



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD LEÓN**

**Análisis de la diversidad y estructura de comunidades
microbianas involucradas en el proceso de fermentación
del mezcal en México.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Licenciado en Ciencias Agrogenómicas**

P R E S E N T A:

Aarón Espinosa Jaime

TUTOR 1:

Dr. Antonio Hernández López

TUTOR 2:

Dra. Luciana Raggi Hoyos



León, Guanajuato

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Índice general

ÍNDICE GENERAL	2
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
AGAVES Y MEZCALES	6
EL MICROBIOMA EN LA FERMENTACIÓN MEZCALERA	7
DINÁMICA DE LA COMUNIDAD MICROBIANA DURANTE LA FERMENTACIÓN	9
ESTUDIO DE LOS MICROBIOMAS	10
<i>Antecedentes</i>	10
<i>Metabarcoding 16s rRNA e ITS</i>	11
<i>Identificación taxonómica usando metabarcoding.</i>	13
<i>Software QIIME2</i>	13
JUSTIFICACIÓN	14
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO	14
OBJETIVOS PARTICULARES	15
MATERIALES Y MÉTODOS	15
COLECTA DE MUESTRAS Y ALMACENAMIENTO	15
PROCESAMIENTO DEL MOSTO DE AGAVE	15
PCR Y SECUENCIACIÓN	17
PROCESAMIENTO	17
ANÁLISIS USANDO QIIME2	17
RESULTADOS	20
DIVERSIDAD Y COMPOSICIÓN BACTERIANA	20
<i>Diversidades alfa y beta</i>	22
DIVERSIDAD Y COMPOSICIÓN FÚNGICA	26
<i>Diversidades alfa y beta</i>	26
DISCUSIÓN	30
COMPOSICIÓN BACTERIANA DURANTE LA FERMENTACIÓN DEL AGAVE	35
INFLUENCIA DE LA REGIÓN GEOGRÁFICA (ESTADO) EN LA ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD BACTERIANA.	37

COMPOSICIÓN FÚNGICA DURANTE LA FERMENTACIÓN DEL MEZCAL-----	38
CONCLUSIÓN-----	41
BIBLIOGRAFÍA -----	42

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi mamá por ser siempre mi apoyo y mi motivación para hacer lo que me gusta. Gracias por darme esta oportunidad y por siempre, siempre creer en mí. Te amo. La distancia no es el fin <3.

Agradezco también a mi familia que siempre estuvieron al pendiente, apoyándome, incluso llorando conmigo cuando más lo necesitaba. Los adoro muchísimo: abues, Cris, Maggie y todas mis tías.

Agradezco a la ENES León de existir y brindarme la oportunidad de formarme en sus aulas y laboratorios. Siempre estaré agradecido por esa educación de calidad que me ofrecieron. A mis asesores de tesis por su mentoría y apoyo durante la realización de mi proyecto.

También agradezco a los profesores de C. Agrogenómicas por su esfuerzo y dedicación a la educación, especialmente a la Dra. Harumi y la Dra. Ale Rougon. Espero que guarden en ustedes ese lado humano que siempre hace falta en un mentor. A la Dra. Kalpana y al Dr. Manoj por abrirme las puertas de su grupo de trabajo y brindarme una excelente primera experiencia de cómo hacer ciencia.

Además de lo académico, a la ENES le debo las valiosas amistades que espero conservar durante mucho tiempo. La vida universitaria fue mucho más colorida y divertida con ustedes, amigos a los que adoro muchísimo: Abel, Vane, María, Andrés, Javi, Karen, Gema, Citlali, Itzel y Toledo. A mi pequeño pero valiosísimo equipo de volibol con quien me sentía arropado y como en casa, especialmente a Joel y Carranza <3. A mis amigos pandémicos que fueron mi grupo de apoyo en la solitaria vida en Tepes durante la COVID19, en especial a Emi y a la Bendi. Los llevo siempre bien cerquita del corazón.

Agradezco al grupo de Carpentries Mx por ser un pilar en mi formación, incluso especialización académica, por esa amistad tan sincera que me ofrecen y por ser siempre unos maestros para mí: Nelly, Abraham, Clau y Diego.

Por último, quiero agradecer a DGAPA por el financiamiento del proyecto PAPIIT IN230420 sin el cual no hubiera sido posible este trabajo.

Resumen

En México, la producción de destilado de agave es uno de los procesos más ancestrales que involucran microorganismos. Estos destilados resultan de la piña de agave de más de 20 especies diferentes. La producción de estos destilados ocurre en varias regiones del país, en la mayoría se lleva a cabo de manera artesanal y su fermentación se considera espontánea con microorganismos nativos. El estudio de la fermentación microbiana ayuda a entender los procesos de producción con el potencial de mejorar la calidad del producto final. Dicho lo anterior, el objetivo de este trabajo es explorar la diversidad, estructura y las principales determinantes de la comunidad microbiana a lo largo de las regiones mezcaleras en México haciendo uso de técnicas metagenéticas. Utilizamos marcadores moleculares específicos para la identificación de hongos y bacterias: la región del ITS (en inglés para Internal Transcribed Spacer) para hongos y la región del 16S rRNA para bacterias. Estos amplicones fueron secuenciados masivamente y su análisis reveló un gran número de microorganismos participantes y permitió explorar la diversidad microbiana que interactúa durante la fermentación para el proceso de producción de destilados de agave. Se obtuvieron 1290 ASVs (Variante de secuencia de amplicón) únicos distribuidos en 16 principales géneros bacterianos y 609 ASVs únicos distribuidos en 10 principales géneros fúngicos. El género *Lactobacillus* fue el dominante en las bacterias, seguido de *Oenococcus*, una bacteria productora de etanol. Los géneros fúngicos más abundantes a lo largo del proceso fueron *Pichia* y *Saccharomyces*. Un núcleo de 7 géneros bacterianos fue catalogado como compartido a lo largo de las distintas regiones productoras (*Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Gluconobacter*, *Leuconostoc*, *Acetobacter*, *Komagataeibacter*), mientras que, para hongos, 3 géneros fueron observados como núcleo (*Saccharomyces*, *Pichia* y *Kluyveromyces*). Los índices de diversidad de Shannon y Simpson indican que hay mayor riqueza y heterogeneidad en las comunidades bacterianas. Se propone que los principales factores que guían la diversidad y estructura de la comunidad son la región geográfica y la especie de agave.

Introducción

Agaves y mezcales

El género *Agave* es miembro de la subfamilia Agavoideae dentro de la familia de plantas Asparagaceae, (Grupo para la filogenia de angiospermas (APG), 2009). La distribución natural del agave se extiende desde Estados Unidos pasando por México, Centro América, Islas del Caribe, y Sudamérica hasta llegar a Paraguay (García-Mendoza, 1998). El género *Agave* se compone de alrededor de 206 especies; México tiene la mayor diversidad de especies (159, de las cuales 119 son endémicas) y es considerado su centro de origen (Gentry, 1982; García-Mendoza and Chávez-Rendón, 2013). Los agaves son elementos muy importantes en los ecosistemas xerófilos, semiáridos y áridos, representando recursos alimenticios para una gran cantidad de organismos. Por ejemplo, las flores de especies de agave también son parte de la dieta de murciélagos del género *Leptonycteris* que migran largas distancias en México y el desierto de Sonora (Howell and Roth, 1981; Rojas-Martínez et al., 1999).

La importancia cultural de los agaves en México y Estados Unidos es enorme desde la época prehispánica y hasta el día de hoy. Más de 70 usos tradicionales conocidos han sido documentados para las especies de este género (García-Mendoza, 1998). Además, los agaves demuestran ser una fuente potencial como cultivos bioenergéticos y como fuentes de compuestos bioactivos para tratar el cáncer, antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos, prebióticos y con actividad antiinflamatoria (Barreto et al., 2010; Escamilla-Treviño, 2012; Simpson et al., 2011; Santos-Zea et al., 2012; Hernández-Valdepeña et al., 2016).

De especial importancia son las bebidas fermentadas como el pulque, que se consumen en México de manera ancestral desde la época prehispánica. También pueden mencionarse el tequila y el mezcal, producidos del agave y que conllevan un proceso de fermentación. A pesar de que se sugiere (Serra y Lazcano, 2012) que los procesos de destilación en Mesoamérica se llevaban a cabo desde antes del mestizaje, esto sigue como una hipótesis controversial. Por último, se tiene registro de la producción de mezcal en 26 de los 32 estados del país (Colunga-García et al., 2008).

El mezcal hoy en día es una bebida que ha ganado popularidad y se ha convertido en un foco de atención para los productores con ganancias que rondan de los 60 a 800 pesos por litro dependiendo de la temporada del año, marca, especie de agave y país donde se compre. Se creía que el sabor del mezcal

era siempre el mismo, hasta que el estudio presentado por De León-Rodríguez et al., (2006), comprobó lo contrario. El autor propuso que los compuestos orgánicos y la cantidad de cada uno de ellos moldeaba el sabor del mezcal de manera casi única. En un trabajo similar, Verdugo (2011) propuso que el sabor y aroma del mezcal provienen del tipo de compuestos producidos en el agave durante el proceso de fermentación.

El microbioma en la fermentación mezcalera

Durante mucho tiempo se consideró a *Saccharomyces* como el principal y único organismo involucrado de manera favorable en la fermentación, esencialmente, del vino. Todas aquellas levaduras que no fueran *S. cerevisiae* eran consideradas como responsables de deteriorar el vino (Cray et al., 2013). Al desconocer esta dinámica microbiana de manera específica, se tomaba el papel de estas levaduras como un impacto negativo en el producto al añadirle compuestos como ácido acético, etilacetato y acetaldehído (Romano et al., 2003).

Hoy se sabe que la presencia de ciertas especies de microorganismos durante el proceso de fermentación es intermitente, usualmente las especies no-*Saccharomyces* aparecen en las primeras etapas de la fermentación junto con algunas bacterias (Cuvas-Limón et al., 2020). Este consorcio de microorganismos incluye especies de levaduras y bacterias. La proporción de cada uno depende, en el caso del vino, del grado de madurez de la uva y la disponibilidad de nutrientes. Las uvas son susceptibles a infecciones fúngicas hasta el envero después del cual la microbiota de las uvas intactas es similar al de las hojas de la vid, dominada por levaduras basidiomicetos y hongos parecidos a levadura (Barata et al., 2012).

Una de las diferencias más importantes entre las especies *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* es su habilidad diferencial de producir varias enzimas extracelulares envueltas en la hidrólisis de componentes estructurales (Capozzi y Spano, 2015). Generalmente las cepas de *S. cerevisiae* tienen poca capacidad de producir estas enzimas (Capece et al., 2012) en comparación con las levaduras no-*Saccharomyces* (Maturano et al., 2012).

Estudios más recientes se han enfocado en la identificación de los metabolitos producidos por las levaduras no-*Saccharomyces* que posiblemente tengan un rol contra el deterioro del producto (Masih et al., 2001; Weiler & Schmitt, 2003; Comitini et al., 2004; Ciani & Comitini, 2011). Varios trabajos con otras bebidas que involucran un proceso similar de fermentación demostraron que varias especies de

levaduras no-*Saccharomyces* eran predominantes al inicio de la fermentación espontánea (Fleet, 2003). Y al contrario de esto, *S. cerevisiae* permanece a lo largo del proceso hasta que no soporta la cantidad de etanol en el medio (Cuvas-Limón et al., 2020).

En relación con lo anterior, Jolly et al., (2014) proponen que este grupo de levaduras no-*Saccharomyces* son las que dan el aroma y característico sabor al mezcal al añadir productos metabólicos secundarios como terpenoides, ésteres, alcoholes superiores, glicerol y ácido succínico. Incluso hay estudios que ponen a prueba la hipótesis de que las especies no-*Saccharomyces* promueven el crecimiento y actividad bacteriana, mientras que *Saccharomyces* provee la producción alcohólica (Zhre y Erten, 2002, y Clemente Jiménez et al., 2004). Estudios demuestran que especies pertenecientes al género *Candida*, *Pichia* y *Kluyveromyces* producen poligalacturonasa, mientras que la pectina metilesterasa es producida por *Candida*, *Debaryomyces* y *Pichia* (Fernández et al., 2000, Masoud and Jespersen, 2006). Ambas enzimas son importantes en la degradación celular, permitiendo la descomposición del tejido vegetal en el proceso de fermentación. Jolly et al., (2014) también mencionan que, en las fases iniciales de la fermentación, las levaduras no-*Saccharomyces* agotan los nutrientes en el medio, pero producen otros metabolitos que podrían estimular el crecimiento de las bacterias ácido-lácticas. Al mismo tiempo, las bacterias juegan un rol fundamental en evitar la pudrición del fermento al disminuir el pH. De esta manera se previene el crecimiento de otros microorganismos como bacterias toxigénicas (Wood and Holzapfel 1995).

Existen grupos de bacterias reconocidos como responsables de la fermentación: lácticas o también conocidas como LAB (Lactic Acid Bacteria, por sus siglas en inglés) y aquellas responsables de producir ácido acético, llamadas AAB (Acid Acetic Bacteria, por sus siglas en inglés). En alimentos fermentados y espontáneamente fermentados el grupo de microorganismos que más se aísla son las bacterias LAB (Cuvas-Limón et al., 2020). Las bacterias LAB son una parte esencial en los procesos de fermentación gracias a sus características fisiológicas como la utilización de sustrato, capacidades metabólicas y sus propiedades funcionales (Ramos and Schwan 2017). Estas bacterias modifican el contenido de carbohidratos en los alimentos, disminuyen el pH produciendo ácidos orgánicos, sintetizan aminoácidos, mejoran la disponibilidad de vitaminas tipo B, degradan antinutrientes y aumentan la cantidad de minerales como hierro, zinc y calcio (Blandino et al., 2003). Por otro lado, las bacterias AAB son clasificadas en la familia de *Acetobacteraceae* y sus géneros más importantes para la fermentación son *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconoacetobacter* y *Komagataeibacter* (Giudici, De Vero, and Gullo 2017). Estas bacterias se caracterizan por su habilidad para oxidar carbohidratos y

alcoholes a sus correspondientes ácidos orgánicos, aldehídos o cetonas en un proceso designado como “fermentación oxidativa”, el cual es una fuente de energía para la célula (Cuvás-Limón et al., 2020).

En estos productos fermentados, el tipo de productos secundarios obtenidos, así como el desarrollo de la textura, sabores y olores depende del sustrato y las especies involucradas. El sustrato debe ser rico en disacáridos y los minerales necesarios para activar el metabolismo microbiano. Al mismo tiempo, no debe contener inhibidores como toxinas que disminuyan el crecimiento de estos microorganismos. Es cierto que las condiciones medioambientales influyen al proceso de fermentación, pero los alimentos tradicionalmente fermentados no son procesos estandarizados, lo que significa que estas condiciones no son siempre las mismas (Cuvás-Limón et al., 2020).

De igual modo, se han hecho pruebas en vinos con inóculos específicos para tratar de obtener propiedades particulares en el producto final. Incluso se ha planteado incluir organismos genéticamente modificados (GMOs) en el proceso de fermentación (Jolly et al., 2014). En este último trabajo se discute el uso de la ingeniería genética en los principales actores de la fermentación, siguiendo con la línea de producir un mezcal con propiedades específicas. Sin embargo, el desarrollo de estos alimentos y bebidas se ve afectado por la baja aceptación del consumidor y de la restrictiva legislación internacional (Nieto-Sarabia et al., 2022., Eldarov et al., 2020., Gorter de Vries et al., 2019). De la misma manera, la demanda de productos fermentados y alcohólicos ha moldeado la investigación para el desarrollo de nuevas estrategias que generen destilados con bajo contenido de etanol (Kutyna et al., 2010).

En relación con lo anterior, las actividades metabólicas y ecológicas de los microorganismos son importantes a tal grado que determinan el aroma y sabor del mezcal. Es esencial comprender estos procesos para entender la función de los microorganismos y sus comunidades. Los sistemas celulares de una cantidad ínfima de especies han sido intensivamente caracterizados a niveles bioquímico, celular, genómico y de biología de sistemas; otra cantidad sustancial de estudios de ecología microbiana han sido publicados con relación a las interacciones de las especies, sucesión de la comunidad y metagenómica ambiental (Cray et al., 2013).

Dinámica de la comunidad durante la fermentación

A pesar de que puede haber cientos de especies presentes en el inicio de la fermentación, la comunidad puede evolucionar hasta verse dominada por unas pocas especies (Randazzo et al., 2010; Cabrol et al., 2012). Estudios en la fermentación del queso crotonés pecorino revelan que, aun cuando

el cuajo contiene más de 300 cepas bacterianas, la comunidad queda dominada, eventualmente por *Lactobacillus rhamnosus* (Randazzo et al., 2010). En vino, las especies no-*Saccharomyces* comienzan dominando el proceso de fermentación, pero son reemplazadas rápidamente por *S. cerevisiae*, que guía la fermentación y la producción alcohólica hasta el final (Fleet, 2003).

El origen de esta dinámica a lo largo de la fermentación está bien documentado al menos para *S. cerevisiae*, pues cuenta con todo un sistema regulatorio que permite la coordinación de un conjunto de respuestas a estrés en una manera en la que se optimiza el uso de la energía (Cray et al., 2013). Numerosos estudios demuestran que *S. cerevisiae* responde a estrés osmótico, oxidativo y el funcionamiento de las proteínas y la estabilidad de la membrana es altamente eficiente (Szopinska and Morsomme, 2010). Además de estas respuestas a estrés, existe evidencia de que la dinámica del metabolismo de polifosfato y glucógeno en *S. cerevisiae* están conectados de tal forma que se potencia la producción de ATP (Castrol et al., 1999) y que los niveles de poliploidía en muchas cepas aumentan la tolerancia al estrés oxidativo y otros estreses. Las estrategias de conservación y generación de energía en *S. cerevisiae* se presentan paralelamente en otras especies como *Bacillus subtilis*, sugiriendo que estos genes asociados con la generación de energía son altamente expresados (Karlín et al., 2001). La eficiencia de energía mejorada aparente en algunas especies no sólo apunta a su robustez como sistema biológico, sino que también es requerido para permanecer con este fenotipo de vigor de crecimiento y ejercer más presión a sus competidores (Cray et al., 2013).

Estudio de los microbiomas

Antecedentes

La identificación y aislamiento de los microorganismos involucrados en el proceso de fermentación de agave comenzó con Lachance (1995). Lachance utilizó técnicas de microbiología que lograban cultivar apenas una decena de microorganismos, además de enfrentarse a problemas de cultivo en algunas especies. Con el tiempo se implementó la técnica de Gradiente de Gel de Electroforesis Desnaturalizado acoplado a la Reacción en Cadena de Polimerasa o PCR-DGGE (Verdugo, 2011). El PCR-DGGE es un método electroforético capaz de detectar diferencias mínimas de tamaño en los fragmentos de DNA. Esto se debe a un gradiente de desnaturalización en un gel de acrilamida. Si bien sigue siendo utilizada, la cantidad de microorganismos que logra detectar es muy baja debido a la limitante en tamaño de las regiones que logra capturar (Desgarenes, 2014; Aldrete, 2020). Por lo anterior y debido al uso extensivo de las tecnologías de secuenciación, el PCR-DGGE va quedando en

desuso (Walker, 2017 p. 151) y han surgido estrategias más puntuales como la amplificación y secuenciación masiva del gen 16S ribosomal y sus distintas regiones hipervariables.

Metabarcoding 16s rRNA e ITS

Los análisis de diversidad en organismos unicelulares utilizan ampliamente al metabarcoding como herramienta para capturar la diversidad dentro de una muestra haciendo uso de la secuenciación del gen 16S rRNA. Es importante decir que la longitud aproximada de este gen es de 1500 pares de bases y los *primers* utilizados para amplificación por PCR tienen nombres como 8F y 1492R. Lo anterior significa que el cebador *forward* inicia en el nucleótido 8 y el cebador *reverse* comienza en el nucleótido 1492 (Olesen, 2016). De manera general, el gen 16S rRNA se conforma de nueve regiones hipervariables flanqueadas por regiones conservadas (Fig. 1). Dependiendo de la región hipervariable estudiada, se podrá observar un enriquecimiento de ciertos taxos. Por ejemplo, el análisis de la región V3 se asocia con las clases dentro del phylum Firmicutes y Proteobacteria (Vargas-Albores et al., 2017). Pueden hacerse combinaciones de estas regiones como V3-V4 o V5-V6, como en el Proyecto del Microbioma Humano. Algunos estudios sugieren la secuenciación del gen 16S completo para obtener resultados más finos (Yarza et al., 2014). Esto permite aplicarse a distintas áreas de estudio como la medicina, donde se podrían diferenciar cepas en pruebas médicas en las que normalmente se crean resistencias a antibióticos (Valenzuela, 2015).

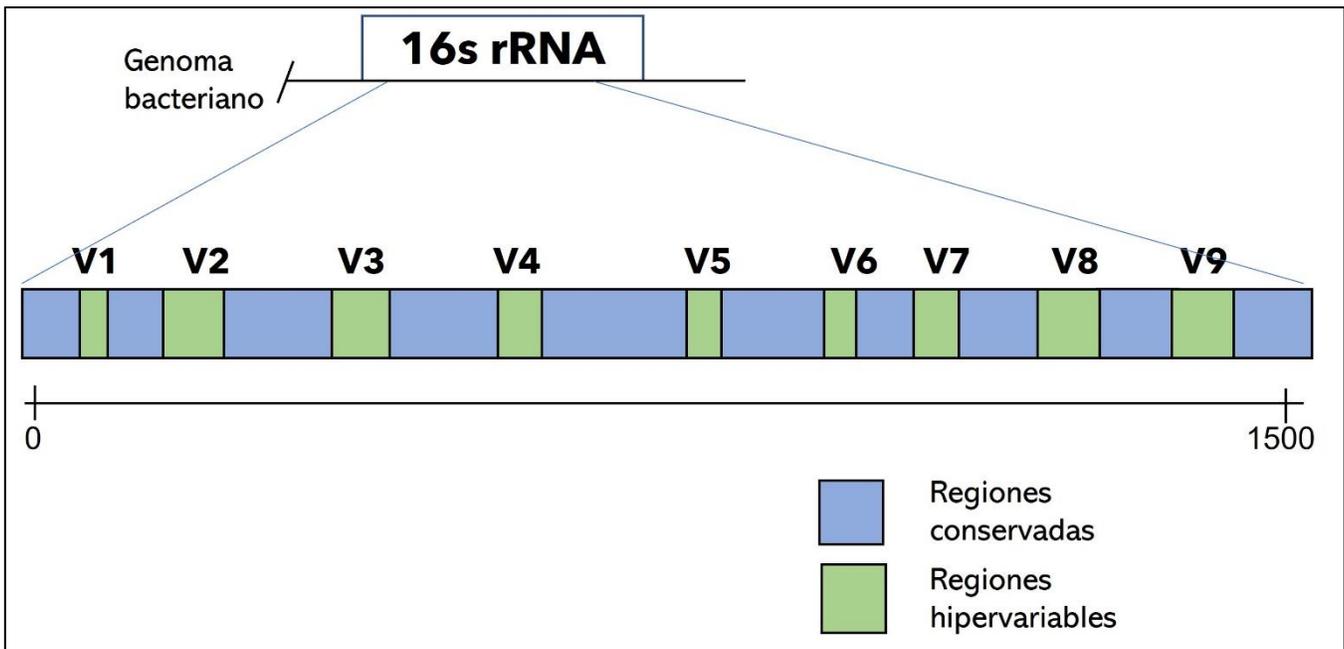


Figura 1. Estructura general del gen 16S rRNA. El gen 16S rRNA se conforma de regiones conservadas (en azul) y de 9 regiones hipervariables (en verde).

Una de las partes importantes en los análisis con 16S son las bases de datos curados (Johnson et al., 2019). En ellas hay millones de secuencias para comparar o asignar taxonomía a un nivel tan fino como las cepas. Los ejemplos más conocidos son GenBank, GreenGenes, Metatax2, Ribosomal Data-base Project (RBP-II), SILVA, Ribosomal Database Project European Molecular Biology Laboratory, Smart Gene IDNS y Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM) (Clarridge, 2004). Algunas ventajas de la secuenciación del gen 16S son: la detección de bacterias no cultivables, sobre todo en aquellas poco descritas y la identificación de cepas dentro de una especie como menciona Valenzuela (2015).

Por otro lado, los ITS (Internal Transcribed Spacer por sus siglas en inglés) son regiones que pertenecen al grupo de genes de RNA ribosomal utilizados con frecuencia como marcadores moleculares que estiman relación filogenética entre especies (Eberhardt, 2010; Fonseca, 2016; Rocha, 2020). También son usualmente en los que recae la identificación molecular de los hongos pues algunos los reconocen como los marcadores de *barcoding* más eficaces para los mismos (Raja et al., 2017). Dentro del clúster de genes se reconocen tres partes diferenciadas; LSU como subunidad mayor, SSU como subunidad menor y, por último, la región de ITS que incluye a los ITS1 y 2 y al gen 5.8 rRNA situado entre estos dos últimos (Kurtzman, 2014). Se utiliza la PCR como método de amplificación y se utilizan *primers* específicos de acuerdo con la región de interés (Fig. 2). La región completa del ITS (incluyendo el 5.8S) equivale a 550-600 pares de bases (Raja et al., 2017).

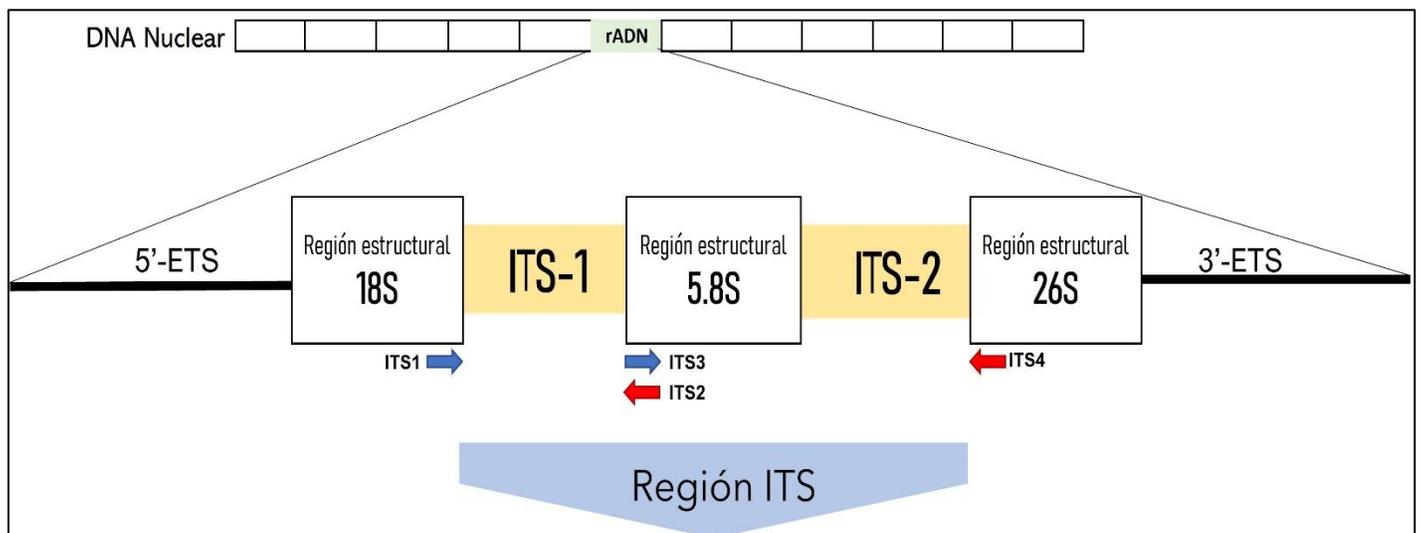


Figura 2. Estructura de la región ITS en levaduras. La región ITS se encuentra flanqueada por las secuencias codificantes y estructurales de las subunidades ribosomales 18S y 26S. Se conforma por las regiones ITS1, la subunidad 5.8S y la región ITS2. Existen primers específicos que permiten amplificar la región de interés (flechas rojas y azules).

Identificación taxonómica usando metabarcoding

Durante mucho tiempo se ha utilizado el metabarcoding de 16S rRNA para la identificación de procariontes y con ello los OTUs (Unidades Operacionales Taxonómicas) como técnica o unidad de análisis. Estas unidades taxonómicas son muy útiles dada la dificultad para clasificar “especies” en organismos procariontes, ya que, para ello requerían cultivos y caracterización morfológica y bioquímica.

En términos prácticos, una OTU se puede considerar equivalente a una categoría taxonómica. Cada OTU es definido o representado por una secuencia taxonómica única en el análisis. Esto se comprueba comparando las secuencias contra bases de datos especializadas. La agrupación por OTUs utiliza un umbral de similitud del 97% entre la secuencia de referencia (tomada de bases de datos) y la secuencia de consulta. De cumplirse esta consigna, la secuencia de consulta se cataloga como un OTU al que posteriormente se asignará un nivel taxonómico (Edgar, 2018). Este umbral fue propuesto en los años 90 cuando sólo unas pocas secuencias de 16S rRNA estaban disponibles. Sin embargo, las lecturas en los análisis de *metabarcoding* tienen errores introducidos durante PCR y la secuenciación, lo que resulta en un número considerable de OTUs dudosos o falsos.

Para mitigar lo anterior, surge una variación de los OTUs llamada ASV (Secuencias de Variantes de Amplicón), la cual asigna un umbral de 99% de similitud en las secuencias para clasificarlas como una especie. Las ASVs fueron propuestas por Callahan (2017) al desarrollar un algoritmo de agrupamiento que infiere las secuencias biológicas o ASVs. A pesar de que hay controversia en el uso de OTUs o ASVs, hay ventajas claras para los ASVs. Se incorpora el uso de análisis referidos a bases de datos y al mismo tiempo la inferencia estadística de secuencias biológicas mediante modelos de error. Con lo anterior, se elimina la limitante de identificar nuevas ASVs que no están presentes en las bases de datos (Callahan, 2017, Glassman et al., 2018).

Software QIIME2

El programa informático para análisis biológico-ecológicos QIIME2 (acrónimo en inglés para Quantitative Insights Into Microbial Ecology), fue desarrollado bajo la estructura de *plugins* que permite la integración y funcionamiento de algoritmos desarrollados por terceros para contribuir a la funcionalidad. Desde herramientas de última generación para control de calidad en secuencias para distintas plataformas de secuenciación, hasta aquellas que permiten la asignación taxonómica y cálculos

de diversidades, incluso se han agregado nuevos *plugins* que permiten el análisis metabólico y metaproteómico (Bolyen et al., 2019). QIIME2 es bastante eficiente hablando de tiempo de procesamiento, además, incorpora el uso de algoritmos como el *Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2* (DADA2) que, aunque requiere bastante poder de cómputo, incluye varias funciones (*denoising* de secuencias, dereplicación y filtrado de quimeras) y además produce archivos de salida listos para el análisis de diversidad. DADA2 emplea el método de agrupamiento de ASV's, que como se mencionó anteriormente, emplea un algoritmo de error en las secuencias para después utilizar ese error al asignar el valor a las secuencias verdaderas y después únicas, proceso llamado deduplicación. Adicional a las funciones de otros *pipelines*, DADA2 analiza (*denoising*) las lecturas *forward* y *reverse* de manera independiente, esto le da un mayor grado de confianza al análisis posterior (Prodan et al., 2020).

Justificación

El mezcal juega un rol económico importante para pequeños productores especialmente por el incremento de la producción e interés comercial en años recientes. Los microorganismos identificados que participan en la fermentación del agave dentro de todo el territorio mexicano podrían utilizarse para mejorar el proceso de producción. Por último, el mezcal tiene un papel social muy importante en nuestra cultura al ser un producto que surge con las civilizaciones antiguas y evoluciona con el proceso de destilación luego de la llegada de los españoles. Para generar el conocimiento básico de la microbiota en este proceso, es esencial generar metodologías para su estudio (buen modelo de comunidades en sucesión) y tener la posibilidad de contribuir al cuidado de la microbiota en cada etapa.

Hipótesis

Existe una relación entre la composición y estructura del microbioma de la fermentación natural con la especie de agave empleada y región geográfica de muestreo en la elaboración del mezcal.

Objetivo

Caracterizar mediante análisis de *metabarcoding* (16S e ITS), las principales comunidades microbianas en la fermentación natural de agaves en México, y establecer los principales factores bióticos y abióticos que moldean las comunidades.

Objetivos particulares

Obtener datos de marcadores (16S e ITS) mediante secuenciación masiva que nos permitan identificar la diversidad de la comunidad bacteriana en las principales zonas productoras, para distintas especies de agave y en condiciones diversas de fermentación.

Determinar las principales asociaciones los microbiomas encontrados, a factores bióticos (especie de agave, etapa de fermentación) y abióticos (región de productos, tipo de fermentador).

Materiales y métodos

Colecta de muestras y almacenamiento

El mosto utilizado fue obtenido de la colección “levaduras mezcaleras” del grupo YEAST MX, realizada entre los años 2018 y 2021 en los estados de Guanajuato, Jalisco, Oaxaca, Puebla y Sonora. Esta colección fue creada por Cinvestav Irapuato, LANGEBIO, ENES UNAM - Unidad León y LIIGH UNAM en coordinación con productores de los diferentes sitios muestreados. El mosto fue recolectado con una micropipeta estéril desechable, se tomaron 4 mL, se colocaron 2 mL del fermento en un tubo con glicerol y 2 mL en un tubo sin glicerol. Se sellaron perfectamente, se transportaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a una temperatura de -80°C hasta su uso.

Procesamiento del mosto de agave

La extracción de ADN de las muestras fue realizada modificando el protocolo del kit Quick DNA Fungal/Bacterial Miniprep (Zymo Research Corp), agregando previamente al protocolo, una incubación de 70° C y vortex por 5 minutos. La información de cada una de las muestras procesadas se encuentra resumida en la tabla 1.

#	ID_muestra	Palenque	Estado	Especie_de_agave	Material_de_la_tina	Estadio_de_fermentacion
1	AamOax00	Yesu-yu	Oaxaca	A. americana	Cemento	Inicial
2	AamOax03	Yesu-yu	Oaxaca	A. americana	Cemento	Intermedio
3	AanOax01	Destileria los danzantes	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Madera	Inicial
4	AanOax02	Salvador Santiago Hernand	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Madera	Inicial
5	AanOax01	Amado Cisneros	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Barro	Inicial
6	AanOax03	Alipus	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Madera	Inicial
7	AanOax04	Alipus	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Madera	Inicial
8	AanOax06	Alipus	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Madera	Inicial
9	AanOax01	Sergio Garcia Lucas	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Madera	Inicial
10	AanOax05	Destileria los danzantes	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Madera	Intermedio
11	AanOax03	Destileria los danzantes	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Madera	Intermedio
12	AanOax03	Salvador Santiago Hernand	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Madera	Intermedio
13	AanOax04	Salvador Santiago Hernand	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Madera	Intermedio
14	AanOax05	Don Isac	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Madera	Intermedio
15	AanOax04	Don Isac	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Madera	Intermedio
16	AanOax03	Don Isac	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Madera	Intermedio
17	AanOax12	Alipus	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Madera	Intermedio
18	AanOax03	Sandunga	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Madera	Final
19	AanOax03	Sandunga	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Madera	Final
20	AanOax08	Sierra del sur	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Madera	Final
21	AanOax17	Real Minero	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Madera	Final
22	AanOax06	El caramelo	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Barro	Final
23	AanOax04	El Viejito	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Barro	Final
24	AanOax03	El Viejito	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Barro	Final
25	AanOax12	Sergio Garcia Lucas	Oaxaca	A. angustifolia var X.	Madera	Final
26	AkaOax02	Jose Lucas Garcia	Oaxaca	A. karwinskii	Madera	Inicial
27	AkaOax01	Jose Lucas Garcia	Oaxaca	A. karwinskii	Madera	Inicial
28	AkaOax07	Jose Lucas Garcia	Oaxaca	A. karwinskii	Madera	Final
29	ApoOax00	Paraje Rio Sabino	Oaxaca	A. potatorum	Cuero de vaca	Inicial
30	ApoOax03	Real Minero	Oaxaca	A. potatorum	Madera	Intermedio
31	ApoOax04	Paraje Rio Sabino	Oaxaca	A. potatorum	Cuero de vaca	Intermedio
32	ApoOax05	Real Minero	Oaxaca	A. potatorum	Madera	Final
33	ApoOax06	Real Minero	Oaxaca	A. potatorum	Madera	Final
34	ApoOax07	Paraje Rio Sabino	Oaxaca	A. potatorum	Cuero de vaca	Final
35	AanSon01	NA	Sonora	A. angustifolia var X.	Abierto	Inicial
36	AanSon07	Los Sauses	Sonora	A. angustifolia var X.	Lamina	Intermedio
37	AanSon08	NA	Sonora	A. angustifolia var X.	Adobe/Concreto	Intermedio
38	AanSon06	Tatemado	Sonora	A. angustifolia var X.	Lamina / Metal	Intermedio
39	AanSon06	Tatemado	Sonora	A. angustifolia var X.	Lamina / Metal	Intermedio
40	AanSon15	NA	Sonora	A. angustifolia var X.	Abierto	Final
41	AanSon08	La pitallita Mocha	Sonora	A. angustifolia var X.	Ninguna	Final
42	AanSon12	Los Sauses	Sonora	A. angustifolia var X.	Lamina	Final
43	AanSon12	NA	Sonora	A. angustifolia var X.	Adobe/Concreto	Final
44	AsaxanJal03	Hacienda divisadero	Jalisco	A. angustifolia var X/A. salmiana	Cemento	Inicial
45	AsaxanJal03	Hacienda divisadero	Jalisco	A. angustifolia var X/A. salmiana	Cemento	Inicial
46	AsaxanJal60	Taberna Cicatan	Jalisco	A. angustifolia var X/A. salmiana	plastico	Final
47	AsaxanJal60	Taberna Cicatan	Jalisco	A. angustifolia var X/A. salmiana	plastico	Final
48	ArhJal00	Arturo Campos	Jalisco	A. rhodacanta	Suelo/piedra	Inicial
49	ArhJal00	Arturo Campos	Jalisco	A. rhodacanta	Plastico	Inicial
50	AanPue01	Mezcaleros de Atlapulco	Puebla	A. angustifolia var X.	Acero	Inicial
51	AanPue03	Asuncion Matilde	Puebla	A. angustifolia var X.	Plastico	Intermedio
52	AanPue02	Mezcaleros de Atlapulco	Puebla	A. angustifolia var X.	Acero	Intermedio
53	AanGua06	Penca y Piedra	Guanajuato	A. angustifolia var X.	Madera	Inicial
54	AanGua05	Penca y Piedra	Guanajuato	A. angustifolia var X.	Madera	Inicial

Tabla 1. Metadatos de muestreo

PCR y secuenciación

Previo a la amplificación de las regiones 16S rRNA e ITS2, se cuantificaron y adecuaron las concentraciones para que fueran superiores a 5 ng/μL para cada muestra. La cuantificación se hizo mediante fluorescencia utilizando el sistema Qubit 3.0 (Invitrogen) previamente calibrado para la cuantificación. Para corroborar la presencia de ADN genómico microbiano, se realizó un PCR del gDNA extraído. Se amplificó la región bacteriana 16s con los *primers* P27F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', P1495R: 5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3' (Baggi et al., 2004) y para hongos se usaron los *primers* ITS1-F: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG-3', NL4-R: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' (Narváez, 2017). Estas regiones amplificadas abarcan una gran cantidad del gen 16S y del ITS, con esto aseguramos que las regiones V4 del gen 16S, e ITS2 de la secuencia de ITS fueran amplificadas.

La preparación de bibliotecas genómicas y la secuenciación masiva se hizo en el sistema Hi-Seq en la plataforma Illumina utilizando bloqueadores (PNA) para minimizar la amplificación de secuencias de cloroplastos de la región 16S-V4 (Bender, Holben, Sørensen, & Jacobsen, 2007; Taerum, Steven, Gage, & Triplett, 2020) en la empresa ZYMO RESEARCH, en Irvine, California, EUA.

Procesamiento

Se inició por importar los datos de secuenciación al ambiente de QIIME2 en su versión 2021.4. El programa permite visualizar los estadísticos y calidad de las secuencias en el navegador. Este punto es crucial para posteriormente especificar al programa las regiones de corte en las secuencias. El código y scripts utilizados para el procesamiento de datos se encuentran disponibles en el siguiente enlace (https://github.com/aaronejaime/Mezcal_tesis/tree/main).

Análisis usando QIIME2

El paso de filtrado de secuencias es realizado con la herramienta DADA2, incorporada como *plugin* a QIIME2. Las secuencias filtradas por DADA2 se incorporan al proceso de detección de errores de secuenciación y amplificación que pudieran intervenir en el posterior análisis. A este proceso se le conoce como *denoising*. Aquí también se crea un modelo de error que permite discernir a un nivel más fino, una secuencia que es una ASV de una que no.

El resultado del *denoising* son 3 archivos visualizables en el navegador: el primero es una tabla que nos señala cuántas lecturas contiene cada muestra y cuántos ASVs (llamados *features* por QIIME2) hay en el conjunto de muestras. El segundo archivo es una tabla que contiene cada uno de los ASVs (*features*) conformada por un identificador único y la secuencia del ASV, así como su longitud. El tercer archivo es un informe general del conjunto de muestras, el cual resume el proceso de *denoising*, es decir, cuántas lecturas contiene cada muestra después de cada paso dentro del proceso.

En el caso particular de este trabajo, el siguiente paso fue la asignación taxonómica de las secuencias. Para realizar este proceso, se tomó el segundo archivo del *denoising* anterior (llamado por default *rep-seqs.qza* por Qiime2) que contiene la información de los ASVs encontrados en el compendio de muestras. Este archivo será usado junto con un clasificador (que cumple la función de asignar la taxonomía a las secuencias) y una base de datos con las secuencias del gen 16S rRNA, ITS o curadas para una región en específico.

En este trabajo se utilizó el clasificador *sklearn*, previamente entrenado junto con la base de datos SILVA (Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2014) versión 138.1 con identidad al 99% para la región V4 del 16s rRNA. Por otro lado, para la región del ITS2 se usaron la base de datos UNITE 8 con identidad al 99% y el clasificador híbrido VSEARCH+*sklearn*. Para entrenar al clasificador *sklearn* se usaron secuencias de la versión 8 de UNITE también al 99% de similitud. Todos los datos de clasificadores, cómo entrenarlos y bases de datos están disponibles y en constante actualización dentro de la plataforma de 2 (<https://docs.qiime2.org/2021.11/data-resources/>). El output de este procedimiento contiene el nombre o identificador del ASV y la clasificación taxonómica a la que fue asignado, desde reino hasta el nivel de especie.

Para los análisis de diversidad alfa (diversidad dentro de una comunidad en un sitio particular) se usaron los índices de Chao1 y Shannon mientras que para la diversidad beta (diversidad de especies entre comunidades o ecosistemas) se empleó el método de NMDS (acrónimo en inglés para *Non-metric multidimensional scaling*) respectivamente. Chao1 es un índice paramétrico que para estimar la riqueza de especies utiliza datos de abundancias y confiere mayor peso a las especies raras (Escalante, 2003). Este indicador asume que las especies raras brindan información sobre el número de especies no observadas. Por otro lado, el índice de Shannon es un indicador del número de especies que identifica

qué tan similares son las abundancias de distintas especies dentro de la comunidad. Entre mayor sea el valor de Shannon, mayor será la diversidad de especies una comunidad.

Por su parte los NMDS facilitan la visualización de la composición o estructura de la comunidad microbiana. Su objetivo principal es utilizar una gran variedad de tipo de datos (cuantitativos, cualitativos, semicuantitativos, etc) y agruparlos en un plano de acuerdo con su similitud. Utiliza una matriz de distancia (que equivale a la similitud dentro de la comunidad) o matriz de disimilaridad en lugar de distancias euclidianas (ter Braak, 1995). De esta manera se evitan problemas de sensibilidad

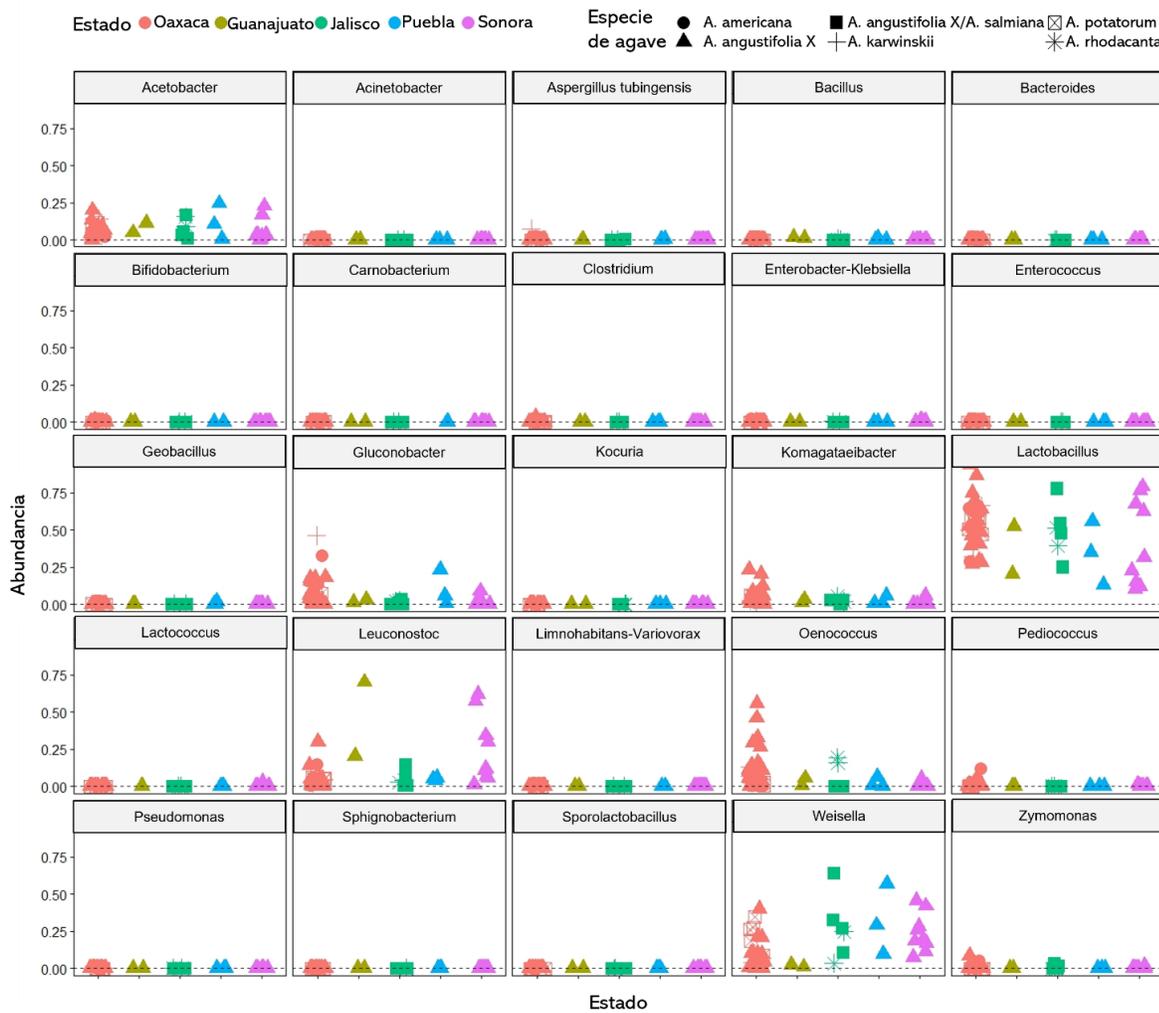


Figura 3. Géneros bacterianos más abundantes. Los géneros dominantes en el análisis son *Lactobacillus*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Leuconostoc* y *Gluconobacter*.

relacionadas con el número de especies ausentes o presentes y sus abundancias totales dentro de una muestra (Sandau et al., 2014). En este trabajo se utilizó una matriz de disimilaridad de Bray-Curtis,

obtenida de la matriz de abundancias. Los datos posteriores a la asignación taxonómica fueron exportados de QIIME2 a través de sus *plugins* y procesados en R, principalmente con *phyloseq*.

Resultados

Diversidad y composición bacteriana

Se mantuvieron alrededor de 2,700,000 lecturas después del procesamiento, conservándose cerca del 60% de las lecturas totales en cada muestra con una longitud aproximada de 250 pares de bases. El mayor número de lecturas alcanzado por muestra fue de poco más de 103,000 lecturas, en cambio la muestra con menor número de lecturas finalizó con tan solo 25,000. Se descartaron las muestras con < 100 lecturas luego del filtrado. En total se identificaron 4018 ASVs para la región V4 del gen 16S rRNA en bacterias,

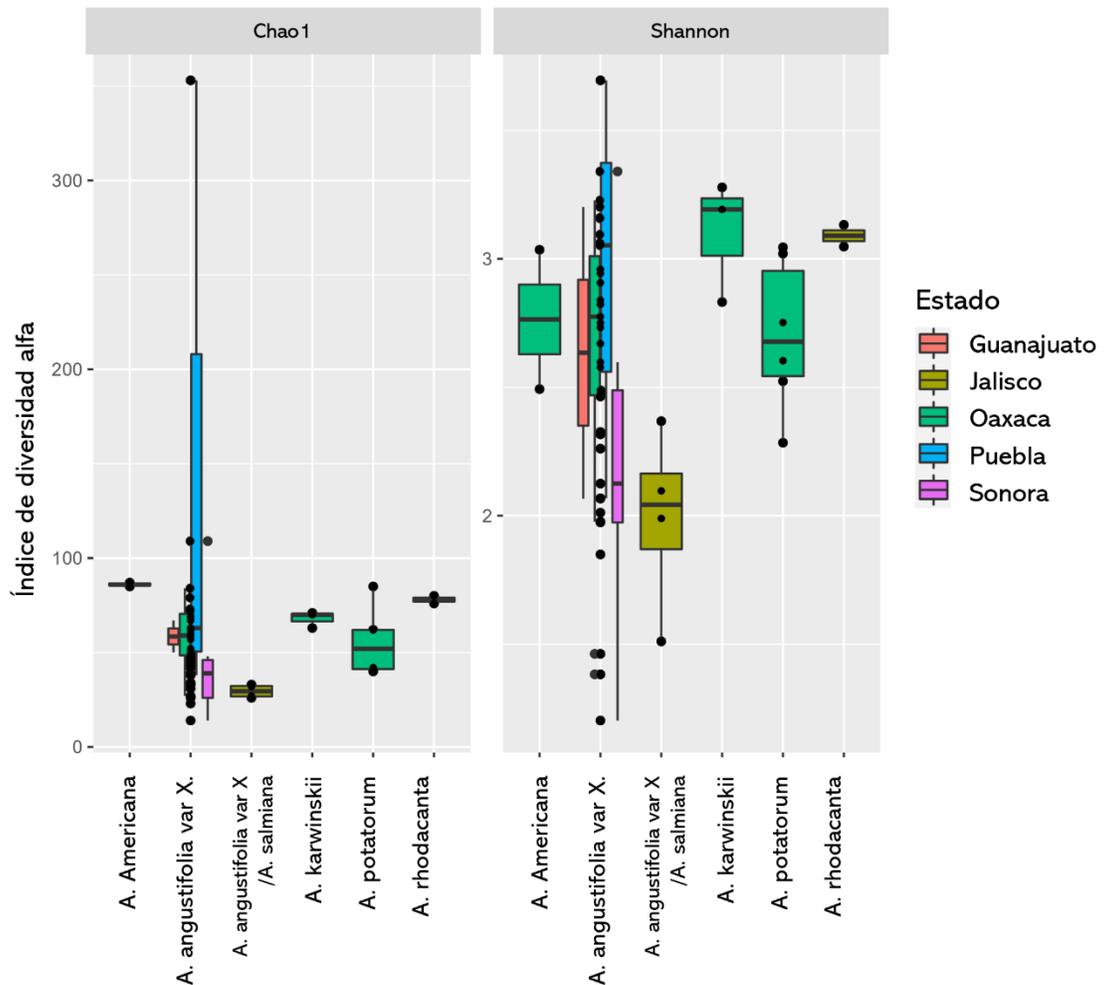


Figura 4. Índices de diversidad alfa. Valores calculados para cada una de las especies de agave muestreadas en cada uno de los estados.

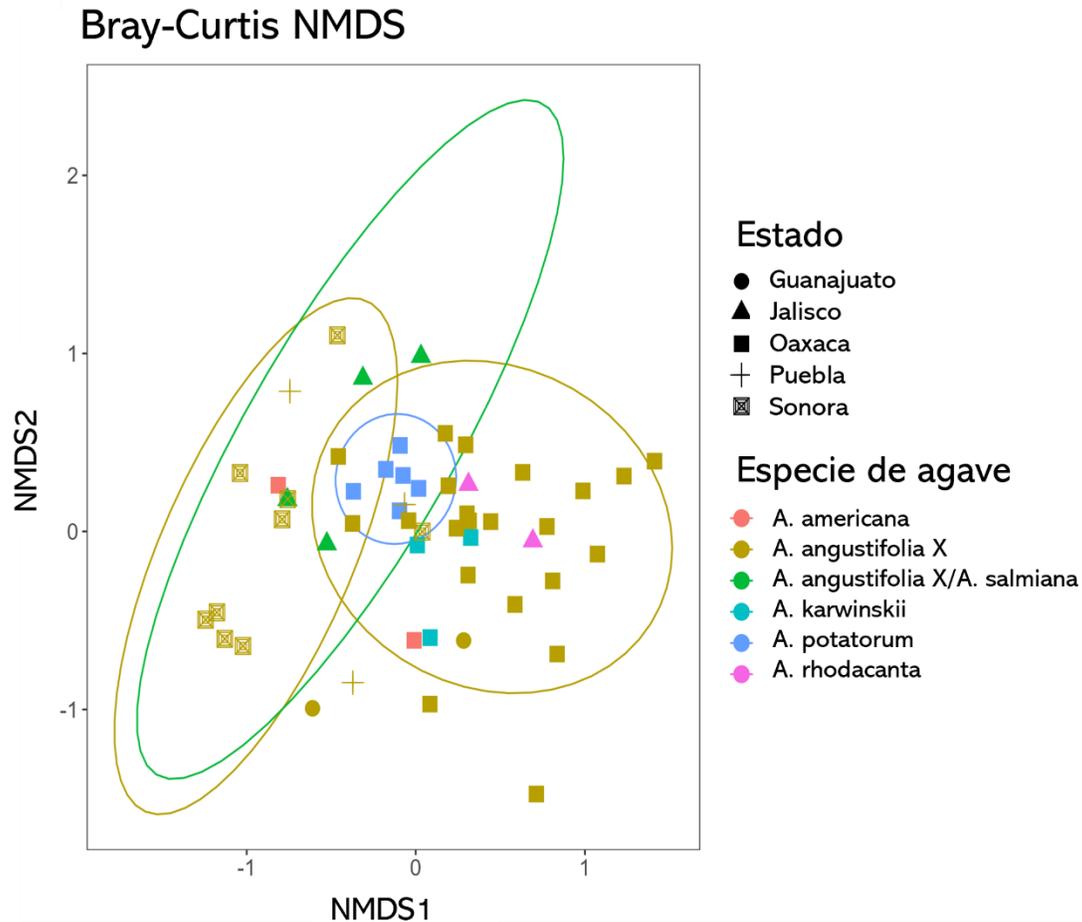


Figura 5. NMDS disimilaridad Bray-Curtis. Los elipses agrupan los datos con mayor grado de similitud.

de las cuales 1290 se mostraron como secuencias únicas. De manera individual, la muestra con mayor número de ASVs fue proveniente de Puebla con poco más de 400 secuencias únicas y se usó *A. angustifolia*. La que tuvo menos ASVs fue obtenida de Sonora y también de *A. angustifolia*, con apenas 15 secuencias únicas. La gráfica de abundancia (Fig. 3) nos muestran de manera más sencilla la composición de los principales taxos de la comunidad bacteriana. Los géneros de bacterias con mayor presencia dentro del muestreo son *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Komagataeibacter*, *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Gluconobacter* y *Weissella*.

Existen diferencias importantes en la predominancia de algunos géneros según el estado de muestreo. Por ejemplo, las muestras del estado de Puebla y Oaxaca muestran una abundancia del género *Gluconobacter* por encima de los demás estados. La diferencia en este caso es la especie de agave utilizado, en Puebla utilizan *A. angustifolia* y en Oaxaca utilizan *A. karwinskii* (Fig. 3). También podemos observar que las muestras de *A. angustifolia* en Guanajuato muestran una mayor predominancia de bacterias del género *Leuconostoc* (Fig. 3), aunque también tienen presencia en Sonora

y Oaxaca de manera importante. En cambio, para el género *Oenococcus* el estado que registra mayor presencia es Oaxaca muy por encima de los demás.

Diversidades alfa y beta

Los índices alfa utilizados en este análisis fueron Chao1, enfocado en dar peso a las especies raras encontradas en el muestreo y Shannon, el cual es un indicador de la distribución de abundancias de las especies en la muestra. El grupo con valores mayores para el índice de Chao1 fue Puebla, donde la especie de agave usada es *A. angustifolia*. En cambio, para el índice de Shannon, los grupos de Puebla, Oaxaca y Jalisco son los que muestran valores mayores a 3, es decir, que muestran un alto grado de diversidad de especies bacterianas. En estos grupos se usan las especies *A. angustifolia*, *A. karwinskii* y *A. rhodacanta*, respectivamente (Fig. 4). Por otro lado, en los NMDS (Fig. 5) se representa la estructura de la comunidad; podemos observar una agrupación que, en su mayoría, incluye a Jalisco, Oaxaca y Sonora. Sin embargo, los grupos no muestran una diferenciación significativa, indicando homogeneidad en las comunidades bacterianas a lo largo del estudio.

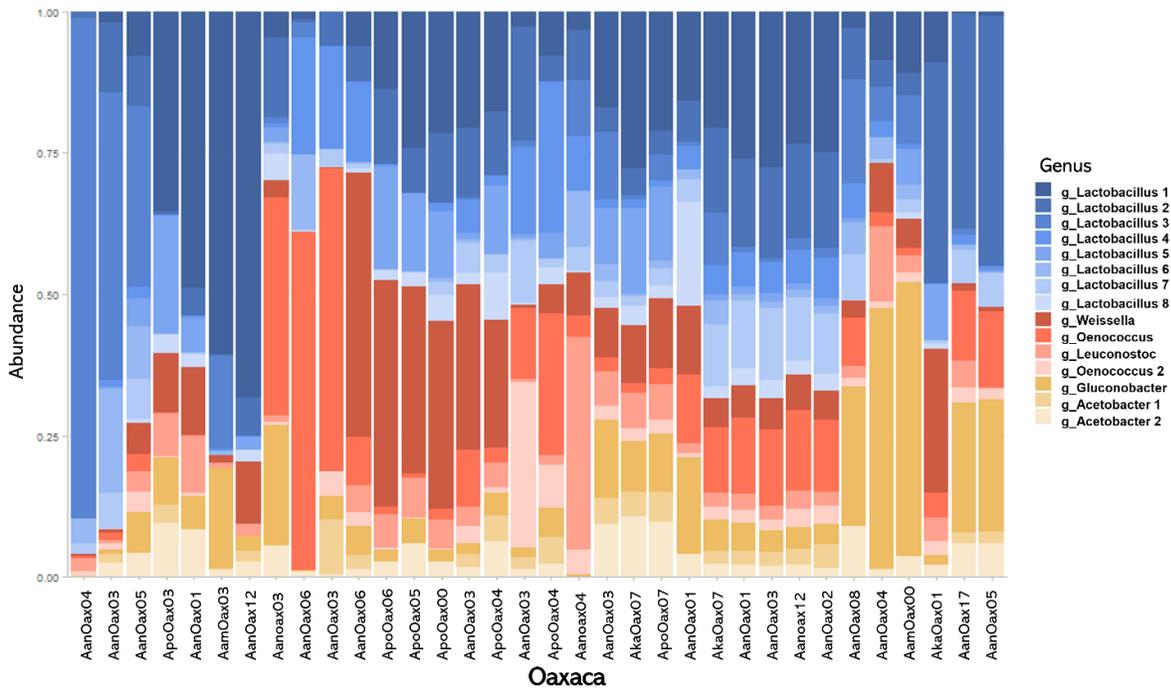


Figura 6. Gráfico de barras de las abundancias bacterianas para el estado de Oaxaca.

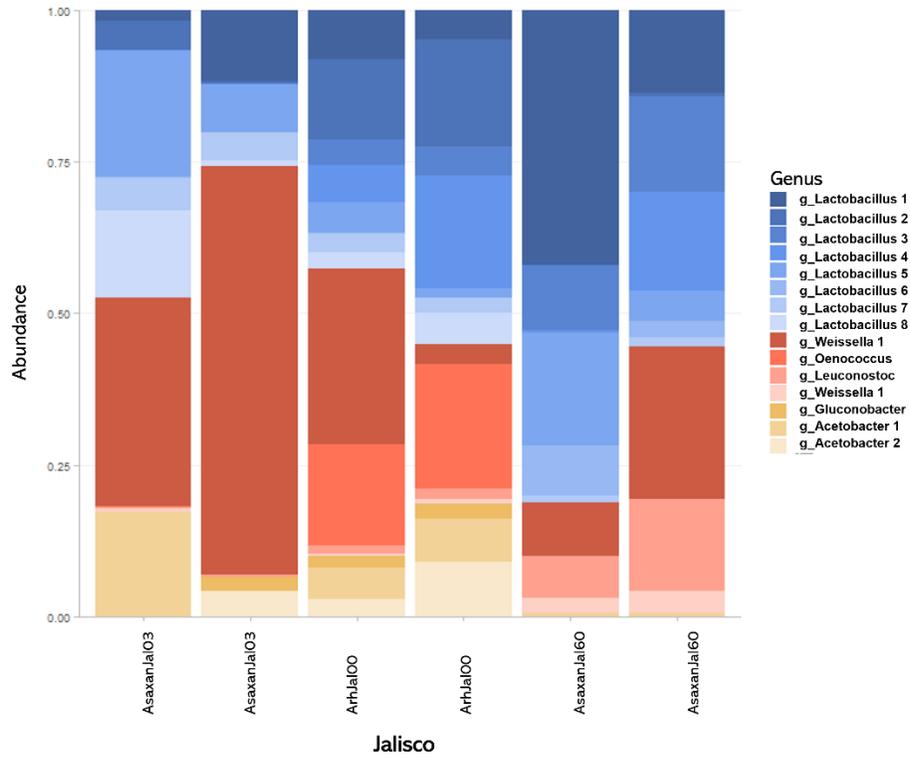


Figura 7. Gráfico de barras de las abundancias bacterianas para el estado de Jalisco.

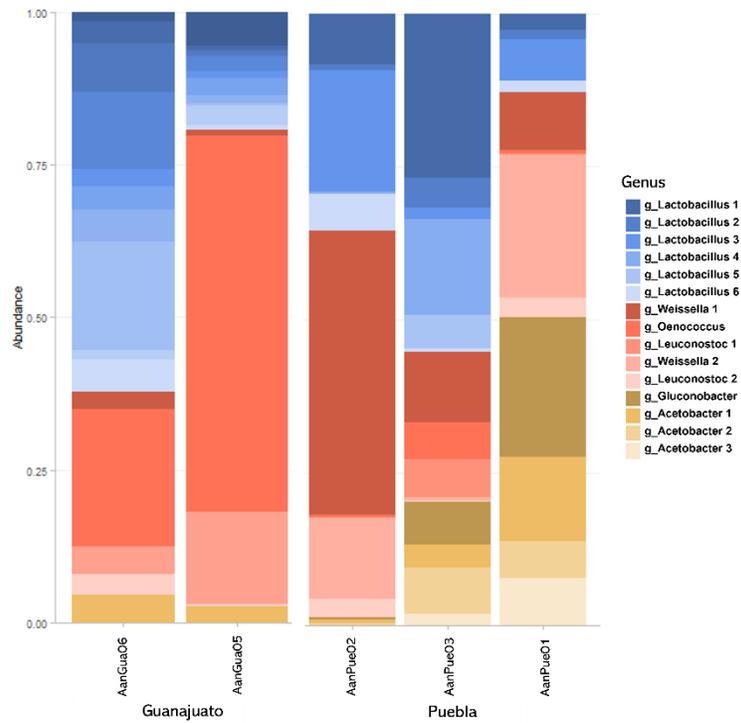


Figura 8. Gráfico de barras de las abundancias bacterianas para los estados de Guanajuato y Puebla

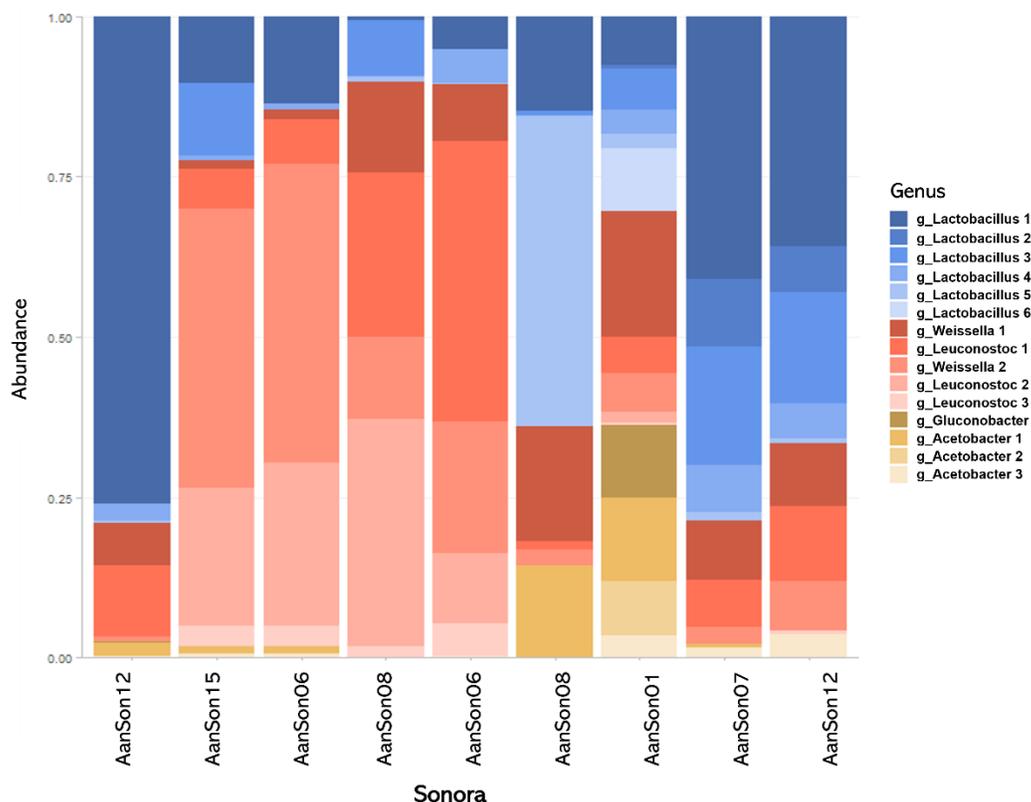


Figura 9. Gráfico de barras de las abundancias bacterianas para el estado de Sonora.

En cuanto a las abundancias generales, el género predominante fue *Lactobacillus*, seguido de *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Weissella*. Las figuras 6-9 permiten observar más puntual la conformación de las muestras por estado. Las muestras fueron nombradas respecto a la especie de agave utilizada, seguido del estado de colecta y por último los días de fermentación de esa muestra al ser colectada (Ejemplo. *A. angustifolia* en el estado de Sonora con 16 días de fermentación en tina = AanSon16). Por su parte, en cada estado puede observarse un patrón en cuanto a los géneros abundantes que participan en la fermentación.

Por ejemplo, para el estado de Oaxaca las muestras AanOax08 (Mihuatlan), AanOax17 (real de minero), AanOax04 y AanOax05 (ambas de Matatlán) registraron un patrón muy similar. Las anteriores pertenecen a distintos tiempos de fermentación pero todas fueron muestreadas de tinajas de madera. Muestran una abundancia pronunciada en géneros como *Gluconobacter* y *Lactobacillus*. En cambio, las muestras AanOax12, AkaOax07, AanOax01, AanOax03 y AanOax02 se representan como muestras muy diversas con proporciones muy similares de los géneros *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Gluconobacter*, *Acetobacter* y *Weissella* (Fig. 6). Por último, las muestras tomadas en destilerías donde usaron el agave *A. potatorum* (Apo) reflejan un sólido patrón en la gran abundancia del género *Weissella*.

Las muestras AsaxanJal03 y AsaxanJal03 coinciden en los géneros *Lactobacillus*, *Weissella* y *Acetobacter*. En cambio, las muestras AsaxanJal60 y AsaxanJal60, ambas pertenecen al estadio final de la fermentación (Fig. 7). En las muestras ArhJal00 y ArhJal00 predominan los géneros *Oenococcus* y *Lactobacillus*, y también pertenecen al estadio de fermentación inicial.

Para las muestras de Sonora AasnSon15, AanSon08, AanSon08 y AanSon06 observamos patrones similares según los resultados del barplot (Fig. 9). A pesar de pertenecer a destilerías diferentes, coinciden en abundancias similares para los géneros *Weissella* y *Leuconostoc*. Por su parte, las muestras AanSon07 y AanSon12 muestran el mismo patrón con estos dos géneros ya mencionados además de

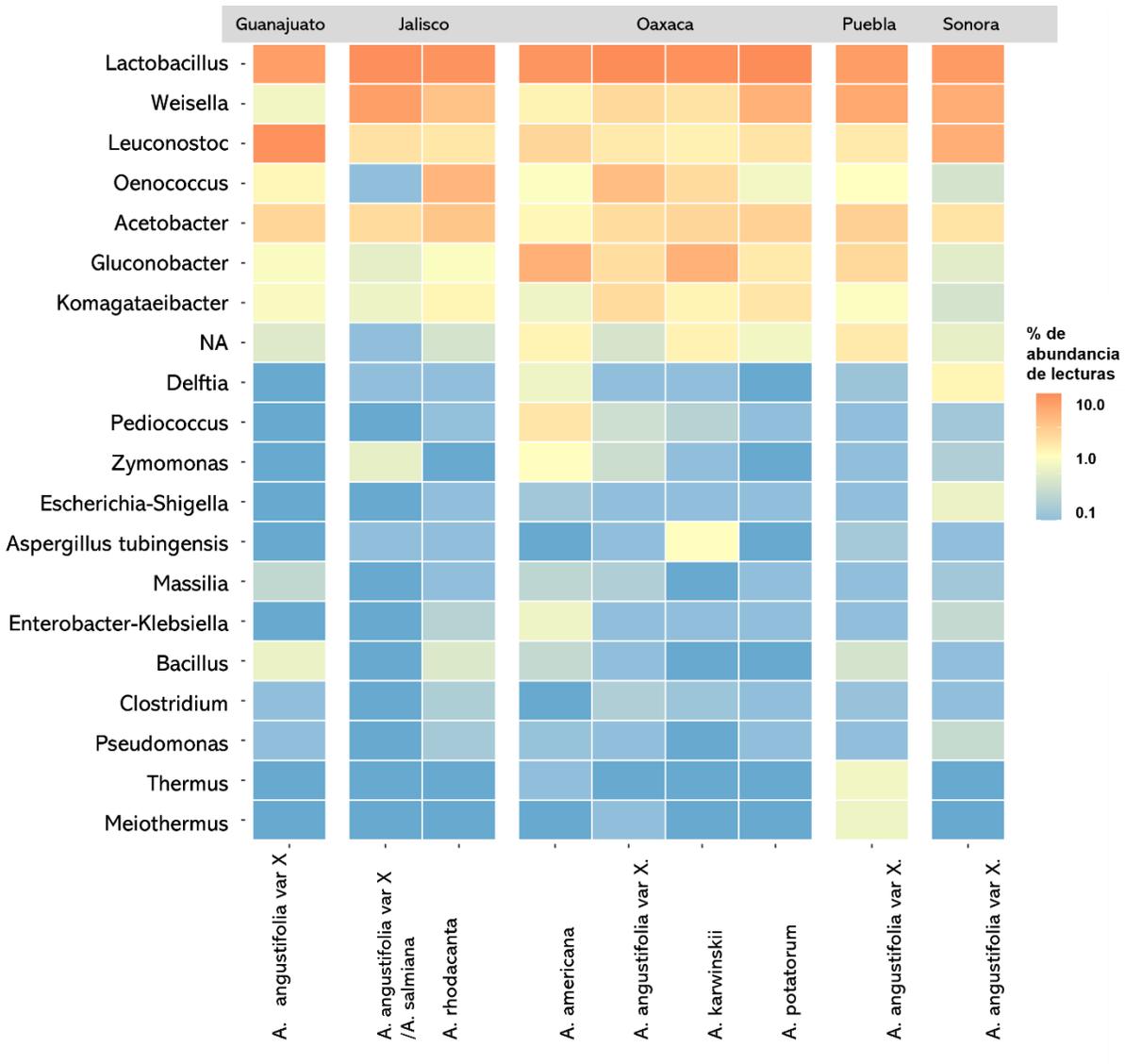


Figura 10. Heatmap de porcentajes de abundancias bacterianas para cada uno de las especies de agave muestreadas para cada estado.

una gran abundancia en *Lactobacillus*. Lo anterior indica cuán homogénea es la comunidad bacteriana para la región de Sonora en comparación al resto. Sonora y Guanajuato demostraron tener una gran abundancia para el género *Leuconostoc* (Figs. 8-10).

Diversidad y composición fúngica

Diversidades alfa y beta

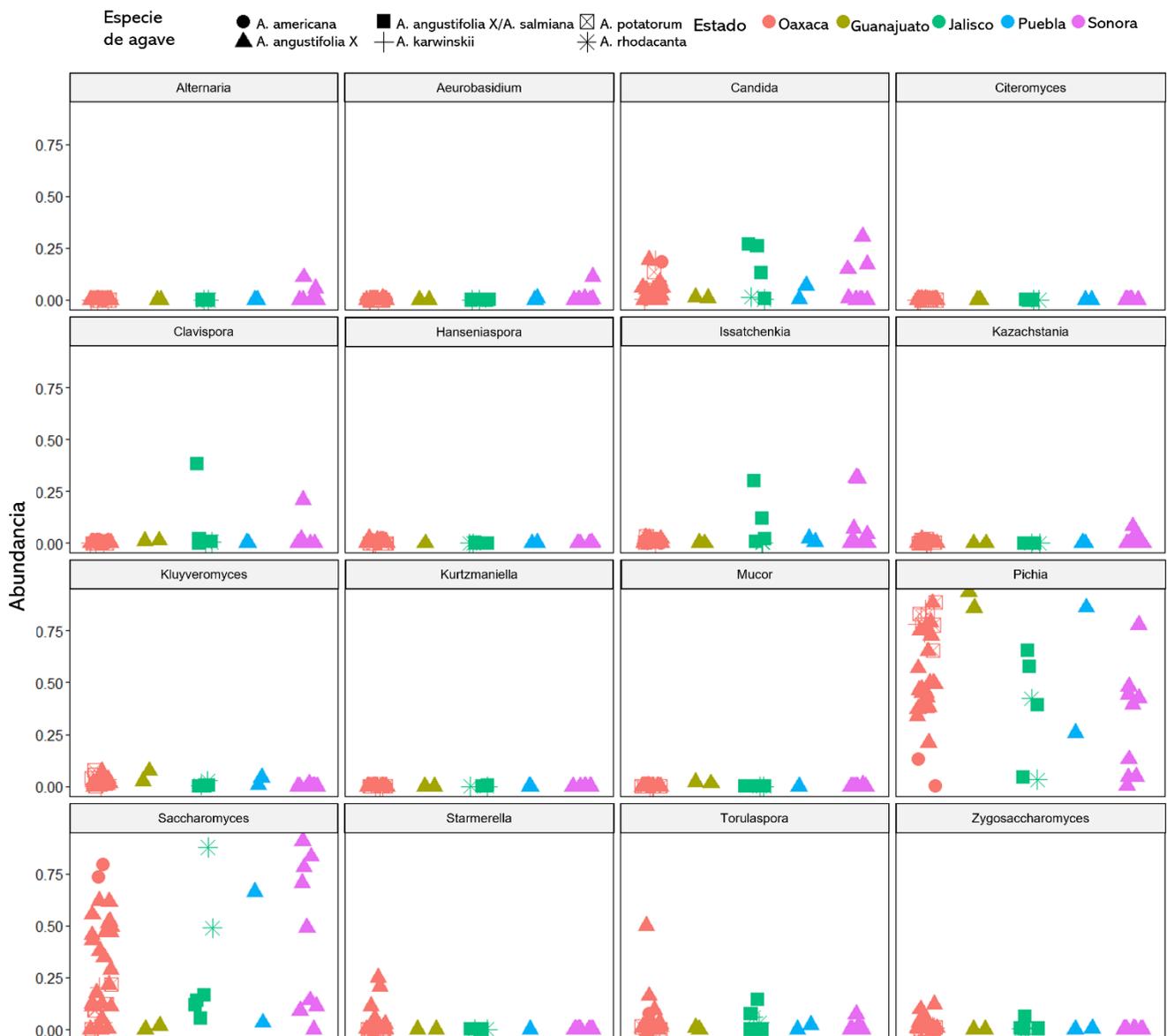


Figura 11. Géneros fúngicos más abundantes. Destacan *Pichia*, *Saccharomyces* y *Candida*.

Se identificaron 609 ASVs con el marcador ITS. La longitud de estas secuencias fue desde los 185 hasta los 491 pb, acorde a la longitud registrada del ITS2 (Maruyama et al., 2020). Se retuvieron alrededor del 80% de las lecturas para cada muestra. El total retenido fue de aproximadamente 3,000,000 lecturas. En cuanto al mayor y menor número de lecturas luego del filtrado fue de 80,000 y 14,000, respetivamente. Se descartaron las muestras que luego del filtrado tuvieran <100 lecturas.

En la figura 11 podemos observar los géneros de hongos y levaduras que predominan en el compendio de muestras. Evidentemente *Pichia*, *Saccharomyces* y *Candida* son las que más se encontraron dentro del estudio. El grupo Sonora demuestra tener varios géneros con mayor predominancia a comparación de los otros estados. Por ejemplo, en taxas como *Alternaria*, *Clavispora*, *Aureobasidium*, *Kazachstania* y *Saccharomyces*. Es importante hacer mención que, para este proyecto,

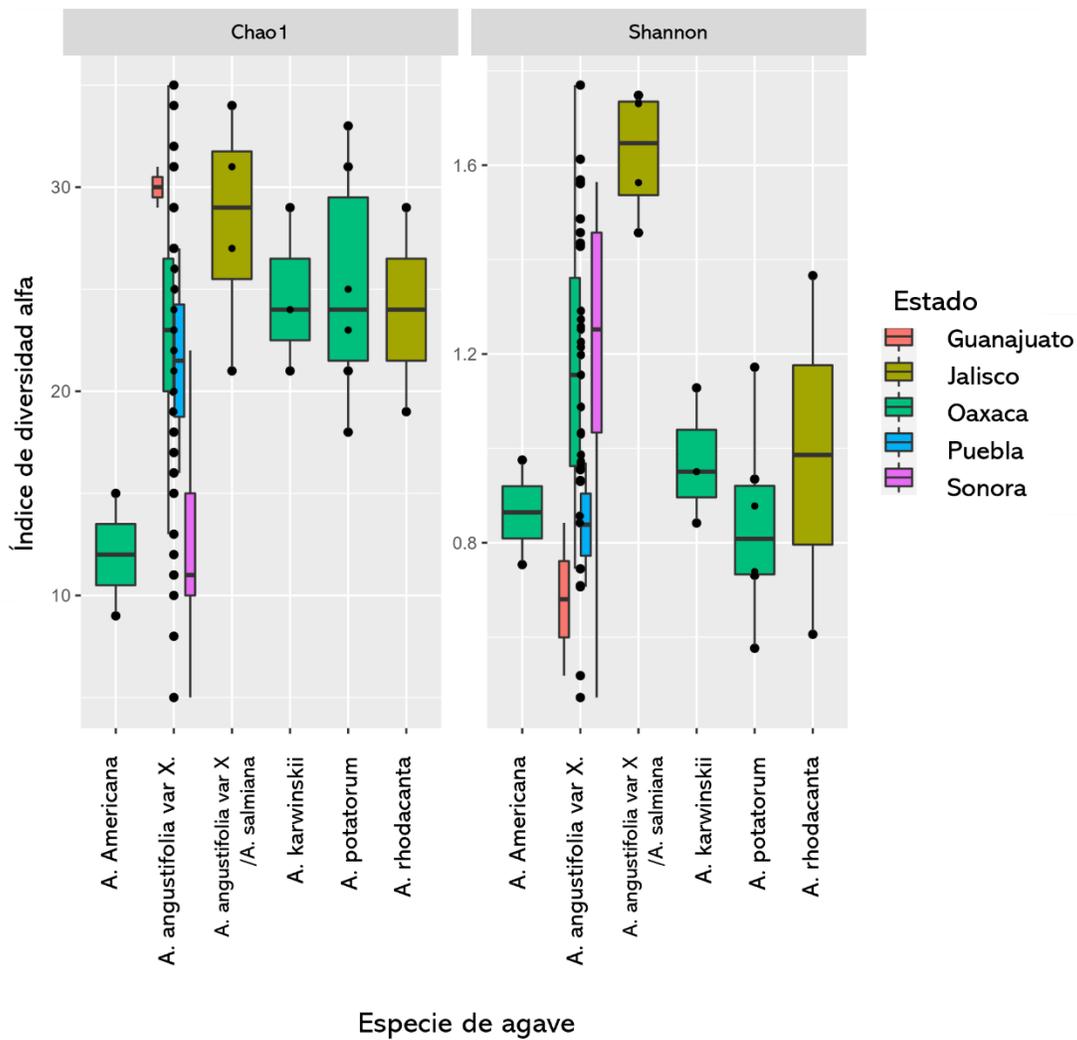


Figura 12. Índices de diversidad alfa *Chao1* y *Shannon*. Valores calculados para cada una de las especies de agave muestreadas en cada uno de los estados

en Sonora la única especie de agave usada fue *A. angustifolia*. En contraste, géneros como *Starmerella*, *Torulaspota* y *Zygosaccharomyces* mostraron tener mayor abundancia en el estado de Oaxaca. Otro rasgo notable es que las muestras donde se usó *A. angustifolia* son las que parecen ser más diversas. Hay algunos casos como *A. rhodacantha* y *A. potatorum* que tienen una gran abundancia en el género *Saccharomyces* y *Pichia*, respectivamente.

Por otro lado, Jalisco muestra una abundancia importante en géneros como *Candida*, *Clavispora*, *Issatchenkia* y *Torulaspota*. Sin embargo, los géneros con mayor abundancia en la mayoría de las muestras fueron *Pichia* y *Saccharomyces*, respectivamente. Por otro lado, podemos observar que Jalisco es el estado con mayor diversidad según el índice de Shannon. Sin embargo, son valores muy bajos, demostrando la poca diversidad de géneros de levaduras implicados en el proceso de fermentación (Fig. 12). Guanajuato, por otro lado, es el que tiene menor diversidad de especies junto con Puebla.

La estructura de la comunidad puede verse en la figura del NMDS de hongos (Fig. 13), la cual nos muestra dos grupos principales, uno conformado por todas las muestras de *A. angustifolia*/*A. salmiana* del estado de Jalisco y, de otro por las muestras de *A. angustifolia* del resto de los estados. Sonora, en cambio, reparte su distribución entre Jalisco y Oaxaca. Además, también es interesante ver que Puebla y Guanajuato se agrupan con Oaxaca. Por último, es visible la formación de un grupo separado por la especie de agave *A. potatorum* dentro del grupo de Oaxaca (cuadros llenos en azul).

En las gráficas de barras podemos observar la contundente abundancia de *Pichia* (Fig. 14-17). Como dato, los género dominantes en este estudio fueron *Pichia* y *Saccharomyces*, por encima de *Clavispora* y *Candida*. *Torulaspota delbrueckii* resalta su dominancia en algunas muestras de Oaxaca al igual que *Zygosaccharomyces* (Fig. 14). Por su parte, *Clavispora* es un género núcleo en las muestras del estado de Jalisco (Fig. 15).

De manera puntual, los duplicados de AsaxanJal00 son bastante similares, siendo ambas parte del estadio inicial, registrando un olor agrio a la hora de su colecta y exhibiendo un pH de 3.5. En cuanto a la diversidad fúngica, *Saccharomyces* predomina sobre los otros géneros, sin embargo, se puede observar la presencia de *Torulaspota* (Fig. 15). Por su parte la muestra AsaxanJal60 registra la presencia

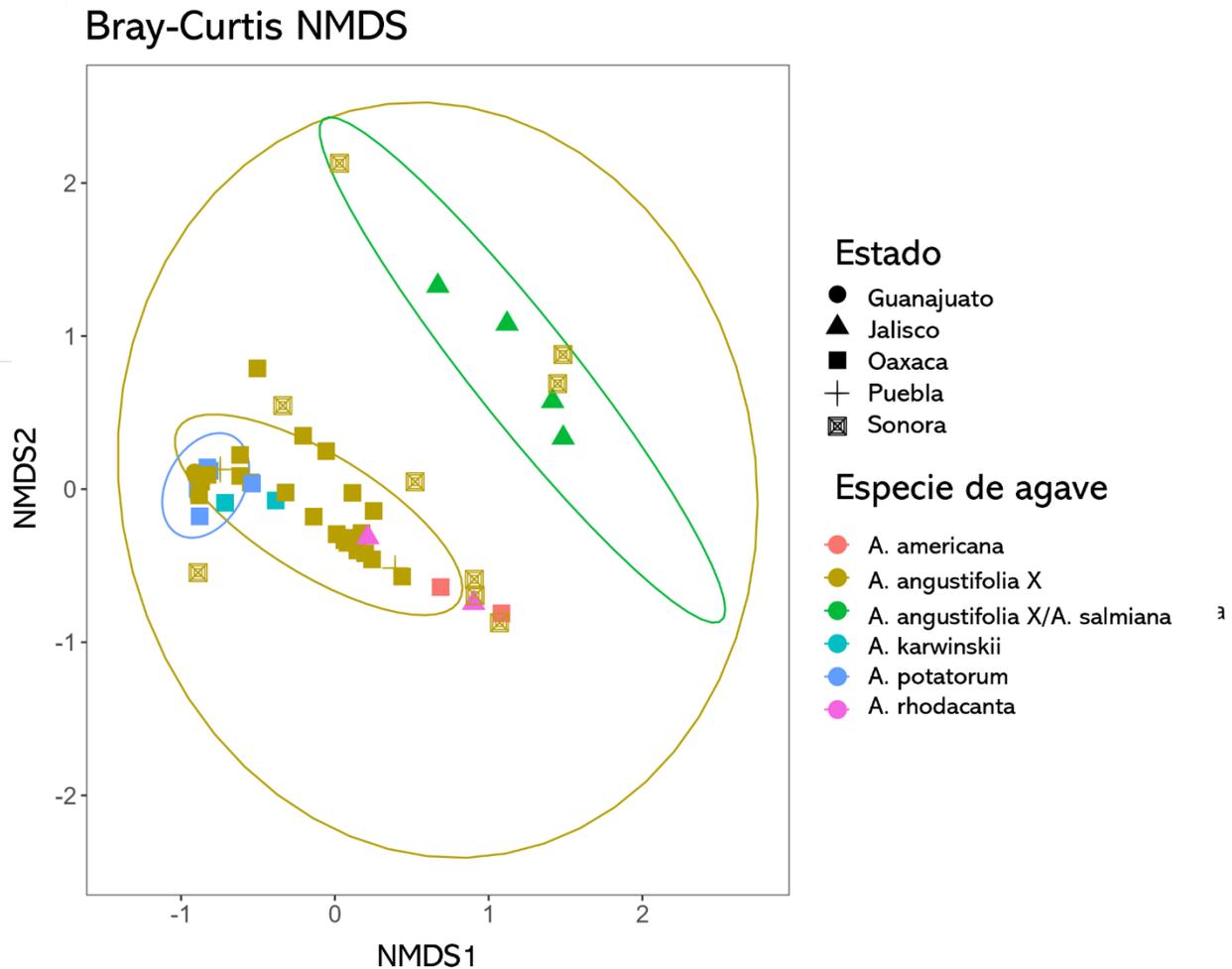


Figura 13. NMDS disimilaridad Bray-Curtis. Los elipses agrupan los datos con mayor grado de similitud. A diferencia de las bacterias, podemos notar una separación de grupos más marcada, denotando la estructura de la población.

del género *Clavispora* en importantes proporciones. El estado de Guanajuato a diferencia de todos los demás, exhibe la presencia del género *Mucor* y comparte el registro de *Starmerella* con Puebla y Oaxaca. Sin embargo, se pueden observar a *Pichia* y *Kluyveromyces* como géneros dominantes (Fig. 16).

Para el estado de Sonora, las muestras AanSon15 y AanSon12 comparten el estadio final de fermentación. Presentan como géneros dominantes a *Saccharomyces* e *Issatchenkia* sobre *Pichia* (Fig. 17). En cambio, las muestras AanSon12 y AanSon07 comparten la lámina como material de la tina, un pH de 4 y los géneros *Candida*, *Issatchenkia* y *Saccharomyces* aunque en menor proporción. Las muestras AanOax03 (colectadas del palenque ‘Don Isac’, Matatlán), AanOax03 (colectadas del palenque ‘Sandunga’, Matatlán), AanOax08, AkaOax07 comparten la presencia de los géneros *Pichia* y *Kluyveromyces*. Todas las anteriores comparten el mismo material de tina (madera), presentan un pH de 3-4 y pertenecen a los estadios intermedio y final de la fermentación. De manera contraria, las

muestras en Oaxaca donde usaron el *A. potatorum* y *A. americana* muestran una contundente presencia del género *Saccharomyces* (Fig. 18).

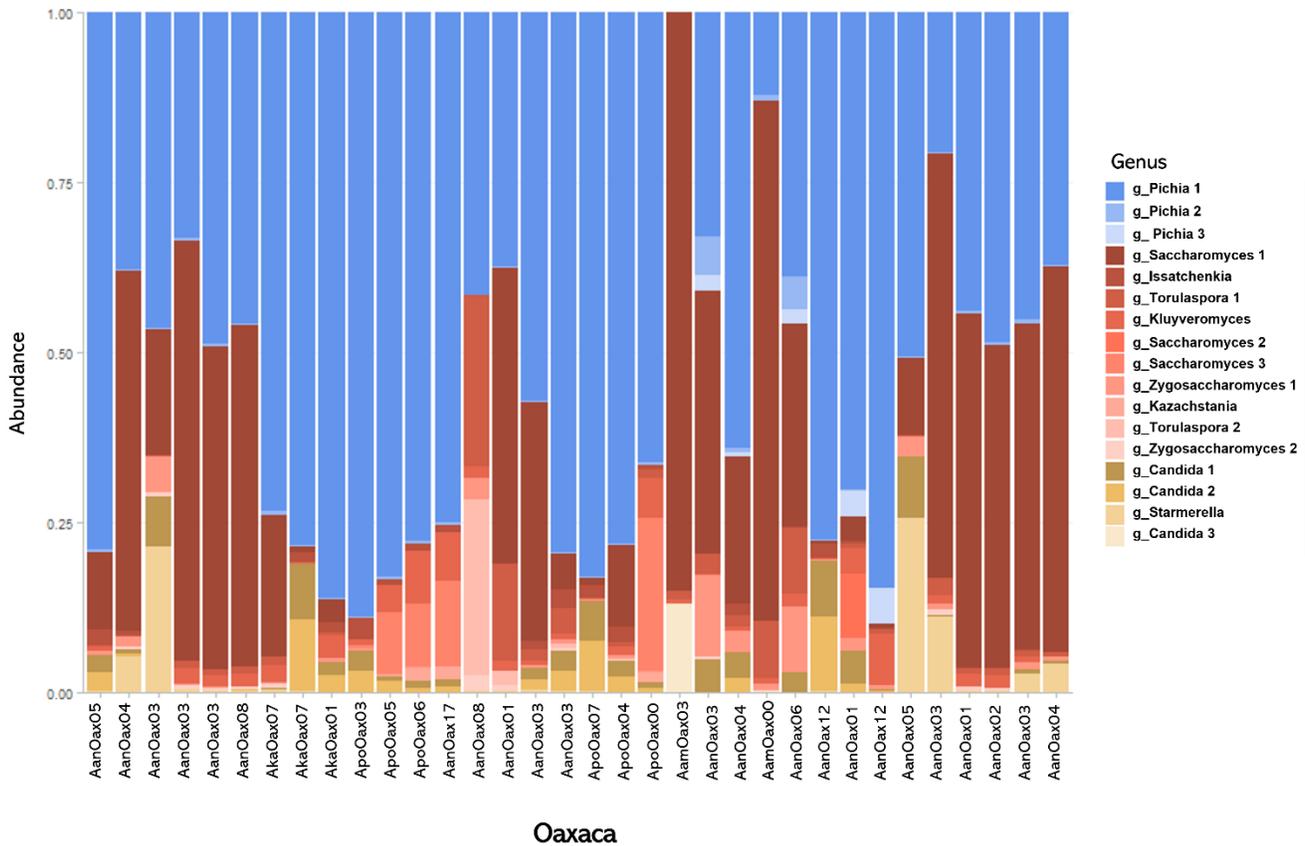


Figura 14. . Gráfico de barras de las abundancias fúngicas para el estado de Oaxaca.

Discusión

Históricamente, los microorganismos han conquistado todos los rincones de la tierra. Bacterias y hongos han demostrado ser capaces de adaptarse a vivir en condiciones extremas de temperatura, altura y pH (Alcon-Giner et al., 2017). Además de ser algunas de las formas más primitivas de vida en la tierra, ambos grupos taxonómicos son fuente de una enorme diversidad de especies. Es incierta la cantidad exacta de especies en cada grupo, pues hasta la fecha sigue habiendo descubrimientos de cepas y especies gracias al esfuerzo gigantesco de proyectos como *Earth Microbiome Project* (Thompson et al., 2017).

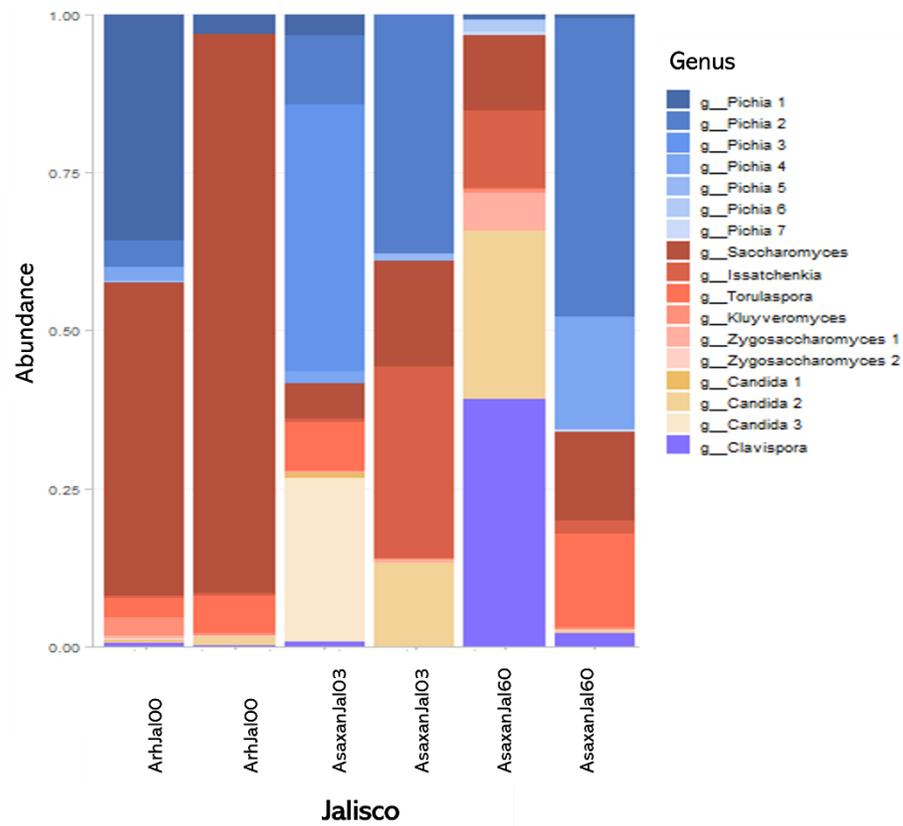


Figura 16. Gráfico de barras de las abundancias fúngicas para el estado de Jalisco.

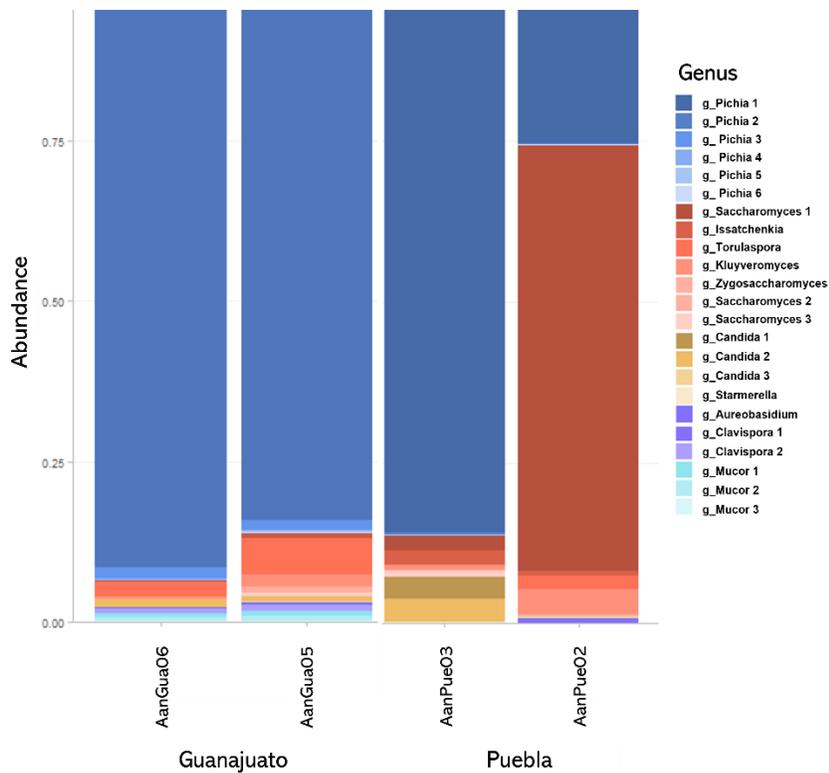


Figura 15. Gráfico de barras de las abundancias fúngicas para los estados de Guanajuato y Puebla.

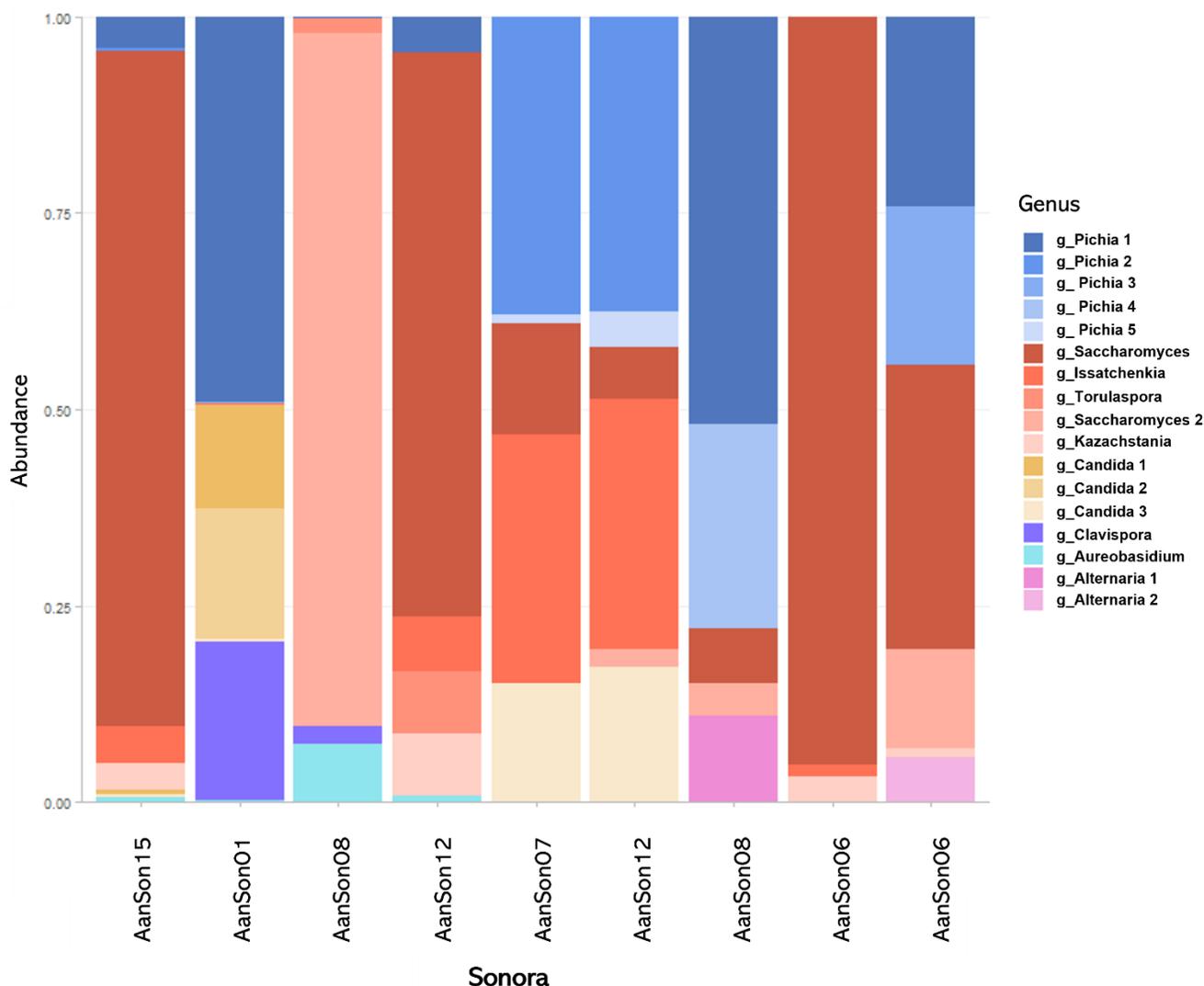


Figura 17. Gráfico de barras de las abundancias fúngicas para el estado de Sonora.

Para poder identificar estos microorganismos, la comunidad científica se apoya en softwares bioinformáticos y las tecnologías de secuenciación. Para caracterizar los microorganismos con mayor especificidad, dos metodologías han prevalecido. Una de ellas es la metagenómica, la cual obtiene el DNA de todo el compendio de organismos en una muestra y después se encarga de reconstruirlos uno a uno (NIH, 2022). Por otro lado, la secuenciación de amplicones o metabarcoding, la cual se aplica en este estudio y se centra en amplificar segmentos específicos del genoma, en este caso la región V4 del gen ribosomal 16S rRNA para bacterias y la región del ITS2 para hongos y levaduras (Braukmann et al., 2009). En este estudio podemos ver la diferencia en número de microorganismos identificados con métodos convencionales a comparación de los métodos de secuenciación. En un estudio previo (Escalante et al., 2008) identificaron y aislaron 11 especies de microorganismos (9 bacterias y 3

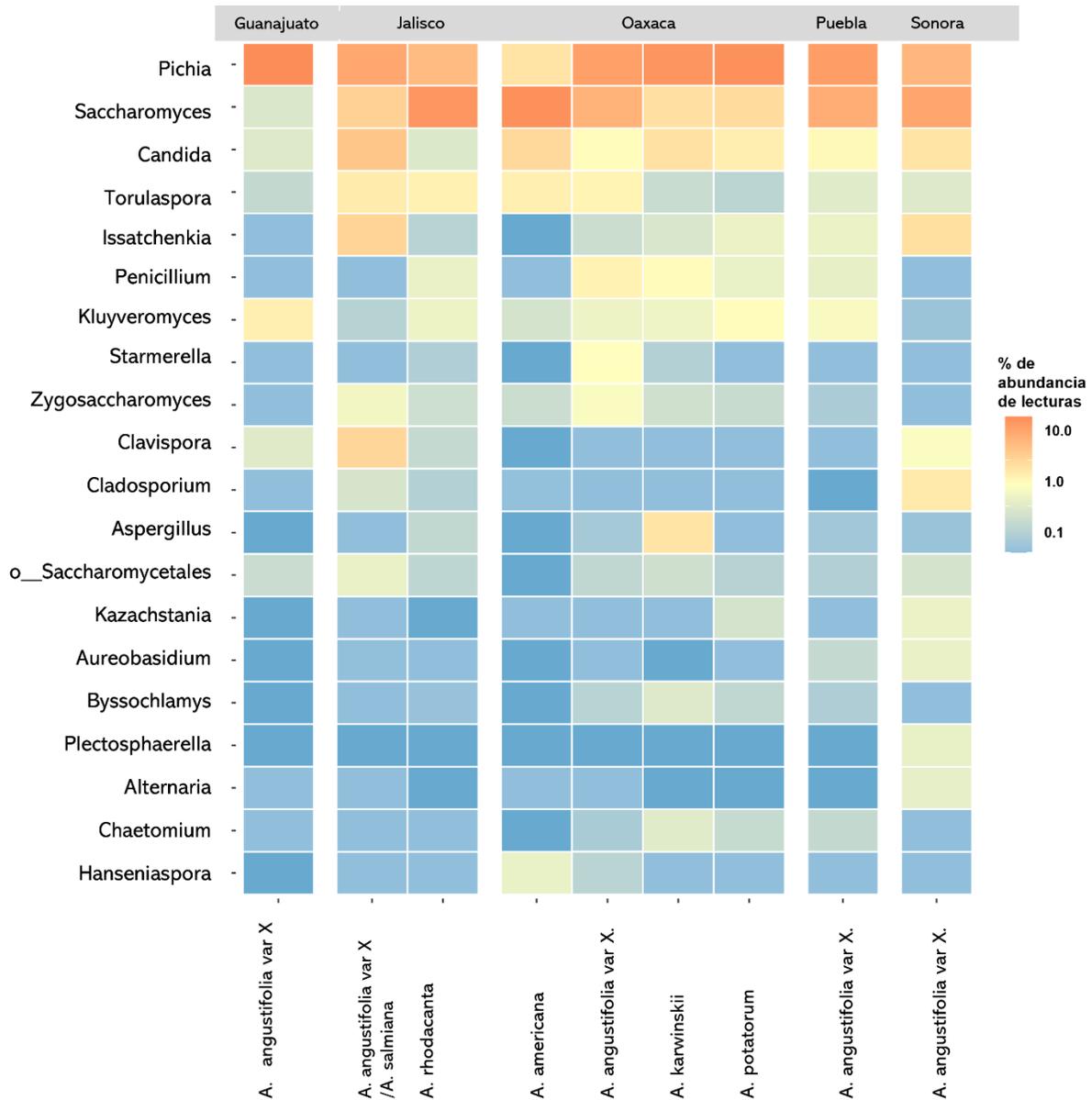


Figura 18. Heatmap de porcentajes de abundancias fúngicas para cada uno de las especies de agave muestreadas para cada estado.

levaduras). En nuestro análisis, se obtuvieron alrededor de ~2000 ASVs representados en 35 géneros bacterianos y poco más 40 géneros de hongos y levaduras.

En bacterias no hubo asignaciones taxonómicas para *Lactobacillus plantarum* y *L. fermentum*, especies que determinamos como núcleo por su identificación en otras bebidas y alimentos fermentados. La razón de este hallazgo puede deberse a varias razones, una de ellas es el fallo técnico en el proceso de PCR y de secuenciación. Con base en lo reportado en otros estudios (Callahan et al., 2021), sabemos que esto ocurre con frecuencia a pesar de seguirse un flujo de trabajo riguroso para identificar estos errores antes del análisis. Otra razón bien documentada depende de la región hipervariable del gen 16S

rRNA que se estudia. Existen un gran número de reportes que validan la teoría de que, de acuerdo con la región hipervariable secuenciada -en este caso V4-, la asignación o identificación será más precisa para grupos taxonómicos específicos (Moreau et al., 2014; Yang et al., 2016).

La misma teoría se tiene para la identificación de hongos y levaduras. A pesar de los intentos de filtrar o corregir estos errores, la limpieza de las secuencias puede representar un problema que también determinará en cierto grado la precisión de las asignaciones taxonómicas o al menos es lo que se discute en los foros de QIIME2 y el github del autor de DADA2. En un intento de corregir el error, las funciones de DADA2 permiten crear un modelo de error en las secuencias que permitirá una posterior y más precisa asignación taxonómica. Sin embargo, la variabilidad en longitud que presenta la región no solo del ITS (Wang et al., 2016) sino la región objetivo, es decir, ITS2, representa un segundo reto para el algoritmo.

Una vez propuesto lo anterior, se discute la falta de ASVs correspondientes a *S. cerevisiae* en este análisis a pesar de la vasta cantidad de recursos genómicos para la especie. En datos crudos, para el género *Saccharomyces*, el 76% de los genomas secuenciados y 87% de los genomas ensamblados para el género pertenecen a *S. cerevisiae* (Bendixsen et al., 2022). Otras especies como *S. paradoxus*, *S. eubayanus*, y *S. uvarum*, han recibido atención moderada debido a los pocos recursos genómicos disponibles atribuidos a su reciente descubrimiento, su distribución geográficamente confinada y el uso percibido que pudieran darles en la industria (Hutzler et al., 2021).

De manera contrastante, encontramos a *S. paradoxus* en nuestro análisis y la discusión del por qué, podría abordarse con varios enfoques; i) una posible hibridación de *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*, ii) la insuficiente especificidad de la región ITS para discernir entre especies y por supuesto iii) errores técnicos. Algunos reportes sugieren que el aislamiento e identificación de cepas híbridas muchas veces dependen de apuntar hacia aquellos ambientes con fluctuaciones permanentes o extremas como intestinos de insectos (Madden et al., 2022; Stefanini, 2018; Sung-Oui et al., 2005), los cuales podrían ser conductos hacia las levaduras híbridas con resistencias y fenotipos metabólicos novedosos. Además, se han demostrado eventos de introgresión de *S. paradoxus* hacia *S. cerevisiae* (Bendixsen et al., 2022; Peter et al., 2018). De hecho, Peter y colaboradores (2008), mencionan que todas las cepas de *S. cerevisiae* han demostrado contener al menos un gen de *S. paradoxus*, sugiriendo el intercambio genético entre estas dos especies. En un estudio previo, (Arnold and Martin, 2010) se discute que la presencia o ausencia de introgresiones de *S. paradoxus* podría revelar la fuerza de los retos medioambientales actuando sobre ciertas poblaciones de *S. cerevisiae*.

El otro enfoque para explicar la ausencia de *S. cerevisiae* es definitivamente la región del ITS. En general, los marcadores fúngicos de ITS incluyen más variabilidad en las secuencias comparado con 18S (Estensmo et al., 2021) y consecuentemente provee mayor resolución interespecífica pero también cierto grado de variabilidad intraespecífica (Nilsson et al., 2008; Schoch et al., 2012). Para hongos y la región ITS, ha sido debatido a qué nivel de similitud las secuencias deberían agruparse para aproximarse al nivel especie (Caporaso et al., 2010; Edgar, 2018; Westcott & Schloss, 2015). Varios reportes indican que el 97% de similitud representa una aproximación razonable (Blaalid et al., 2013; Nilsson et al., 2008). Como se mencionó antes, mientras que por un lado las secuencias de ITS han sido usadas extensivamente para estudios de diversidad fúngica, ha sido ampliamente reconocido que las secuencias de ITS no bastan para distinguir entre algunos grupos taxonómicos (Coleman et al., 2003; Edgar, 2018; Wang et al., 2015; Wang, Mas y Esteve, 2016; Badotti et al., 2017). Otros estudios remarcan la creencia de que un segundo o incluso un tercer *barcode* taxón-específico afinaría los trabajos de identificación de hongos y levaduras (Schoch et al., 2012; Stielow et al. 2015). Con el aumento de los datos genómicos y los estudios ecoevolutivos de diversos hongos, otros *barcodes* para taxones específicos como nLSU, rRNA, TOP1, PGK y LNS2 son las propuestas disponibles (Xu et al., 2016). Y, por último, los errores técnicos que implican desde la amplificación de las secuencias objetivo, errores de secuenciación y sobre todo el procesamiento de los datos genómicos. Una vez que haya más representación taxonómica de hongo, se espera el desarrollo de nuevos *primers* que apunten a la amplificación (virtualmente) de todos los hongos para superar el primer problema.

Composición bacteriana durante la fermentación del agave

Además del agave, se producen una gran cantidad de productos derivados de la fermentación por microorganismos: chicha, olivos, sake, kimchi, cacao, pozol y tepache, por nombrar algunos. Cada uno demuestra tener sus propios actores microbianos, lo cual les brinda variedades de sabores y aromas (Grijalva-Vallejos et al., 2020; Jung et al., 2012; Bokulich et al, 2014; Lucena-Padrós et al., 2014; Moreira et al., 2013; Ulloa, 1976; Mendoza et al., 2017). En el caso particular del agave, además de las inoculaciones con producciones anteriores, también existen otras fuentes de inoculación. Estas pueden ser; herramientas de jimado, insectos y en general el manejo y procesamiento de las piñas por mencionar algunas. También durante el muestreo, notamos, aunque de manera poco frecuente el uso de inóculos de producciones anteriores. Esto permite acelerar el proceso de fermentación en las tinajas. Sin embargo, hay poco o nulo control en estos procesos artesanales y, por tanto, es difícil evitar variaciones en la calidad de distintas fermentaciones (Difo et al., 2015; Roger, Leopold, and Funtong 2015).

Los géneros bacterianos encontrados a lo largo de la fermentación muestran la dominancia de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus* y *Acetobacter*. Se ha encontrado que los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Weissella* tienen una importante capacidad de producción de ácido láctico y, por ende, se les llama bacterias ácido-lácticas o LAB (Tanizawa et al., 2015; Ma et al., 2019; Köberl et al., 2019). *Acetobacter* está incluida en el grupo de bacterias ácido-acéticas (AAB), las cuales brindan propiedades distintas a las bacterias LAB (Mota et al., 2018). También está bien documentada la capacidad de *Oenococcus* de producir alcohol, por tanto, se demuestra la interacción bacteriana alcohol-láctica (Badotti et al., 2014). Diversos estudios apoyan la moción de que las bacterias ácido-lácticas y ácido acéticas, reducen el contenido de taninos, fitatos y polifenoles en muchos procesos artesanales de fermentación, mejora el valor nutricional y la calidad organoléptica de los alimentos (Rizo et al., 2020). Puntualmente, la participación de bacterias en la fermentación es de especial interés debido a la producción de compuestos saborizantes como terpenoides, ésteres, ácido acético, ácido succínico, glicerol y acetaldehído (Jolly et al., 2014). Igualmente participan en microprocesos como la acidificación del medio que permiten a la dinámica microbiana formar sucesiones ecológicas (Ben Omar and Ampe, 2000; Mota et al., 2018).

A nivel especie, la asignación taxonómica identificó las especies *L. farraganis* (productor de ácido láctico y etanol desde una amplia gama de sustratos además de crecer en pH de 4.5). *L. casei* y *L. paracasei* normalmente encontrados en lácteos, pero se encuentran ampliamente distribuidos gracias a clústeres de genes de utilización de carbohidratos, permitiendo la supervivencia a diferentes ambientes (Cai et al., 2009). La presencia de este género es común en la fermentación. Por ejemplo, en otras bebidas fermentadas como el cacao, *Lactobacillus plantarum* y *L. fermentum* fueron las principales especies a lo largo del proceso (Illegheems, K. et al., 2016). En otros casos como la fermentación del olivo en España, se conoce que el proceso es guiado por cepas de la especie *Lactobacillus pentosus* (de Castro et al., 2002; Rejano et al., 2010; Ruiz-Barba and Jiménez-Díaz, 2010).

Además de *Lactobacillus*, en este análisis se identificó la especie *Leuconostoc mesenteroides*, se sabe que son bacterias LAB e importantes productoras de etanol y acetato a partir de carbohidratos (Jung et al., 2011). Por su parte el género *Weissella* ha sido identificada en frutas y vegetales frescos (Masuda et al., 2012) y se sabe que son bacterias LAB. Además, hay estudios que confirman que las especies en este género comparten hasta un 100% de su región dependiendo de la región hipervariable del 16S rRNA que se estudie. Por último, para la especie *Oenococcus oeni* se tiene registro de ser una

bacteria LAB aislada de cachaza, participar en procesos de fermentación del ácido maloláctico y balancear el pH ácido en los vinos (Barata et al., 2012).

Por otro lado, se observaron algunos patrones en el comportamiento de algunos géneros bacterianos a lo largo de la fermentación. Primero, *Komagataeibacter*, *Pediococcus*, *Masillia* y *Gluconobacter* muestran un mismo patrón de aparición gradual a través de las etapas de la fermentación. Se sabe que el género *Komagataeibacter* pertenece a las alfa proteobacterias y ha sido aislado de distintas fuentes con alcohol y azúcar como el vinagre, frutas y nata de coco (Maric et al., 2020). Por su parte, las especies del género *Pediococcus* se caracterizan por la producción de ácido láctico durante la fermentación, se encuentra ampliamente distribuidos en la industria alimentaria y pueden llegar a ser patógenas humanas bajo ciertas condiciones (Leff et al., 2013). Finalmente, el género *Gluconobacter* ha sido identificado en la fermentación de un gran número de frutas sin llegar a ser patógenas (Gupta et al., 2001), así como ser capaces de crecer en medios con altas concentraciones de azúcares y bajos niveles de pH (Prust et al., 2005).

Por otro lado, *Bacillus subtilis*, muestra una mayor abundancia en la etapa inicial de la fermentación, la cual desaparece gradualmente conforme avanza el proceso. Esta especie se caracteriza por crecer rápidamente y tener un ciclo de fermentación corto de cerca de 48 horas, mientras que el de *S. cerevisiae* es de casi 180 horas (Su et al., 2020; Kitagaki and Kitamoto, 2013; Ashizawa 1976). Así mismo, en el tepache, *Bacillus* se muestra como el principal actor de la fermentación (Battcock and Azam-Ali, 1998; Blandino et al., 2003; Wachter, 2004; Resende et al., 2018). Por su parte, *Zymomonas mobilis* en particular, comenzó la fermentación con una mínima abundancia, aumentaron en la etapa intermedia y de nuevo, la abundancia descendió en la etapa final. Esta especie es conocida por su especial capacidad de producción etanólica, además de su amplia distribución (Abarca y Navarrete, 2010).

Influencia de la región geográfica (Estado) en la estructura de la comunidad bacteriana

Los resultados del análisis de diversidad beta muestran que los grupos de regiones geográficas tienen poca diferenciación entre los grupos taxonómicos bacterianos que se comparten entre sí. Esto indica que el número de géneros bacterianos en común, aunque es muy alto, suele ser el mismo o muy similar durante el proceso de fermentación a pesar de la región de producción y de la especie de agave empleada para la fermentación.

Los análisis mediante NMDS permitieron dilucidar la estructura de la comunidad bacteriana y agrupar las muestras de los estados de Sonora y Oaxaca. En el grupo de Oaxaca se contienen el resto de los estados. Los principales géneros bacterianos detectados en el estado de Sonora fueron *Lactobacillus*, *Weissella* y *Leuconostoc* y *Oenococcus* con una leve abundancia de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*. Para Oaxaca, los géneros dominantes se inclinaron hacia *Lactobacillus*, *Weissella* y en una menor proporción *Oenococcus* y *Gluconobacter* presente en todas las muestras.

De manera distinta al núcleo, en Guanajuato se identificaron cerca de 10 especies de *Lactobacillus*, sin embargo, *Leuconostoc mesenteroides* fue el taxón dominante para ambas muestras. Este último, ha sido ampliamente reportado durante la fermentación del vino y pozol, una bebida fermentada tradicional mexicana (Díaz-Ruiz et al., 2003, Matthews et al., 2004, Narváez-Zapata et al., 2010). Como respaldo a los hallazgos hechos en este análisis, otros estudios de fermentación de agave (Escalante et al., 2004; Rocha-Arriaga et al., 2020) mencionan que los géneros predominantes en el pulque son *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Weissella* y *Zymomonas*.

Composición fúngica durante la fermentación del mezcal

A conocimiento de este trabajo, las especies de levaduras identificadas en los procesos de fermentación se dividen en *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*. Estas levaduras no-*Saccharomyces* en general, pueden también hidrolizar carbohidratos complejos como oleuropeína debido a su actividad de beta glucosidasa, en consecuencia, promueven el crecimiento de especies de *Lactobacillus* (Tofalo et al., 2020). En cambio, las cepas de *S. cerevisiae* son conocidas por su desempeño en la producción alcohólica, cualidad que caracteriza al mezcal.

Para levaduras, los resultados de la beta diversidad arrojan una mayor diferenciación entre grupos a comparación de las bacterias. Podemos observar una mayor separación de los grupos, indicando la presencia de géneros específicos que caracterizan a los clústers, lo cual podría estar guiado principalmente por la variable de región geográfica. A pesar de que los índices de diversidad alfa nos muestran ambientes poco diversos, podemos observar que existe una diferenciación marcada. Los géneros fúngicos núcleo implicados en la fermentación corresponden a *Pichia*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Issatchenckia* y *Zygosaccharomyces*. En los diferentes estadios de la fermentación, *Pichia* y *Saccharomyces* se mantuvieron presentes en gran abundancia a lo largo del proceso. Sin embargo, encontramos patrones de dominancia de una sobre la otra, es decir, los escenarios donde cohabitaran con abundancias similares solo fueron identificados en Oaxaca. Por su parte, géneros como *Candida*,

Hanseniaspora, *Zygosaccharomyces* mostraron una disminución de su abundancia conforme avanzaba la fermentación.

En estudios previos en tequila, se demostró que *S. cerevisiae* participa en todas las etapas del proceso de fermentación y junto con *Brettanomyces bruxellensis*, *Pichia kluyveri* y *Pichia membranaefaciens* demuestran ser las especies que mejor crecimiento exhiben en presencia de alcohol a concentraciones de hasta el 7% durante la fermentación en tequila (Lachance, 1995). Sin embargo, estudios más recientes, detallan la caracterización de algunas cepas de *Pichia kluyveri* que fueron aisladas de chichas colombianas, las cuales tenían capacidad de tolerar etanol en un 15% (López y Ramírez, 2010). Además, a algunas levaduras se les ha atribuido la producción de proteínas tóxicas tal como *Pichia membranifaciens*, que produce CYC 1106, toxina activa contra *Candida boindinii* (Santos et al., 2000). Las levaduras del género *Hanseniaspora* se han convertido en especies muy atractivas por su favorable contribución al perfil aromático del vino, cidra (Moreira et al., 2011; Pietrowski et al., 2012), cachaca (Portugal et al., 2017) y chicha (Grijalva-Vallejos et al., 2020). Al mismo tiempo, *Torulasporea delbrueckii* es conocida por ser una especie de levadura altamente osmo y criotolerante (Alves-Araújo et al., 2007).

De manera contrastante al resto, Sonora fue dominada en abundancia por *Saccharomyces*, aún por encima de *Pichia*. También se encontraron los géneros *Kazachstania*, *Aureobasidium* y *Alternaria*. Guanajuato mantuvo una predominancia para *Pichia*, sin embargo, el género *Mucor* se presentó en menor porcentaje. Al mismo tiempo es importante recalcar que la mayor abundancia de *Kluyveromyces marxianus* se encontró en Guanajuato y Oaxaca. Por su parte, Jalisco fue el estado donde se encontró *Torulasporea delbrueckii* en mayor abundancia. Al final de la fermentación, de manera general, los géneros dominantes fueron *Issatchenkia* y *Kluyveromyces*, lo cual podría explicarse de acuerdo con Hernández y colaboradores (2008) quienes reportaron que *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* y *S. cerevisiae* tienen el más amplio espectro de actividad contra levaduras *spoil* que producen sustancias con impacto negativo en la fermentación. En relación con lo anterior, se ha comprobado que especies como *K. marxianus* y *P. kluyveri* tienen la habilidad de producir ésteres (Segura-García et al., 2015) y ser tolerantes a altas concentraciones de etanol (Amaya-Delgado et al., 2013), los cuales brindan la cualidad del aroma al mezcal. Algunos trabajos resaltan una cepa de *K.marxianus* que mejoró la producción de rendimiento de etanol y un rango más amplio de compuestos volátiles comparado con *S. cerevisiae* durante la producción de tequila (López-Álvarez et al., 2012). De manera similar, *K. marxianus* y *P. kluyveri* mostraron una considerable producción de etanol en la fermentación del jugo de agave, con *P. kluyveri* produciendo una mayor concentración de ésteres y

compuestos aromáticos que *S. cerevisiae* (Wittman et al., 2002; Leclercq-Perlat et al., 2004). Algunos autores sugieren que las ventajas de producción y eficiencia en especies no-*Saccharomyces* podrían ser una consecuencia de un sistema más eficiente de adaptación cuando se comparan con *S. cerevisiae* (Grijalva-Vallejos, 2020).

De manera similar en *Agave duranguensis* L. (no usado en este estudio), los géneros de levaduras que predominan durante los primeros días de la fermentación son *Candida*, *Kluyveromyces*, *Torulaspota*, y *Pichia* (Páez-Lerma et al., 2013). Al mismo, se tienen reportes de que las cepas de *S. cerevisiae* no crecen en *A. durangensis* (Alcázar et al., 2019). Por otro lado, Escalante et al., (2008) reportan que *A. salmiana* y *A. durangensis* producen un alto contenido de saponinas, inhibiendo la proliferación de *S. cerevisiae*. En el estado de Jalisco se colectaron muestras de fermento de mosto en combinación de *A. angustifolia* con *A. salmiana* y en todas las muestras con esta combinación, se identificó al género *Saccharomyces* en muy baja abundancia a comparación de los demás taxones presentes. Ha sido comprobado que *A. salmiana* produce grandes cantidades de saponinas y que este compuesto podría inhibir el crecimiento de las levaduras, especialmente de *Saccharomyces* (Yang et al., 2006). En contraste, las especies de levaduras no-*Saccharomyces* poseen la habilidad de crecer en jugos de agaves que contienen altas cantidades de saponinas (Fonseca et al., 2008; Coleman et al., 2010).

Conclusión

Este trabajo es el primero que se hace en más de un estado e incluyendo distintas especies de agaves. Los resultados en este trabajo nos brindan un nuevo panorama en el estudio del proceso de fermentación del mezcal. Además de ser una fuente crucial de datos sobre fermentación en 5 especies de agave y 5 estados del país, este análisis permite dilucidar la diversidad de microorganismos involucrados en la fermentación.

Los resultados de este trabajo arrojan que, los factores que moldean la estructura de la comunidad microbiana bacteriana y fúngica, en mayor medida, son las variables de estado (geografía) y especie de agave. Por otro lado, a pesar de que, gráficamente pudimos observar ligeras variaciones en los cambios de la estructura durante los tiempos de fermentación, no hay pruebas estadísticas suficientes que respalden la hipótesis de que esta variable también moldea la comunidad microbiana.

La dominancia de los géneros tanto bacterianos como fúngicos, en esencia, representa la abundancia de los distintos taxones en la fermentación del agave. A pesar de ello y de los intentos de estandarizar los procesos, los artefactos técnicos son comunes cuando se trata de procesamiento de datos, uso de algoritmos y software.

La estructura de la comunidad de levaduras está mucho más delimitada en comparación con el análisis bacteriano. Esto podría deberse a que el *crosstalking* entre bacterias es un proceso necesario para el desarrollo de la comunidad. De manera contraria, la relación entre levaduras podría ser más antagonista que mutualistas.

Bibliografía

- Arnold, M. L. and Martin, N. H. (2010) Hybrid fitness across time and habitats. *Trends in Ecology and Evolution. Elsevier Ltd*, 25(9), pp. 530–536. doi: 10.1016/j.tree.2010.06.005.
- Adamowicz, S.J. (Guest Editor). 2015. Scientific abstracts from the 6th International Barcode of Life Conference/Résumés scientifiques du 6e congrès international « Barcode of Life ». *Genome*, 58(5): iii. doi:10.1139/gen-2015-0095.
- Abarca Arauz, R. J., & Navarrete Carpio, V. A. (2010-05). Tesis. Recuperado a partir de <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/1968>.
- Sandau, N., Rohr, R. P., Naisbit, R. E., Fabian, Y., Bruggisser, O. T., Kehrl, P., ... & Bersier, L. F. (2014). Including community composition in biodiversity–productivity models. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(8), 815–823.
- Prust, C. et al. (2005). Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nature Biotechnology*, 23(2), pp. 195–200. doi: 10.1038/nbt1062.
- Maric, L. et al. (2020). Description of *Komagataeibacter melaceti* sp. Nov. and *Komagataeibacter melomenus* sp. Nov. Isolated from apple cider vinegar. *Microorganisms* 8(8), 1178.
- Gupta, A., Singh, V. K., Qazi, G. N., & Kumar, A. (2001). *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 3(3), 445–456. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081178a>.
- Masuda, Y. et al. (2012). Characterization and identification of weissellicin Y and weissellicin M, novel bacteriocins produced by *Weissella hellenica* QU 13. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1), pp. 99–108. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05180.x.
- Cai, H. et al (2009). Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of *Lactobacillus casei*: Insights into Their Niche-Associated Evolution. *Genome Biology and Evolution*, Volume 1, 2009, Pages 239–257, <https://doi.org/10.1093/gbe/evp019>.
- Badotti, F. et al. (2014). *Oenococcus alcoholitolerans* sp. nov., a lactic acid bacteria isolated from cachaça and ethanol fermentation processes. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 106(6), pp. 1259–1267. doi: 10.1007/s10482-014-0296-z.

- Mota, J. et al. (2018). Dynamics and biodiversity of bacterial and yeast communities during fermentation of cocoa beans. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19). doi: 10.1128/AEM.01164-18.
- Alves-Araújo, C. et al. (2007). Sugar utilization patterns and respiro-fermentative metabolism in the baker's yeast *Torulaspora delbrueckii*. *Microbiology* 153, 898–904.
- Badotti, F. et al (2017). Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). *BMC Microbiology*, 17(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s12866-017-0958-x.
- Battcock, M., y S. Azam-Ali. (1998). Fermented fruits and vegetables. A global perspective. FAO, Rome, Italy.
- Blandino et al (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 36 (6):527–543. doi:10.1016/S0963-9969(03)00009-7.
- Ben Omar, N. and Ampe, F. (2000). Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), pp. 3664–3673. doi: 10.1128/AEM.66.9.3664-3673.2000.
- Coleman, A. W. (2003). ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics*, 19(7), pp. 370–375. doi: 10.1016/S0168-9525(03)00118-5.
- Díaz-Ruiz G., et al. (2003). Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. *Appl Environ Microbiol* 69:4367–4374.
- De Castro, A., et al. (2002). Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter culture for Spanish- style green olive fermentation. *Food Microbiol.* 19, 637–644.
- Edgar, R. C. (2018). Accuracy of taxonomy prediction for 16S rRNA and fungal ITS sequences. 1, pp. 1–29. doi: 10.7717/peerj.4652.
- Estensmo, E. L. F. et al. (2021). The influence of intraspecific sequence variation during DNA metabarcoding: A case study of eleven fungal species. *Molecular Ecology Resources*, 21(4), pp. 1141–1148. doi: 10.1111/1755-0998.13329.
- López, W., Ramírez, M., (2010). Diversidad de levaduras asociadas a chichas tradicionales de Colombia. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 12, 176–186.
- Matthews A., et al. (2004) Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Appl Environ Microbiol* 70:5715–5731.
- Moreira, N., et al. (2011). Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food Control* 22, 662–667.

- Narváez-Zapata, J. A. et al (2010). Culture-independent analysis of lactic acid bacteria diversity associated with mezcal fermentation. *Current Microbiology*, 61(5), pp. 444–450. doi: 10.1007/s00284-010-9636-z.
- Pietrowski, G.A.M., et al. (2012). Influence of fermentation with *Hanseniaspora* sp. yeast on the volatile profile of fermented apple. *J. Agric. Food Chem.* 60, 9815–9821.
- Portugal, C.B., et al. (2017.) How native yeasts may influence the chemical profile of the Brazilian spirit, cachaça. *Food Res. Int.* 91, 18–25.
- Rejano, L., et al. (2010). Table olives: varieties and variations. In: Preedy, V.R., Watson, R.R. (Eds.), *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Academic Press, Oxford, pp. 5–15.
- Resende, L.V., et al. (2018). Microbial community and physicochemical dynamics during the production of ‘Chicha’, a traditional beverage of indigenous people of Brazil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34, 1–11.
- Ruiz-Barba, J.L., et al (2010). Coculture with specific inducing bacteria notably enhances survival of the autoinducer-regulated bacteriocin producer *Lactobacillus plantarum* NC8 in olive fermentations. *Food Microbiol.* 27, 413–417.
- Schoch, C.L., et al (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109: 6241–6246. doi: 10.1073/pnas.1117018109. PMID:22454494.
- Stielow, J.B., et al (2015). One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Pers.: Mol. Phyl. Evol. Fungi*, 35: 242– 263. doi:10.3767/003158515X689135.
- Tofalo, R. et al. (2020). The life and times of yeasts in traditional food fermentations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor & Francis, 60(18), pp. 3103–3132. doi: 10.1080/10408398.2019.1677553.
- Xu, J. et al (2016). Fungal DNA barcoding – Genome. *Genome*, 59(August), pp. 913–932.
- Jung et al (2011). Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (7):2264–2274. doi:10.1128/AEM.02157-10.
- Bokulich et al (2014). Indigenous bacteria and fungi drive traditional kimoto sake fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), pp. 5522–5529. doi: 10.1128/AEM.00663-14.
- Illegghems, K. et al (2016). Assessment of the contribution of cocoa-derived strains of *Acetobacter ghanensis* and *Acetobacter senegalensis* to the cocoa bean fermentation process through a genomic approach. *Food Microbiology*. Elsevier Ltd, 58, pp. 68–78. doi: 10.1016/j.fm.2016.03.013.

- Leclercq-Perlat, M.N., et al. (2004). Comparison of volatile compounds produced in model cheese medium deacidified by *Debaryomyces hansenii* or *Kluyveromyces marxianus*. *J Dairy Sci* 87, 1545–1550.
- Wittmann, C., Hans, M. and Bluemke, W. (2002) Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast* 19, 1351–1363.
- Kitagaki H, and Kitamoto K. (2013). Breeding research on sake yeasts in Japan: history, recent technological advances, and future perspectives. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 4:215–235. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182545>.
- Ashizawa T. (1976). The mystery of Japanese sake brewing focused on kimoto. *J. Brew. Soc. Japan* 71:424–427. <http://dx.doi.org/10.6013/jbrewsocjapan1915.71.424>.
- Fonseca, G. G., et al. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 339–354. doi: 10.1007/s00253-008-1458-6
- López-Alvarez, A., et al. (2012). Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPe- 1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. *J. Biosci. Bioeng.* 113, 614–618. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.12.015
- Amaya-Delgado, L., et al. (2013). Performance evaluation of *Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in industrial tequila fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 875–881. doi: 10.1007/s11274-012-1242-8.
- Yang C. R., et al. (2006). Antifungal activity of C-27 steroidal saponins. *Antimicrob Agents Chemother* 50(5):1710–1714. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1710-1714.2006>,
- Coleman JJ, et al. (2010). Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. *ACS Chem Biol* 5(3): 321–332. <https://doi.org/10.1021/cb900243b>.
- Grijalva-Vallejos, N., Aranda, A. and Matallana, E. (2020). Evaluation of yeasts from Ecuadorian chicha by their performance as starters for alcoholic fermentations in the food industry. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, 317(August 2019), p. 108462. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108462.
- Alcázar M, et al. (2017). Effect of steroidal saponins from Agave on the polysaccharide cell wall composition of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *LWT Food Sci Technol* 77:e1–e439. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.048>].
- Escalante-Minakata, P. et al (2008). Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*. *Letters in Applied Microbiology*, 46(6), pp. 626–630. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02359.x.

- Escalante, A. et al (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 235(2), pp. 273–279. doi: 10.1016/j.femsle.2004.04.045.
- Wacher, C. (2004). Alimentos y bebidas fermentados tradicionales. In *Bioteconología Alimentaria*, ed. G. Garibay, Q. Ramírez, L. Munguía. 313-343. México: Limusa.
- Callahan, B., McMurdie, P. & Holmes, S. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J* 11, 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Tanizawa, Y. et al (2015). Complete genome sequence and analysis of *Lactobacillus hokkaidonensis* LOOC260T, a psychrotrophic lactic acid bacterium isolated from silage. *BMC Genomics*, 16(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s12864-015-1435-2.
- Köberl, M. et al (2019). Deciphering the microbiome shift during fermentation of medicinal plants. *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-019-49799-2.
- Wang, C., Mas, A. and Esteve-Zarzoso, B. (2016). The interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast during alcoholic fermentation is species and strain specific. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), pp. 1–11. doi: 10.3389/fmicb.2016.00502.
- Rizo, J. et al (2020). Omics in traditional vegetable fermented foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor & Francis, 60(5), pp. 791–809. doi: 10.1080/10408398.2018.1551189.
- Difo, V. H., et al. (2015). Changes in nutrient and antinutrient composition of *Vigna racemosa* flour in open and controlled fermentation. *Journal of Food Science and Technology* 52 (9):6043–6048. doi:10.1007/s13197-014-1637-7
- Roger, T., T. N. Léopold, and C. M. Funtong. (2015). Nutritional properties and antinutritional factors of corn paste (Kutukutu) fermented by different strains of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2015:1–13. doi:10.1155/2015/502910.
- Braukmann, T. W. A. et al (2019). Metabarcoding a diverse arthropod mock community. *Molecular Ecology Resources*, 19(3), pp. 711–727. doi: 10.1111/1755-0998.13008.
- Thompson, L. R. et al (2017). A communal catalogue reveals Earth’s multiscale microbial diversity. *Nature*, 551(7681), pp. 457–463. doi: 10.1038/nature24621.
- Alcon-Giner, C. et al (2017). Optimisation of 16S rRNA gut microbiota profiling of extremely low birth weight infants. *BMC Genomics*, 18(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/s12864-017-4229-x.
- Bendixsen, D. P., Frazão, J. G. and Stelkens, R. (2022). *Saccharomyces* yeast hybrids on the rise. *Yeast*, 39(1–2), pp. 40–54. doi: 10.1002/yea.3684.

- Hutzler, M., et al. (2021). Unique brewing-relevant properties of a strain of *Saccharomyces jurei* isolated from ash (*Fraxinus excelsior*). *Frontiers in Microbiology*, 12, 681. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.645271>
- Jung, J. Y. et al (2012). Effects of *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 153(3), pp. 378–387. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.030.
- Moreira, I. M. da V. et al (2013). Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. *Food Research International*. Elsevier Ltd, 54(1), pp. 9–17. doi: 10.1016/j.foodres.2013.06.001.
- Ulloa, M., Herrera, T., (1976). Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: pozol, tesgüino, pulque, colonche y tepache. *An. Inst. Biol. UNAM*. 145–163.
- Maruyama, H. et al (2020). Amplicon Sequence Variant-Based Oral Microbiome Analysis Using QIIME 2. *Journal of Osaka Dental University*, 54(2), pp. 273–281. doi: 10.20944/preprints202008.0206.v1.
- Wang, X. C. et al (2015). ITS1: A DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes?. *Molecular Ecology Resources*, 15(3), pp. 573–586. doi: 10.1111/1755-0998.12325.
- Callahan, M. B. et al (2021). ‘Package “dada2”’.
- Moreau, M. M. et al (2014). Illumina sequencing of the V4 hypervariable region 16S rRNA gene reveals extensive changes in bacterial communities in the cecum following carbohydrate oral infusion and development of early-stage acute laminitis in the horse. *Veterinary Microbiology*. Elsevier B.V., 168(2–4), pp. 436–441. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.11.017.
- Yang, B., Wang, Y. and Qian, P. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, pp. 1–8. doi: 10.1186/s12859-016-0992-y.
- Aldrete, J. A. et al (2020). Yeast and bacterial diversity, dynamics and fermentative kinetics during small-scale tequila spontaneous fermentation. *Food Microbiol.*, 86. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103339>.
- Horisawa, S., Sakuma, Y. and Doi, S. (2013). Identification and species-typing of wood rotting fungi using melting curve analysis. *Journal of Wood Science*, 59(5), pp. 432–441. doi: 10.1007/s10086-013-1349-z.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 153(3), pp. 243–259. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025.

- Barreto, R. and Gladys, J. N. (2010). Influence of plant growth regulators and water stress on ramet induction, rosette engrossment, and fructan accumulation in *Agave tequilana* Weber var. Azul. (October). doi: 10.1007/s11240-010-9758-9.
- Bolyen, E. et al (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), pp. 852–857. doi: 10.1038/s41587-019-0209-9.
- Cabrol, L., et al. (2012) Bacterial dynamics in steady-state bio- filters: beyond functional stability. *FEMS Microbiol Ecol* 79: 260–271.
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., & Romano, P. (2012). Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneously fermenting grapes from an Italian “heroic vine-growing area.” *Food Microbiology*, 31(2), 159–166. doi:10.1016/j.fm.2012.03.010.
- Capozzi, V. et al (2015). Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological Research*. Elsevier GmbH., 181, pp. 75–83. doi: 10.1016/j.micres.2015.10.005.
- Castro, C. D., Koretsky, A. P., & Domach, M. M. (1999). NMR-Observed Phosphate Trafficking and Polyphosphate Dynamics in Wild-Type and *vph1-1* Mutant *Saccharomyces cerevisiae* in Response to Stresses. *Biotechnology Progress*, 15(1), 65–73. doi:10.1021/bp9800743
- Clemente-Jimenez, JM. et al (2004). Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. Elsevier. *Food Microbiology*. 21, pp. 149–155. doi: 10.1016/S0740-0020(03)00063-7.
- Clarridge, J. E (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), pp. 840–862. doi: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.
- Colunga-García Marín, P. et al (2008) En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves, *Revista de la Universidad Autónoma de Yucatán*. Available at: <http://www.cirsociales.uady.mx/revUADY/pdf/245-6/ru245-612.pdf>.
- Comitini, F. et al (2004). *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera* / *Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS*, 238, pp. 235–240. doi: 10.1016/j.femsle.2004.07.040.
- Comitini, F. et al (2011). Selected non- *Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*. Elsevier Ltd, 28(5), pp. 873–882. doi: 10.1016/j.fm.2010.12.001.
- Cuvas-Limon, R. B. et al (2020). Spontaneously fermented traditional beverages as a source of bioactive compounds: an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor & Francis, 0(0), pp. 1–23. doi: 10.1080/10408398.2020.1791050.

- Cray J.A., et al. (2013). The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? *Microb Biotechnol* 6: 453–492. In press DOI: 10.1111/1751-7915.12027
- De León-Rodríguez, A. et al (2006). Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 1337–1341. <https://doi.org/10.1021/jf052154+>
- ter Braak, C. J. F. (1995). Ordination. In *Data analysis in community and landscape ecology* (pp. 91–274). *Cambridge University Press*.
- Desgarences, D. et al (2014). Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated *Agave* species. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 90, 844–857. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12438>.
- White, T. J., et al. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315–322.
- Bender, M., Holben, W. E., Sørensen, S. J., & Jacobsen, C. S. (2007). Use of a PNA probe to block DNA-mediated PCR product formation in prokaryotic RT-PCR. *Biotechniques*, 42(5), 609–614.
- Taerum, S. J., et al. (2020). Validation of a PNA clamping method for reducing host DNA amplification and increasing eukaryotic diversity in rhizosphere microbiome studies. *Phytobiomes Journal*, 4(4), 291–302.
- Baggi, G., Cavalca, L., Francia, P., & Zangrossi, M. (2004). Chlorophenol removal from soil suspensions: effects of a specialised microbial inoculum and a degradable analogue. *Biodegradation*, 15, 153–160.
- Eberhardt, U. (2010). A constructive step towards selecting a DNA barcode for fungi. *New Phytologist*, 187(2), pp. 265–268. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03329.x.
- Eldarov, M.A., Mardanov, A.V., (2020). Metabolic engineering of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes* 11, 964, <http://dx.doi.org/10.3390/genes11090964>.
- Escamilla-Treviño, L. L. (2012). Potential of Plants from the Genus *Agave* as Bioenergy Crops. *Bioenergy Research*, 5(1), pp. 1–9. doi: 10.1007/s12155-011-9159-x.
- Fernández, M., Úbeda, J. & Briones, A. (2000). Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. *International Journal of Food Microbiology*, 59(1-2), 29–36. doi:10.1016/S0168-1605(00)00283-x.
- Fleet, G.H. (2003) Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.*, 86, 11–22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00245-9).
- Fonseca-García, C. et al (2016) The Cacti Microbiome: Interplay between habitat-filtering and host-specificity. *Front. Microbiol.*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00150>.

- García-Mendoza, A. (1998). Con Sabor a Maguey. Guía de la Colección Nacional de Agaváceas y Nolináceas del Jardín Botánico, *Instituto de Biología - UNAM. Mexico: UNAM-SIGSA*.
- García-Mendoza, A. J., and Chávez-Rendón, C. (2013). Agave kavandivi (Agavaceae: grupo Striatae), una especie nueva de Oaxaca, México. *Rev. Mex. Biodivers.* 84, 1070–1076. doi: 10.7550/rmb.35241
- Gentry, H. S. (1982). Agaves of continental North America. Tucson, AZ: University of Arizona Press.
- Giudici, P., L. De Vero, and M. Gullo. (2017). Acetic acid bacteria: Fundamentals and food applications. In *Vinegars*, ed. I. Y. Sengun, 261–87. Boca Raton, FL: *CRC Press*. doi: 10.17113/ftb.56.02.18.5593).
- Glassman, S. I. and Martiny, J. B. H. (2018). Broad-scale Ecological Patterns Are Robust to Use of Exact. *mSphere*, 3(4), pp. e00148-18.
- Gorter de Vries, A.R., Pronk, J.T., Daran, J.G., (2019). Lager-brewing yeasts in the era of modern genetics. *FEMS Yeast Res.* 19 (7), foz063, <http://dx.doi.org/10.1093/femsyr/foz063>
- Hernández-Valdepeña, M. A., Pedraza-Chaverri, J., Gracia-Mora, I., Hernández Castro, R., Sánchez-Bartez, F., Nieto-Sotelo, J. et al (2016). Suppression of the tert-butylhydroquinone toxicity by its grafting onto chitosan and further cross-linking to agavin toward a novel antioxidant and prebiotic material. *Food Chem.* 199, 485–491. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.12.042
- Howell, A. D. J. and Roth, B. S. (2015). Ecological Society of America Sexual Reproduction in Agaves : The Benefits of Bats ; The Cost of Semelparous Advertising SEXUAL REPRODUCTION IN AGAVES : THE BENEFITS OF BATS ; THE COST OF SEMELPAROUS ADVERTISING ”. *62*(1), pp. 1–7.
- Johnson, J. S. et al (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*. Springer US, 10(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41467-019-13036-1.
- Jolly, N. P., Varela, C. and Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: Non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14(2), pp. 215–237. doi: 10.1111/1567-1364.12111.
- Kurtzman, C. P. (2014). Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. *Int J Sys Evol Microbiol*, pp. 325–332. doi: 10.1099/ijms.0.054197-0.
- Kutyna, D. R. et al (2010). Microbiological approaches to lowering ethanol concentration in wine. *Trends in Food Science & Technology*. Elsevier Ltd, 21(6), pp. 293–302. doi: 10.1016/j.tifs.2010.03.004.
- Lachance, M.A. (1995) Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 68, 151–160. <https://doi.org/10.1007/BF00873100>.

- Masih, E. I. et al (2001). Characterization of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. Oxford Academic. *FEMS Microbiology Letters*, 202, pp. 227–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10808.x>
- Masoud, W., & Jespersen, L. (2006). Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 110(3), 291–296. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.030.
- Maturano, Y. P., et al. (2012). Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 155(1-2), 43–50. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.015.
- Mendoza LM, Neef A, Vignolo G, Belloch C (2017). Yeast diversity during the fermentation of Andean chicha: a comparison of high- throughput sequencing and culture-dependent approaches. *Food Microbiol* 67:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.05.007>.
- Nieto-Sarabia, V. L. et al (2022). Isolation, identification, and kinetic and thermodynamic characterization of a *Pichia kudriavzevii* yeast strain capable of fermentation. *Food and Bioproducts Processing*. Institution of Chemical Engineers, 131, pp. 109–124. doi: 10.1016/j.fbp.2021.10.013.
- Karlin, S. et al (2001). Characterizations of highly expressed genes of four fast-growing bacteria. *Journal of Bacteriology*, 183(17), pp. 5025–5040. doi: 10.1128/JB.183.17.5025-5040.2001.
- Prodan, A. et al (2020). Comparing bioinformatic pipelines for microbial 16S rRNA amplicon sequencing. *PLoS ONE*, 15(1), pp. 1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0227434.
- Raja, H. A. et al (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 80(3), pp. 756–770. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b01085.
- Ramos, C. L., and R. F. Schwan. (2017). Technological and nutritional aspects of indigenous Latin America fermented foods. *Current Opinion in Food Science* 13:97–102. doi: 10.1016/j.cofs.2017.07.001
- Randazzo, C.L., et al. (2010). Pecorino Crotonese cheese: study of bacterial population and flavour compounds. *Food Microbiol* 27: 363–374.
- Rocha-Arriaga, C. et al (2020). Deep microbial community profiling along the fermentation process of pulque, a biocultural resource of Mexico. *Microbiol. Res*, 241, p. 126593. doi: 10.1016/j.micres.2020.126593.

- Rojas-Martínez, A. et al (1999). Seasonal distribution of the long-nosed bat (*Leptonycteris curasoae*) in North America: Does a generalized migration pattern really exist? *Journal of Biogeography*, 26(5), pp. 1065–1077. doi: 10.1046/j.1365-2699.1999.00354.x.
- Romano, P. et al (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.*, 86, 169–180. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00290-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00290-3).
- Santos-Zea, L. et al (2012). Agave (*Agave* spp.) and its Traditional Products as a Source of Bioactive Compounds. *Current Bioactive Compounds*, 8(3), pp. 218–231. doi: 10.2174/157340712802762410.
- Simpson, J., et al. (2011). Genomic resources and transcriptome mining in *Agave tequilana*. *GCB Bioenergy* 3, 25–36. doi: 10.1111/j.1757-1707.2010.01079.x
- Szopinska, A., & Morsomme, P. (2010). Quantitative Proteomic Approaches and Their Application in the Study of Yeast Stress Responses. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 14(6), 639–649. doi:10.1089/omi.2010.0045.
- The Angiosperm Phylogeny Group, (2009). An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: *APG III. Bot. J. Linn. Soc.* 161, 105–121. doi: 10.1016/j.jep.2015.05.035
- Valenzuela-González, F. et al (2015). El Gen aRRN 16s en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias Marinas*, 41(4), pp. 297–313. doi: 10.7773/cm.v41i4.2492.
- Vargas-Albores, F. et al (2017). Size-variable zone in V3 region of 16S rRN. *RNA Biology*, 14(11), pp. 1514–1521. doi: 10.1080/15476286.2017.1317912.
- Verdugo Valdez, A. et al (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave salmiana*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 100, 497–506. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9605-y>.
- Walker, L. M., Hoppe, T. and Silliker, M. E. (2017). Molecular Techniques and Current Research Approaches. In: Steven L. Stephenson and Carlos Rojas, ed. *Myxomycetes: Biology, Systematics, Biogeography and Ecology*. EUA: Elsevier Inc., 145-173. doi: 10.1016/B978-0-12-805089-7.00005-6.
- Weiler, F. and Schmitt, M. J. (2003). Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. Oxford Academic. *FEMS Yeast Research*. 3, pp. 69–76. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2003.tb00140.x>
- Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. (1995). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Blackie Academic and Professional, London. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0>
- Yilmaz P., et al. (2014). The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. [Nucl. Acids Res.](https://doi.org/10.1093/nar/nkt020) 42:D643-D648

Quast C., et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. [↗](#)*Nucl. Acids Res.* 41 (D1): D590-D596.

Yarza, P., et al (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol* 12, 635–645. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>