. (2005) *Phospholipid fatty acid – a bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem*. Curr Sci 89, 1103–1112.
- Kirchhoff, P. (1960). *Mesoamérica; sus límites geográficos, composición étnica y caracteres culturales*. México: Escuela Nacional de Antropología e Historia.
- Kleerebezem M, Hugenholtz J. (2003). *Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria*. Curr. Opin. Biotechnol. 14:232–37
- Lappe, P., Moreno, R., Arrizón, J., Herrera, T., García, A., & Gschaedler, A. (2008). *Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages*. FEMS. Yeast Research, 1037-1052.
- Leal-Díaz, A. M., Santos-Zea, L., Martínez-Escobedo, H. C., Guajardo-Flores, D., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldivar, S. O. (2015). *Effect of Agave americana and Agave salmiana Ripeness on Saponin Content from Aguamiel (Agave Sap)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(15), 3924–3930.
- Legras, J. L., Merdinoglu, D., Cornuet, J. M., & Karst, F. (2007). *Bread, beer and wine: Saccharomyces cerevisiae diversity reflects human history*. Molecular Ecology, 16(10), 2091–2102.
- López-Austin A. (2013). *Cosmovisión, identidad y taxonomía alimentaria*. En Identidad a través de la cultura alimentaria. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Lorenzo-Monterrubio, A. (2007). *Las haciendas pulqueras de México*. México: Coordinación de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Machida, M, Asai, K, Sano, M, Tanaka, T, Kumagai T. (2005). *Genome sequencing and analysis of Aspergillus oryzae*. Nature 438:1157–61
- Macnaughton, S., Jenkins, T., Wimpee, M., Cormier, M. & C White, D. (1997). *Rapid extraction of lipid biomarkers from pure culture and environmental samples using pressurized accelerated hot solvent extraction*. Journal of Microbiological Methods. 31. 19-27
- MacNeish, R. S. (1967) *A summary of the subsistence. In the Prehistory of the Tehuacán Valley.*, in DS, B. (ed.) Vol. 1 Environmental and subsistence. University of Texas Press, pp. 14–27.
- Massieu, G., Gúzman, J., Cravioto, R. & Calvo, J. (1948). *Determination of some essential amino acids in several uncooked Mexican foodstuff*. The Journal of Nutrition, Vol. 38, 297.
- McGovern, P. E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A., Wang, C. (2004). *Fermented beverages of pre- and proto-historic China*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101(51), 17593–17598.
- Merila, P., Stromner, R. and Fritze, H. (2002). *Soil microbial activity and community structure along a primary succession transect on the landuplift coast in western Finland*. Soil Biol. Biochem., 34, 1647–1654.
- Miranda, F. (1980). *Estudio preliminar de la Relación de Michoacán*. En La Relación de Michoacán. Alcalá J. El Colegio de Michoacán.
- Montemayor, C., García-Escamilla, E., Silva-Galeana, L., & Rivas-Paniagua, E. (2008). *Diccionario del náhuatl en el español de México*. D.F., México: Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial de la UNAM.
- Mora-López, J. L., Reyes-Agüero, J. A., Flores-Flores, J. L., Peña-Valdivia, C. B., & Aguirre-Rivera, J. R. (2011). *Variación morfológica y humanización de la sección Salmianae del género Agave*. México: Agrociencia, 45(4), 465-477.
- Moreno-Calles, A., Toledo, Víctor M., & Casas, A. (2013). *Los sistemas agroforestales tradicionales de México: Una aproximación biocultural*. México: Botanical Sciences, 91(4), 375-398.
- Narro-Robles, J., Gutiérrez, H., López, M., Borges, G., & Rosovsky, H. (1992). *La mortalidad por cirrosis hepática en México II. Exceso de mortalidad y consumo de pulque*. Salud Pública de México (34), 388-405.
- Nie, Z., Zheng, Y., Du, H., Xie, S. & Wang, M. (2014). *Dynamics and diversity of microbial community succession in traditional fermentation of shanxi aged vinegar*. Food Microbiol. 47, 62–68.

- Ortiz-Basurto, R. I., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Dornier, M. & Belleville, M. P. (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.
- Ortiz-Gómez, A., & Vázquez García, V., & Montes Estrada, M. (2005). *La alimentación en México: enfoques y visión a futuro*. Estudios Sociales. Revista de alimentación contemporánea y desarrollo regional, 13 (25), 8-34.
- Pathan, A., Bhadra, B., Begum, Z., Shivaji, S. (2010). *Diversity of yeasts from puddles in the vicinity of Midre Lovénbreen glacier, arctic and bioprospecting for enzymes and fatty acids*. Current Microbiology 60: 307-314.
- Pérez-Sánchez, José Manuel. (2016). *Agricultura de terrazas en el cerro Tenismo, Toluca, México*. Terra nueva etapa, XXXII, 51, pp. 163 - 184.
- Pickersgill, B., (2007). *Domestication of plants in the Americas: Insights from mendelian and molecular genetics*. Annals of Botany, 100: 925-940.
- Ramírez-Rancaño, M. (2012). *El Rey del Pulque. Ignacio Torres Adalid y la industria pulquera*. México: UNAM, Instituto de Investigaciones Sociales.
- Ramírez-Rodríguez, R. (2004). *El maguey y el pulque: Memoria y Tradición convertidas en Historia, 1884-1993*. México: Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Ramírez-Rodríguez, R. (2015). *La transformación de la región pulquera en los llanos de Apan 1910-1950*. En “Campesinos y procesos rurales diversidad, disputas alternativas”. Asociación Mexicana de Estudios Rurales. Instituto de Investigaciones Sociales, UNAM.
- Ramírez-Rodríguez, R. (2017). *Las disposiciones contra el pulque durante la Revolución Mexicana. El debate sobre su consumo en la ciudad de México (1912-1917)*. En “Actores y escenarios de la Revolución Mexicana”. Gerencia del centro histórico y patrimonial. Puebla, México.
- Rivera-Dommarco, J., Cuevas-Nasu, L., González de Cosío, T., Shamah-Levy, T. & García-Feregrino, R. (2013). *Desnutrición crónica en México en el último cuarto de siglo: análisis de cuatro encuestas nacionales*. Salud Pública de México, 55 (Supl. 2), S161-S169
- Robertson, I. G., & Cabrera Cortés, M. O. (2017). *Teotihuacan pottery as evidence for subsistence practices involving maguey sap*. Archaeological and Anthropological Sciences, 9(1), 11–27.
- Romero-Luna, HE, Hernández-Sánchez H, Dávila-Ortiz G. (2017). *Traditional fermented beverages from Mexico as a potential probiotic source*. Ann Microbiol.; 67:577.
- Ross, R., Morgan, S., & Hill, C. (2002). *Preservation and fermentation: Past, present and future*. International Journal of Food Microbiology, 79(1–2), 3–16.
- Ruess, Liliane & M. Chamberlain, Paul. (2010). *The fat that matters: Soil food web analysis using fatty acids and their carbon stable isotope signature*. Soil Biology & Biochemistry. 42. 1898-1910
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. *Censos agrícolas 1980-2017*. Bases de datos en línea, consultadas en septiembre del 2017: www.infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos_a.php
- Sánchez-Marroquín A. (1979). *Los agaves de México en la industria alimentaria*. Mexico: CEESTEM, Centro de Estudios Economicos y Sociales del Tercer Mundo.
- Santana, O. (2018). *Octecomatl*. En “Un Don Divino. El Pulque”. Arqueología Mexicana. Esp 78: 43.
- Secretaría de Economía (1972). *NMX-V-022-1972 Aguamiel*. Dirección General de Normas, México.
- Secretaría de Economía (1972). *NMX-V-037-1972 Pulque Manejado a Granel*. Dirección General de Normas, México.
- Secretaría de Economía (2017). *NOM-199-SCFI-2017 Bebidas alcohólicas-denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba*. Dirección General de Normas, México.
- SEDESOL. Secretaria de Desarrollo Social. (2013). *Catálogo de localidades. Unidad de Microrregiones*. Consultado en diciembre del 2018: www.microrregiones.gob.mx/catloc/Default.aspx
- Segura, J. C. (1901). *El maguey: memoria sobre el cultivo y beneficio de sus productos*. México: Impr. particular de la S. agrícola mexicana.

- Sidana J., Bikram S., Om P. Sharma (2016). *Saponins of Agave: Chemistry and bioactivity*. Phytochemistry, Volume 130, Pages 22-46.
- Smith Jr. y C. E., (1967). *Plant remains*. En: Byers D. (Ed.). The prehistory of the Tehuacán Valley, Vol. 1: Environment and subsistence. University of Texas Pres, Austin. pp. 220–525.
- Soto-maní, M. (2018). *Mural de los bebedores, Cholula, Puebla*. En “Un Don Divino. El Pulque”. Arqueología Mexicana. Esp 78: 21.
- SUMA. Secretaría de Urbanismo y Medio Ambiente del Estado de Michoacán. (2009). *Programa de Ordenamiento Territorial de la Zona Metropolitana de Morelia. POTZMM*. Gobierno del Estado de Michoacán de Ocampo, México.
- Taylor, W. B. (1987). *Embriaguez, homicidio y rebelión en las poblaciones coloniales mexicanas*. Fondo de Cultura Económica. México.
- Toledo, V. M., Alarcón-Chaires, P., Moguel, P., Olivo, M., Cabrera, A., Leyequien, E., & Rodríguez-Aldabe, A. (2001). *El atlas Etnoecológico de México y Centroamérica: fundamentos, métodos y resultados*. Etnoecológica, 6 (8), 7-41.
- Torres, I., Blancas, J., León, A., & Casas, A. (2015). *TEK, local perceptions of risk, and diversity of management practices of Agave inaequidens in Michoacán, Mexico*. Journal of ethnobiology and ethnomedicine, 11(1), 1.
- Torres-Maravilla, E. Mayorga, L., Allain, T., Sokol, H., Langella, P., Sánchez-Pardo, M. & Bermúdez-Humarán, I. (2016). *Identification of novel anti-inflammatory probiotic strains isolated from pulque*. Applied microbiology and biotechnology.
- Tovar, L., Olivos, M., Gutierrez, M. (2008) *Pulque, an alcoholic drink from rural Mexico, contains phytase. Its in vitro effects on corn tortilla*. Plant Foods Hum Nutr 63(4):189–194.
- Valadez-Blanco, R., Bravo-Villa, G., Santos-Sánchez, N.F. (2012). *The Artisanal Production of Pulque, a Traditional Beverage of the Mexican Highlands*. Probiotics & Antimicro. Prot. 4: 140.
- Van de Guchte M, Penaud S, Grimaldi C, Barbe V, Bryson K. (2006). *The complete genome sequence of Lactobacillus bulgaricus reveals extensive and ongoing reductive evolution*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:9274–79.
- Velasco, B. (2013). *Pulque para dos. Identidad pulquera de tlachiqueros y colectividades pulqueras urbanas. Un estudio comparativo en el contexto globalizador*. México: Tesis de Licenciatura. ENAH.
- Willers C., Jansen van Rensburg P., Claassens S. (2015). *Phospholipid fatty acid profiling of microbial communities - a review of interpretations and recent applications*. J. Appl. Microbiol. 11.
- Zarazúa. M. (2016). *Del guajolote a las chicatanas. Uso, manejo y domesticación de recursos genéticos animales en Mesoamérica*. En Domesticación en el Continente Americano Vol. 1 Manejo de biodiversidad y evolución dirigida por las culturas del Nuevo Mundo. Perú.
- Zelles L. (1999). *Fatty acid pattern of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review*". Biology and Fertility of Soils 29.2: 111-129.
- Zhao, J.S., Zheng, J., Zhou, R.Q. and Shi, B. (2012) “*Microbial community structure of pit mud in a Chinese strong aromatic liquor fermentation pit*”. Jour. Inst. Brew. 118, 356–360.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Entrevista a productores

Universidad Nacional Autónoma de México - Posgrado en Ciencias Biológicas

Entrevistado:

Fecha:

Localidad:

Historia de vida

1. ¿Cómo empezó a dedicarse a esto del pulque... (descripción del contexto de la actividad pasado-presente)
2. ¿Cuántos productores de pulque hay en la zona? ¿y antes?
3. ¿Qué otras actividades realiza?

Manejo el recurso y del proceso productivo

-Maguey

4. ¿Qué tipo de maguey utiliza para hacer pulque? (Nombre común, características e identificación por foto)
5. ¿Cuántos magueyes tiene plantados?
6. ¿Cuántos magueyes tiene en producción?
7. ¿En qué lugar los tiene plantados? (magueyera propia/rentada, como lindero)
8. ¿Qué extensión tiene esa superficie?
9. ¿Los magueyes que utiliza para la elaboración del pulque son suyos o compra (precio y a quién)?
10. ¿Qué cuidados y técnicas requiere el cultivo y manejo de maguey pulquero?
-Siembra y propagación (forma y épocas)
-Fertilización, podas, deshierbes
-Tiempo de crecimiento, capado
-Plagas
11. ¿Usa el maguey para otra cosa?

-Aguamiel

12. ¿Cuántos litros da en un día un maguey?
13. ¿Cuánto tiempo dura un maguey dando aguamiel?
14. ¿Qué maguey da mejor aguamiel, por qué?
15. ¿En que época extrae el mejor aguamiel?
16. ¿Cuántos litros de aguamiel extrae al día? (unidad que ellos manejen)

-Pulque

17. ¿Cómo hace el pulque? (Cuidados-etapas-características-tiempos-ceremonias-herramientas)
18. ¿Qué características tiene su semilla?
19. ¿Qué cuidados requiere su semilla?
20. ¿Mantiene una semilla todo el año o prepara varias?
21. ¿Mezclan toda el aguamiel por igual?
22. ¿Qué aguamiel da mejor pulque, a qué sabe cada uno de los resultado?
23. ¿Cuánto pulque prepara al día?
24. ¿Cómo debe ser un buen pulque? (sabor, olor, cuerpo)
25. ¿Con el tiempo han cambiado sus variedades de maguey o sus prácticas de manejo o elaboración de pulque?

-Comercio

26. ¿Dónde y a quién vende el pulque?
27. ¿A cuánto lo vende (aguamiel y pulque)?
28. ¿Cómo le va en este negocio?
29. ¿Cómo era antes? (año, calidad, cantidad, demanda de consumidores)

Anexo 2. Protocolo para extracción de ácidos grasos totales

1. Saponificación. Durante esta etapa, se produce la lisis de las células. Los ácidos grasos son separados de los lípidos celulares y convertidos en sus correspondientes sales de sodio.

- Transferir un mililitro de la muestra a un tubo de ensaye.
- Agregar 2.0 +/- 0.1 ml del Reactivo # 1 (base metabólica compuesta por 45 g NaOH, 150 ml de metanol y 150ml de agua destilada desionizada) a cada tubo
- Cerrar cada tubo con un forro de teflón dentro del tapón de rosca .
- Agitar en el vortex cada tubo por 5-10 segundos.
- Colocar los tubos en baño maría 100°C .
- Después de 5 minutos sacar los tubos del baño María y enfriarlos ligeramente. Checar posibles fugas, y en caso de existir cambiar el tapón o ponerle otra capa de teflón.
- Agitar cada tubo en vortex y volver a ponerlos en baño maría por 25 minutos más.
- Después de un total de 30 minutos de saponificación en el baño María, sacar los tubos y colocarlos en agua fría.

2. Metilación. En el proceso de metilación las sales sódicas de los ácidos grasos se convierten en ésteres metílicos para incrementar la volatilidad de los ácidos grasos para el análisis por cromatografía de gases.

- Después de enfriar los tubos, destaparlos y agregar 4 ml +/- 0.1ml del Reactivo # 2 (reactivo de metilación 325 ml de 6N HCL en 275 ml de metanol).
- Cerrar cada tubo y agitar en el vórtex entre 5 a 10 segundos.
- Calentar en baño María los tubos a 80°C por 10 minutos.
- Sacar del baño María y enfriar en agua fría rápidamente.

3. Extracción. En la extracción los Ésteres metílicos se transfieren de la fase acuosa ácida a la fase orgánica con la técnica de extracción líquida-líquida.

- Destapar cada tubo y agregar 2.5 ml del Reactivo # 3 (1:1 v/v hexano:éter metil terbutílico).
- Agregar a cada tubo 100 microlitros de 19:0 como estándar interno.
- Cerrar los tubos y rotarlos durante 10 minutos.
- Centrifugar los tubos por 3 minutos a 2000 RPM.
- Destapar cada tubo. Usando una pipeta para cada muestra, remover el sobrenadante a un tubo nuevo.

4. Lavado básico. En esta etapa se eliminan los ácidos grasos libres y los agentes residuales.

- Agregar a cada tubo 6 ml del Reactivo #4 (Solución básica de NaOH diluido en agua destilada desionizada).
- Cerrar cada tubo y rotarlos por 5 minutos.
- Centrifugar los tubos por 3 minutos a 2000 RPM.
- Remover el sobrenadante y colocarlo en frascos viales.
- Evaporar bajo nitrógeno.
- Agregar a frascos nuevos GC viales 200 microlitros de hexano y colocar en cada uno de ellos “baby” vial dentro de ellos.
- Disolver cada una de las muestras con 80 microlitros y agitar en vortex.
- Agregar 80 microlitros de cada muestra a un “baby” vial.
- Agregar a los frascos viales 200 microlitros de hexano y colocar en cada uno de ellos el “baby” vial que se corresponde. Cerrar con su respectiva tapa.
- La muestra ahora está lista para el cromatógrafo de gases.

Anexo 3. Protocolos para determinación de características físicas y químicas

Determinación de acidez de una sustancia por método de titulación

En este método un volumen conocido de la muestra, se titula con una solución alcalina o básica de hidróxido de sodio de concentración determinada y con ayuda de un indicador (fenolftaleína) se obtiene el punto final de la titulación. La prueba de titulación expresa a cantidad de hidróxido de sodio que es necesario agregar a la sustancia para variar su grado de acidez en el cual cambia el color de la fenolftaleína.

1. Materiales: A) Pipeta de 10 ml, B) Bureta de 25 ml, C) Vasos de precipitados

2. Sustancias

A) Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N.

Para preparar la solución de hidróxido de sodio se procede así:

- a. Pesar 4 gr de NaOH, reactivo puro (en perlas)
- b. Colocarlos en un recipiente limpio y seco.
- c. Agregar agua destilada para disolverlo hasta completar un litro es decir 1000 c.c.

B) Solución neutra de fenolftaleína al 2% (m/v) en etanol al 70% (v/v).

La fenolftaleína es un polvo cristalino, de color amarillo pálido, Se disuelve en alcohol y éter. Es insoluble en agua, incolora en solución neutra o ácida, se vuelve violeta en solución alcalina.

a. La solución de etanol al 70% (v/v) se prepara así: Medir con una pipeta 73 ml de etanol → Medir 27 ml de agua destilada → Mezclar perfectamente los dos líquidos.

b. La solución de fenolftaleína al 2 % (m/v) en etanol al 70 % (v/v) se prepara así: Pesar 2 gr. de fenolftaleína → Colocarlos en un recipiente limpio y seco → Agregar etanol al 70% (v/v) para disolverla hasta completar 100 ml.

3. Procedimiento

A. Tomar la bureta limpia y purgarla (enjuagarla perfectamente con la solución de NaOH).

B. Llenar la bureta hasta la marca cero, con solución de hidróxido de sodio.

C. Apoyar la bureta en un soporte.

D. Colocar 10 ml de la muestra de la muestra en un vaso de precipitados.

E. Agregar a la muestra 4 gotas de fenolftaleína (siempre use la misma cantidad) y agitar.

F. Abrir la llave de la bureta y agregar gota a gota solución de NaOH hasta que aparezca en la sustancia un color rosa pálido que permanezca por unos 30 segundos.

G. Leer en la bureta la cantidad de hidróxido de sodio gastado para neutralizar la sustancia y con este dato encontrar la acidez total de la muestra. Esta se calcula con la siguiente formula:

$$A.T. = \frac{V \times N \times 0.09 \times 100}{M}$$

En donde:

A.T. =Acidez total de la sustancia expresada en gramos de ácido láctico por 100 ml de muestra

V= Mililitros de hidróxido de sodio utilizados en la titulación

N=Normalidad de la solución de hidróxido de sodio

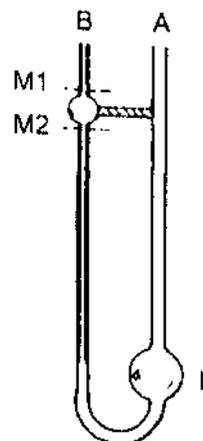
M= Mililitros de muestra empleados en la determinación

0.09= Miliequivalente del ácido láctico

Determinación de la viscosidad de una sustancia

1. Materiales

- Termómetro
- Picnómetro
- Viscosímetro de Ostwald
- Cronometro
- Soporte universal
- Propipeta
- Agua destilada
- Líquido problema



2. Medición de densidad

Pesar el picnómetro limpio y seco, anotar el resultado. Agregar el líquido problema. Con el valor de la masa del líquido y el volumen del picnómetro calcular la densidad: $d = m / v$

3. Medición de viscosidad

El viscosímetro debe estar limpio y seco para comenzar a trabajar. Se coloca suficiente líquido en el viscosímetro, hasta que llene el compartimento inferior (L), esto se hace a través del capilar A. Con una propipeta se asciende el líquido por el tubo B, hasta que sobrepase la marca M1. Se deja caer el líquido y se toma el tiempo en que recorre el tramo entre las marcas M1 y M2. El procedimiento se repite tres veces y se calcula el promedio del tiempo.

Finalmente para obtener la viscosidad del líquido problema, se usa la siguiente ecuación: $n_1: d_1 t_1 n_2 / d_2 t_2$ Donde n_1 y n_2 son las viscosidades del líquido problema y el líquido de referencia (agua), t_1 y t_2 , los tiempos que tardar en fluir y d_1 y d_2 las densidades.

Es importante tomar la temperatura a la cual se hacen las mediciones, ya que tanto densidad como viscosidad dependen de la temperatura

Determinación del porcentaje de alcohol (Kit de destilación)



1. Manta calefactora
2. Matraz de destilación de 500 ml
3. Refrigerante Graham (serpentín)
4. Mangueras para refrigerante
5. Vaso de precipitados de 200 ml
6. Conectores correspondientes
7. Adaptador para termómetro
8. Termómetro
9. Perlas de ebullición

Figura 34. Kit de destilación.

Anexo 4. Tablas de datos

Tabla 11. FA (promedio \pm ES nanomoles/mL) reportados para cada tratamiento (fase-sitio), año 2017.

2017	Aguamiel SU	Aguamiel T	Hervido SU	Pulque SU	Pulque T	Semilla SU	Semilla T
14:00	0.96 \pm 0.16	2.61 \pm 0.63	0.75 \pm 0.39	2.53 \pm 0.80	2.47 \pm 0.82	4.22 \pm 0.84	6.92 \pm 3.04
16:00	11.58 \pm 3.83	18.98 \pm 4.73	11.74 \pm 4.54	29.43 \pm 6.47	17.99 \pm 2.09	51.91 \pm 7.74	71.12 \pm 20.34
18:00	1.21 \pm 0.33	2.97 \pm 0.08	1.01 \pm 0.23	9.37 \pm 2.81	5.53 \pm 0.86	15.35 \pm 2.73	19 \pm 5.50
12:0 iso	Nd	Nd	Nd	0.30 \pm 0.30	0.29 \pm 0.21	Nd	Nd
17:1 iso I	Nd	1.23 \pm 0.62	Nd	Nd	Nd	1.15 \pm 0.62	2.40 \pm 0.74
17:0 iso 3OH	1.48 \pm 0.15	1.49 \pm 0.05	1.47 \pm 0.1	1.39 \pm 0.042	1.35 \pm 0.50	1.47 \pm 0.11	1.42 \pm 0.05
17:1 iso w5c	0.98 \pm 0.29	Nd	0.57 \pm 0.28	0.60 \pm 0.297	0.24 \pm 0.24	Nd	Nd
17:0 cyclo	Nd	0.18 \pm 0.09	0.11 \pm 0.11	Nd	Nd	Nd	0.23 \pm 0.23
19:0 cyclo w8c	6.49 \pm 2.82	7.66 \pm 2.64	8.07 \pm 4.02	5.97 \pm 0.32	3.32 \pm 0.90	5.94 \pm 0.72	5.83 \pm 2.2
16:1 w7c	2.07 \pm 0.55	7.923 \pm 2.27	2.06 \pm 0.59	37.22 \pm 1.19	25.19 \pm 5.76	117.55 \pm 39.05	169.72 \pm 67.03
18:1 w7c	9.53 \pm 3.09	10.04 \pm 3.43	7.89 \pm 3.66	8.21 \pm 1.37	7.17 \pm 3.19	14.01 \pm 4.16	16.29 \pm 7.68
18:1 w7c 11-methyl	0.24 \pm 0.24	0.313 \pm 0.16	0.32 \pm 0.32	Nd	Nd	Nd	Nd
19:0 10-methyl	Nd	0.53 \pm 0.28	Nd	Nd	Nd	Nd	0.16 \pm 0.16
16:1 w5c	Nd	Nd	Nd	0.63 \pm 0.38	0.33 \pm 0.17	2.23 \pm 0.53	3.30 \pm 1.61
18:1 w9c	1.72 \pm 0.69	5.17 \pm 0.53	1.616 \pm 0.32	24.80 \pm 12.08	7.87 \pm 2.09	40.17 \pm 11.73	36.58 \pm 12.48
18:2 w6,9c	3.12 \pm 1.53	3.40 \pm 1.71	2.374 \pm 0.29	3.1 \pm 1.38	1.37 \pm 0.69	3.42 \pm 1.63	5.13 \pm 1.93
18:3 w6c (6,9,12)	0.64 \pm 0.07	0.36 \pm 0.18	0.171 \pm 0.17	Nd	0.60 \pm 0.06	Nd	0.37 \pm 0.19

Tabla 11. Continuación, año 2018.

2018	Aguamiel SU	Aguamiel T	Hervido SU	Pulque SU	Pulque T	Semilla SU	Semilla T
<i>14:00</i>	Nd	9.13 ± 3.14	1.07 ± 0.53	10.47 ± 1.23	5.98 ± 3.01	41.18 ± 2.78	84.75 ± 30.98
<i>16:00</i>	17.63 ± 14.04	67.1 ± 6.78	31.4 ± 11.2	123.66 ± 22.58	67.4 ± 29.63	851.2 ± 81.68	1020.81 ± 39.16
<i>18:00</i>	2.01 ± 1.23	8.97 ± 1.96	5.86 ± 2.12	24.53 ± 4.60	15.82 ± 6.69	138.8 ± 9.88	178.62 ± 66.16
<i>17:0 anteiso</i>	2.24 ± 0	Nd	1.55 ± 0.77	0.99 ± 0	0.99 ± 0.80	Nd	Nd
<i>17:1 iso i</i>	Nd	4.55 ± 0.10	0.64 ± 0.64	Nd	1.27 ± 1.04	23.68 ± 5.14	29.96±6.804
<i>17:0 cyclo</i>	Nd	Nd	Nd	0.59 ± 0.59	Nd	2.76 ± 1.67	4.2 ± 2.51
<i>19:0 cyclo w8c</i>	25.97 ± 23.85	30.53 ± 13.18	25.93 ± 10.77	33.4 ± 9.19	12.03 ± 3.42	48.47 ± 5.4	39.99 ± 9.66
<i>16:1 w7c</i>	2.35 ± 2.345	31.14 ± 13.03	14.92 ± 10.23	181.77 ± 44.24	108.03 ± 66.75	2480.45 ± 404.04	3388.57 ± 149.22
<i>18:1 w7c</i>	10.99 ± 6.81	49.23 ± 27.50	19.07 ± 1.32	47.67±12.06	21.82 ± 9.91	147.96 ± 35.59	129.71 ± 18.7
<i>18:1 w7c 11-methyl</i>	0.89 ± 0.89	nd	0.48 ± 0.48	Nd	Nd	Nd	Nd
<i>19:0 10-methyl</i>	Nd	2.45 ± 1.26	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
<i>16:1 w5c</i>	Nd	1.31 ± 0.76	2.24 ± 1.27	4.07 ± 0.65	2.04 ± 1.33	36.23 ± 7.99	52.76 ± 8.98
<i>18:1 w9c</i>	4.08 ± 0.94	16.09 ± 4.03	21.37 ± 9.05	59.69 ± 18.28	30.44 ± 12.1	496.37 ± 169.63	583.65 ± 91.94
<i>18:2 w6,9c</i>	5.66 ± 1.96	8.89 ± 3.29	10.66 ± 3.97	15.73 ± 2.46	11.51 ± 8.07	73.81 ± 34.49	77.073 ± 18.7

Tabla 12. FA (promedio ± ES nanomoles/mL) asociados a grupos de microorganismos para cada tratamiento (fase-sitio), año 2017.

2017	Aguamiel SU	Aguamiel T	Hervido SU	Pulque SU	Pulque T	Semilla SU	Semilla T
<i>Gram-positivas</i>	2.45 ± 0.44	2.73 ± 0.66	2.04 ± 0.19	1.93 ± 0.32	2.23 ± 0.14	2.62 ± 0.6	3.82 ± 0.7
<i>Gram-negativas</i>	6.49 ± 2.82	7.83 ± 2.72	8.18 ± 4.13	5.97 ± 0.38	3.32 ± 0.9	5.94 ± 0.72	6.06 ± 2.42
<i>Actinobacterias</i>	0.24 ± 0.24	0.84 ± 0.43	0.32 ± 0.32	nd	Nd	Nd	0.16 ± 0.16
<i>HMA/Gram-neg</i>	nd	nd	nd	0.63 ± 0.38	0.33 ± 0.17	2.23 ± 0.53	3.3 ± 1.61
<i>Levaduras</i>	1.72 ± 0.69	5.17 ± 0.53	1.62 ± 0.32	24.8 ± 12.08	7.87 ± 2.09	40.17 ± 11.73	36.58 ± 12.48
<i>Hongos</i>	3.76 ± 1.58	3.76 ± 1.89	2.54 ± 0.46	3.1 ± 1.38	1.97 ± 0.64	3.42 ± 1.63	5.5 ± 1.81
<i>Estrés ambiental</i>	11.6 ± 3.58	17.97 ± 2.02	9.95 ± 4.16	45.43 ± 1.71	32.36 ± 4.33	131.56 ± 43.15	186.01 ± 67.03

Tabla 12. Continuación, año 2018.

2018	Aguamiel SU	Aguamiel T	Hervido SU	Pulque SU	Pulque T	Semilla SU	Semilla T
<i>Gram-positivas</i>	2.24 ± 0	4.55 ± 0.1	2.19 ± 1.23	0.99 ± 0	2.25 ± 0.23	23.68 ± 5.14	29.96 ± 6.80
<i>Gram-negativas</i>	25.97 ± 23.85	30.53 ± 13.18	25.93 ± 10.77	33.99 ± 9.73	12.03 ± 3.42	51.24 ± 7.07	44.2 ± 11.09
<i>Actinobacterias</i>	0.89 ± 0.89	2.45 ± 1.26	0.48 ± 0.48	nd	nd	nd	nd
<i>HMA/Gram-neg</i>	nd	1.31 ± 0.72	2.24 ± 1.27	4.07 ± 0.65	2.04 ± 1.33	36.23 ± 7.99	52.76 ± 8.98
<i>Levaduras</i>	4.08 ± 0.94	16.09 ± 4.03	21.37 ± 9.05	59.69 ± 18.28	30.44 ± 12.1	496.37 ± 169.63	583.65 ± 91.94
<i>Hongos</i>	5.67 ± 1.96	8.89 ± 3.29	10.66 ± 3.97	15.73 ± 2.46	11.51 ± 8.07	73.81 ± 34.49	77.07 ± 18.7
<i>Estrés ambiental</i>	13.34 ± 9.01	80.37 ± 20.58	33.94 ± 10.81	229.44 ± 48.54	129.85 ± 68.16	2628.41 ± 436.22	3518.28 ± 167.92

Tabla 13. Porcentajes de FA (promedio ± ES) de los grupos de microorganismos presentes en los tratamiento (fase-sitio). Las letras indican las diferencias estadísticas por el método de Tukey.

Grupo	Aguamiel SU	Aguamiel T	Hervido SU	Pulque SU	Pulque T	Semilla SU	Semilla T
<i>Gram-positivas</i>	5.74 ± 2.19 (a)	2.65 ± 0.71 (a)	5.07 ± 1.84 (a)	0.8 ± 0.37 (a)	2 ± 0.59 (a)	0.75 ± 0.12 (a)	0.88 ± 0.21 (a)
<i>Gram-negativas</i>	17.6 ± 5.83 (ab)	12.36 ± 2.82 (abc)	21.19 ± 4.14 (a)	6.67 ± 1.53 (b)	5.56 ± 0.90 (b)	2.6 ± 0.34 (b)	2.19 ± 0.32 (b)
<i>Actinobacterias</i>	0.47 ± 0.30 (ab)	1.05 ± 0.35 (a)	0.36 ± 0.25 (ab)	Nd	Nd	Nd	0.02 ± 0.02 (b)
<i>Levaduras</i>	8.81 ± 3.89 (a)	7.86 ± 1.17 (a)	9.55 ± 3.18 (a)	14.2 ± 2.76 (a)	11.78 ± 2.27 (a)	13.46 ± 3.13 (a)	10.41 ± 0.91 (a)
<i>Hongos</i>	12.62 ± 4.16 (a)	4.29 ± 1.27 (b)	7.81 ± 1.38 (ab)	2.69 ± 0.48 (b)	2.71 ± 0.79 (b)	1.54 ± 0.47 (b)	1.44 ± 0.19 (b)
<i>Estrés</i>	23.78 ± 5.60 (a)	32.11 ± 4.64 (ab)	25.21 ± 1.46 (ab)	40.81 ± 4.06 (abc)	42.29 ± 1.76 (bc)	53.07 ± 6.02 (c)	56.2 ± 2.83 (c)