

**Evaluación de la microbiota residente en
superficies de una industria cárnica
mediante el empleo de secuenciación de alta
resolución**

Marcela Ramos Fernández

Trabajo presentado para la superación de los 15 créditos del Módulo de Trabajo Fin de
Máster del Máster Oficial en Calidad de Alimentos de Origen Animal

Trabajo dirigido por:
Dra. Carolina Ripollés Ávila y Dr. Pedro Rodríguez López

Facultat de Veterinària
Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Barcelona, julio 2023

Declaración de autoría

Marcela Ramos Fernández, como estudiante del Máster Oficial en Calidad de Alimentos de Origen Animal y como autora de este Trabajo de Fin de Máster.

Declaro que,

El trabajo que presento para su exposición y defensa es original y no he utilizado fuentes de información sin mencionar de forma clara y estricta en su origen, tanto en el cuerpo del texto como en la bibliografía. Asimismo, soy plenamente consciente de que el hecho de no respetar estos términos es objeto de sanciones universitarias y/o de otro orden.

Carolina Ripollés Ávila, profesora lectora Serra Hunter del Área de Nutrición y Bromatología, y Pedro Rodríguez López, investigador postdoctoral María Zambrano del Área de Nutrición y Bromatología, del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona.

INFORMAN,

Que el trabajo de investigación titulado: *“Evaluación de la microbiota residente en superficies de una industria cárnica mediante el empleo de secuenciación de alta resolución”* ha sido realizado bajo nuestra dirección por Marcela Ramos Fernández, dentro del módulo “Trabajo Fin de Máster” del Máster Oficial de Calidad de Alimentos de Origen Animal de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Y para que conste donde proceda, se firma el presente en Bellaterra (Cerdanyola del Vallés) a 28 de julio de 2023.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Inocuidad y seguridad alimentaria	3
1.2. Los <i>biofilms</i> en la industria alimentaria	4
1.3. Interacciones establecidas entre microorganismos que componen una comunidad microbiana	5
1.4. Limitaciones de las metodologías convencionales en la detección e identificación de microorganismos	7
1.5. Secuenciación de Alta Resolución	8
1.6. Análisis metagenómico del gen ARN ribosomal 16S	9
1.7. Propiedades del ARNr 16S para su uso como implemento filogenético y taxonómico	9
1.8. Hipótesis y objetivos del trabajo	10
2. MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1. Superficies de estudio	11
2.2. Pruebas previas para el procedimiento de amplificación del ADN	12
2.3. Extracción del ADN	13
2.4. Preparación de la biblioteca de amplicones para la secuenciación	13
2.4.1. Primera etapa de PCR y purificación del ADN	13
2.4.2. Segunda etapa de PCR y purificación del ADN	14
2.4.3. Cuantificación y validación de la librería	15
2.4.4. Dilución de las librerías a la concentración inicial de carga	16
2.4.5. Agrupación y carga de las librerías en el secuenciador iSeq 100	16
2.4.6. Secuenciación de extremos emparejados	17
2.5. Análisis bioinformático y procesamiento de datos	17
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
3.1. Optimización del protocolo de amplificación del ADN	19
3.2. Optimización de la técnica de secuenciación de alta resolución	21
3.3. Microbiota presente en superficies industriales a partir del análisis por secuenciación de alta resolución	23
3.4. Abundancia de microorganismos por métodos convencionales	30
4. CONCLUSIONES	33
5. BIBLIOGRAFÍA	34

LISTA DE ABREVIATURAS:

µM, nM, pM: “Micromolar”, “Nanomolar”, “Picomolar”

µL: “Microlitro”

ADN: “Ácido Desoxirribonucleico”

AM: “Aerobios Mesófilos”

ARN: “Ácido Ribonucleico”

EFSA: “*European Food Safety Authority* (Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria)”

ETAs: “Enfermedades de Transmisión Alimentaria”

FAO: “*Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)”

HTS: “*High-Throughput Sequencing* (Secuenciación de Alta Resolución)”

LRM: “*Local Run Manager* (Administrador de Ejecuciones Locales)”

NCBI: “*National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Información Biotecnológica)”

ng: “Nanogramo”

ng/µL: “Nanogramo por microlitro”

NGS: “*Next-Generation Sequencing* (Secuenciación de Próxima Generación)”

pb: “Pares de bases”

PCR: “*Polymerase Chain Reaction* (Reacción en Cadena de la Polimerasa)”

RDP: “*Ribosomal Database Project* (Proyecto de Base de Datos Ribosomal)”

UNIT: “Instituto Uruguayo de Normas Técnicas”

UTOs: “Unidades Taxonómicas Operativas”

VBNC: “*Viable But Non-Culturable* (Viable pero No Cultivable)

LISTA DE TABLAS:

Tabla 1. Distribución de las muestras analizadas.....	11
Tabla 2. Descripción de las muestras utilizadas para la optimización del protocolo de amplificación del ADN.....	12
Tabla 3. Porcentajes de lecturas totales por nivel taxonómico en las dos corridas de prueba, siendo la primera a una concentración 50 pM de muestra y 20 % de PhiX, y la segunda a 10 pM de muestra y 25 % de PhiX.....	23
Tabla 4. Índices de diversidad alfa y Unidades Taxonómicas Operativas (UTOs) obtenidas del análisis metagenómico de las muestras de una industria de procesamiento de cerdo ibérico.....	30

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1. Esquema del complejo ribosómico y el gen ARNr 16S.....	10
Figura 2. Librería luego de su preparación lista para ser secuenciada.	15
Figura 3. Gel de electroforesis con muestras de prueba para la optimización del protocolo de amplificación del ADN	20
Figura 4. Porcentajes de lecturas clasificadas por nivel taxonómico para la muestra M4, correspondiente a la pared de la cámara oreo de canales de la industria de procesamiento de cerdo ibérico evaluada.	22
Figura 5. Abundancias relativas de phylum obtenidas en los ensayos metagenómicos del gen ARNr 16S de las muestras de una industria de procesamiento de cerdo ibérico.. ..	24
Figura 6. Abundancias relativas de familias obtenidas en los ensayos metagenómicos del gen ARNr 16S de las muestras de una industria de procesamiento de cerdo ibérico.. ..	26
Figura 7. Abundancias relativas de géneros obtenidas en los ensayos metagenómicos del gen ARNr 16S de las muestras de una industria de procesamiento de cerdo ibérico.. ..	27
Figura 8. Abundancias relativas de diferentes grupos microbiológicos provenientes del estudio de Mazaheri, (2022).	32

RESUMEN:

El crecimiento poblacional ha incrementado la demanda de alimentos y la intensificación en la agricultura y ganadería, lo cual conlleva una mayor responsabilidad para las autoridades sanitarias en garantizar la inocuidad alimentaria y prevenir enfermedades transmitidas por alimentos. Las superficies industriales juegan un rol crítico en la contaminación microbiana de los alimentos, por lo que es crucial comprender el ecosistema presente en estas superficies y contar con sistemas efectivos de vigilancia y control para asegurar la inocuidad de los productos. En este estudio, se analizó la microbiota de una industria cárnica mediante técnicas de secuenciación de alta resolución. Se evaluaron muestras de seis áreas distintas para clasificar los microorganismos identificados según su dominancia, conocer perfiles de riqueza y equitatividad ecológica, y comparar los perfiles de abundancia entre métodos de microbiología convencional y secuenciación masiva. Los resultados revelaron una dominancia del phylum Proteobacteria en las muestras ambientales, destacando las familias *Brucellaceae*, *Staphylococcaceae*, *Moraxellaceae* y *Pseudomonadaceae*, en concordancia con investigaciones previas. También se identificaron microorganismos típicos de *biofilms* alimentarios en todos los puntos de muestreo, como *Enterococcaceae*, *Oxalobacteraceae* y *Caulobacteraceae*. A nivel de género, *Pseudomonas* fue el más abundante entre las diez muestras analizadas. Los índices de diversidad alfa indicaron una menor diversidad y mayor dominancia a nivel taxonómico de phylum, especialmente en Proteobacteria. Sin embargo, a nivel de familia y género, se observó mayor diversidad en todas las muestras, correlacionándose con el aumento de unidades taxonómicas operativas detectadas. Esto refleja una amplia variedad de microorganismos en las superficies ambientales analizadas. Paralelamente, se encontró una subestimación de la diversidad microbiana en las áreas al comparar los resultados obtenidos por técnicas de cultivo convencional con aquellos obtenidos por secuenciación. Estos hallazgos son relevantes para abordar la contaminación microbiana en la industria alimentaria y mejorar los sistemas de control de calidad e inocuidad de los alimentos.

ABSTRACT:

The growth of the global population has led to an increased demand for food and a more intensive approach to agriculture and livestock farming, leading to a greater responsibility for health authorities in ensuring food safety and preventing foodborne illnesses. Industrial surfaces play a critical role in the microbial contamination of food, making it crucial to understand the ecosystem present on these surfaces and have effective surveillance and control systems to ensure food safety. In this study, the microbiota of a meat industry was analyzed using high-resolution sequencing techniques. Samples from six different areas were evaluated to classify the identified microorganisms based on their dominance, assess richness and ecological evenness profiles, and compare abundance profiles between conventional microbiology and massive sequencing methods. The results revealed a dominance of the Proteobacteria phylum in the environmental samples, with families such as *Brucellaceae*, *Staphylococcaceae*, *Moraxellaceae*, and *Pseudomonadaceae* being prominent, consistent with previous research. Typical microorganisms found in food biofilms, such as *Enterococcaceae*, *Oxalobacteraceae*, and *Caulobacteraceae*, were also identified in all sampling points. At the genus level, *Pseudomonas* was the most abundant among the ten analyzed samples. Alpha diversity indices indicated lower diversity and higher dominance at the phylum taxonomic level, especially in Proteobacteria. However, at the family and genus levels, greater diversity was observed in all samples, correlating with the increased detection of operational taxonomic units. This reflects a wide variety of microorganisms in the analyzed environmental surfaces. Additionally, a microbial diversity underestimation was found in the areas when comparing results obtained from conventional culture techniques and sequencing. These findings are relevant for addressing microbial contamination in the food industry and improving quality control and food safety systems.

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. Inocuidad y seguridad alimentaria:

El incremento de la población global ha generado una mayor necesidad de alimentos, lo que ha llevado a la intensificación y la industrialización de la agricultura y la producción ganadera. Esta evolución ha generado una mayor responsabilidad para las autoridades sanitarias, quienes se ven obligadas a aumentar los controles y asegurar la inocuidad de los alimentos que se comercializan. El concepto de inocuidad alimentaria implica que los alimentos no deben causar daño al consumidor cuando se preparan y/o consumen de acuerdo con el uso previsto (UNIT, 2011). Comprende una serie de condiciones y acciones indispensables a lo largo del proceso de producción, almacenamiento, distribución y preparación de los alimentos, con el objetivo de garantizar que, al ser consumidos, no representen un riesgo para la salud. Es fundamental resaltar que la inocuidad alimentaria no puede prescindirse al evaluar la calidad de un alimento, ya que ésta es un componente esencial de la calidad alimentaria (Ministerio de Salud y Protección Social, 2013).

Por otro lado, según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la inocuidad de los alimentos es una parte esencial dentro de la seguridad alimentaria, afirmando a su vez que ambos conceptos son distintos. La misma organización asegura que: *“La seguridad alimentaria existe cuando todas las personas, en todo momento, tienen acceso físico y económico a alimentos suficientes, inocuos y nutritivos que satisfagan sus necesidades dietéticas y preferencias alimentarias para llevar una vida activa y saludable”* (FAO, 2006; Shaw, 2007).

En este contexto, la mayoría de las enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs), las cuales estiman ser aproximadamente 600 millones de casos anualmente, se pueden prevenir con una manipulación adecuada de los alimentos y educación a todos los niveles (FAO, 2021; FAO, 2023). Al mismo tiempo, la cantidad de ETAs reportadas pueden variar significativamente entre países y regiones. Algunas de ellas son más propensas a ser reportadas debido a su gravedad o impacto en la salud pública, mientras que otras pueden pasar desapercibidas o no ser notificadas. Es por esto que es sustancial destacar la importancia de contar con sistemas de vigilancia, detección y notificación efectivos

para poder monitorear y controlar adecuadamente las ETAs y así, garantizar la inocuidad de los alimentos.

1.2. Los *biofilms* en la industria alimentaria:

Los alimentos pueden verse afectados por diversas fuentes de contaminación, siendo la contaminación cruzada a través de las superficies de la industria alimentaria una de las más relevantes (González-Rivas et al., 2018). La industria alimentaria se dedica constantemente a reducir la presencia de microorganismos contaminantes en sus instalaciones mediante el uso de protocolos de limpieza y desinfección. Sin embargo, algunos de ellos tienen la capacidad de resistir estos protocolos mediante la formación de estructuras de resistencia conocidas como *biofilms*. De esta manera, los microorganismos persisten en las instalaciones a pesar de los esfuerzos realizados para eliminarlos.

Los *biofilms* son una comunidad microbiana sésil altamente estructurada que se caracteriza por albergar células irreversiblemente unidas a un sustrato o interfaz entre sí, que se encuentran incrustadas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que han producido y exhiben un fenotipo alterado con respecto a la tasa de crecimiento y la transcripción de genes (Donlan y Costerton, 2002). Estas estructuras suponen grandes desafíos para la industria alimentaria porque permiten que las bacterias se puedan unir a una gran variedad de superficies, ya sean de vidrio, acero inoxidable, caucho, polipropileno e incluso en alimentos (Carrascosa et al., 2021).

Los *biofilms* hacen que las superficies se conviertan en reservorios y fuentes potenciales de contaminación cruzada hacia los alimentos y pueden tener un impacto sobre la persistencia de microorganismos alterantes y patógenos de transmisión alimentaria. Entre los patógenos que destacan por su persistencia en la industria alimentaria se encuentra *Listeria monocytogenes*, una de las bacterias más preocupantes dentro del sector alimentario por el riesgo que comporta en cuanto a su elevada tasa de mortalidad (Ripollés-Avila et al., 2019). Algunos datos de interés y que avalan su importancia derivan de brotes recientes, como fue el caso de la presencia del patógeno en carne mechada procedente de una empresa cárnica de Sevilla, España. Este último ocurrió en el año 2019, afectando un total de 216 personas en el territorio español (Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, 2019). Por otra parte, solo en 2021, la listeriosis fue la quinta zoonosis más notificada en la Unión Europea, con 2.183 casos. Durante el mismo año, se identificó

a *L. monocytogenes* como el agente causal en brotes de origen alimentario, los cuales en su conjunto afectaron a 1.483 personas de la Unión Europea, con 923 hospitalizaciones y 196 muertes, según reportó la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2022). Aún ser cifras bajas, no son en absoluto despreciables al demostrar porcentajes elevados de hospitalización y mortalidad cercanos al 63 % y 14 % respectivamente.

Se ha evidenciado que la presencia de *L. monocytogenes* en instalaciones puede estar relacionada con la abundancia de determinados microorganismos (Hascoët et al., 2019; Puga et al., 2018). Por esta razón, resulta imprescindible conocer la microbiota presente en estas superficies cuando se encuentran patógenos, con el fin de conocer posibles relaciones ecológicas.

1.3. Interacciones establecidas entre microorganismos que componen una comunidad microbiana:

La microbiota residente en instalaciones alimentarias, definida como aquella que sobrevive a los procedimientos de limpieza y desinfección diarios quedándose instaurada en las superficies, es un aspecto crítico para garantizar la seguridad y calidad de los productos alimenticios (Frank y Koffi, 1990). Esta microbiota incluye una variedad de microorganismos presentes en las superficies y equipos de procesamiento. Las abundancias y relaciones ecológicas en estas instalaciones pueden influir en la probabilidad de aparición de microorganismos patógenos (Ripolles-Avila et al., 2019), lo que representa un riesgo potencial para la contaminación de los alimentos y la salud del consumidor. Es esencial comprender la diversidad de la microbiota presente, ya que algunos microorganismos pueden actuar de manera sinérgica o competitiva, afectando así la prevalencia y persistencia de especies patógenas (Bremer, 2001). Un adecuado control de la microbiota residente y una evaluación constante de la higiene en las instalaciones son fundamentales para mitigar el riesgo de contaminación y garantizar la inocuidad de los alimentos producidos (Ismaïl et al., 2013).

Existen combinaciones de microorganismos que pueden interactuar sinérgicamente para formar *biofilms* en la industria alimentaria. En entornos de procesamientos de alimentos, pueden encontrarse variedades de especies bacterianas en los *biofilms*, desde especies causantes del deterioro de los alimentos como *Flavobacterium* spp., donde su presencia mejora la colonización de *L. monocytogenes* (Bremer, 2001), hasta especies patógenas,

pudiendo contaminar los alimentos (Carrascosa et al., 2021). Un ejemplo de esta última situación ocurre en la industria pesquera, donde los productos de pescado fresco pueden ser afectados por la contaminación cruzada de biofilms formados por diferentes especies patógenas mixtas, como *Aeromonas hydrophila*, *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica* o *Vibrio* spp., pudiendo generar consecuencias significativas tanto en términos económicos como de salud (Mizan et al., 2015).

Pueden hallarse distintas cepas que proporcionan la colonización mejorada y la formación de *biofilms*, lo cual podría contribuir a la persistencia de *L. monocytogenes* en las instalaciones de la industria alimentaria, constituyendo un riesgo potencial para la inocuidad alimentaria (Giaouris, 2015). Un ejemplo de interacciones interespecies sinérgicas son las que se mantienen entre *L. monocytogenes* y *Pseudomonas* spp., siendo este último género abundante en superficies de procesamiento de alimentos, incluso después de la aplicación de procedimientos de limpieza y desinfección. A su vez, son importantes productoras de *biofilms* (Giaouris, 2015). Esta información se puede comprobar en el estudio de Hassan et al., (2004), donde se demostró que *L. monocytogenes* puede sobrevivir en *biofilms* mono o multiespecie con bajas y altas cantidades de nutriente, aumentando su adhesión en superficies húmedas pre- colonizadas con *Pseudomonas putida*. Del mismo modo, Puga et al., (2018) indicaron que *Pseudomonas fluorescens*, cuando forma *biofilms* con *L. monocytogenes*, se posiciona en las cepas más externas de la estructura y genera una sobreproducción de matriz para su protección, lo que fomenta la persistencia del patógeno en las instalaciones alimentarias.

En el estudio realizado por Ripolles-Avila et al., (2019) en una industria cárnica, se encontró una relación entre los recuentos de aerobios totales y la presencia de *L. monocytogenes* en las superficies analizadas. Sin embargo, esta relación es compleja, ya que se observó que la presencia del patógeno puede estar influenciada tanto por microorganismos acompañantes como por una inhibición o estimulación competitiva. En el caso de la inhibición competitiva, algunos microorganismos podrían inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*, lo que resulta en un menor crecimiento del patógeno cuando el recuento de aerobios totales es alto y un mayor crecimiento cuando el recuento disminuye. En la teoría de la estimulación competitiva, algunos microorganismos podrían facilitar el crecimiento de *L. monocytogenes*, lo que resulta en un mayor recuento del patógeno cuando el recuento total de aerobios es alto y una menor detección cuando se

reduce. La competencia variable, por su parte, combina elementos de las dos teorías anteriores, donde tanto la competencia positiva como la negativa pueden influir en la presencia y detección de *L. monocytogenes* en las superficies estudiadas.

1.4. Limitaciones de las metodologías convencionales en la detección e identificación de microorganismos:

En los enfoques convencionales de cultivo para la identificación y cuantificación de microorganismos, se emplean medios selectivos seguidos del aislamiento de los cultivos puros y pruebas confirmatorias. Sin embargo, estas técnicas presentan limitaciones en cuanto a su estabilidad y reproducibilidad (Ripolles-Avila et al., 2020). Esto se debe a que el metabolismo de los microorganismos está influenciado por factores genéticos y las condiciones ambientales, lo que dificulta obtener resultados consistentes. Además, ciertos microorganismos no logran crecer en medios de cultivo debido a cambios en su estructura celular, la falta de nutrientes específicos o incluso pueden encontrarse en un estado denominado "viables, pero no cultivables" (*i.e.* VBNC, *Viable But Non-Culturable*), donde se mantienen vivos, pero no pueden ser cultivados utilizando los métodos convencionales (Chen et al., 2020; Olguín et al., 2006).

Aún se requiere una mayor investigación para dilucidar el papel exacto del estado VBNC en las bacterias. Es probable que su función y significado difieran de una bacteria a la otra, aunque la mayoría de los investigadores sostienen que deriva de una respuesta a ciertos factores ambientales específicos que permite la supervivencia celular (Barcina y Arana, 2009; Epstein, 2009; Phadtare, 2004). Independientemente del papel que juegue el estado VBNC, está claro que un gran número de bacterias formadoras de esporas, en particular algunos patógenos humanos, son capaces de ingresar en este estado, manteniendo su estructura celular y biológica, y continúan expresando genes de virulencia, aunque no sean cultivables mediante métodos convencionales de laboratorio. Además, es innegable que pueden salir de este estado y volverse cultivables nuevamente. Por último, este estado desempeña un papel crítico en la supervivencia de patógenos humanos importantes, entre otros, y posiblemente su capacidad para causar enfermedades (Oliver, 2010).

Estas limitaciones subrayan la inminente necesidad de adoptar enfoques alternativos, como la metagenómica, que permite investigar directamente el material genético presente

en una muestra, sin depender del cultivo previo de los microorganismos o su estado VBNC. Además, permite un estudio más amplio de toda la comunidad bacteriana presente en una muestra.

1.5. Secuenciación de Alta Resolución:

La secuenciación de nueva generación (*i.e.* NGS, *Next Generation Sequencing*) se refiere a un conjunto de tecnologías que permiten secuenciar una gran cantidad de fragmentos de ADN o ARN de manera simultánea, mientras que la Secuenciación de Alta Resolución (*i.e.* HTS, *High-Throughput Sequence*) hace referencia a las tecnologías diseñadas para analizar los diferentes nucleótidos o bases en una secuencia de ADN de forma masiva, siendo capaz de obtener secuencias de alta calidad y precisión, en paralelo, en menor cantidad de tiempo y a un menor costo por base (Green y Guyer, 2011; Lander, 2011; Nakao et al., 2021; Rubio et al., 2020). La misma forma parte de la metagenómica, al ser una herramienta poderosa para el estudio de comunidades microbianas, permitiendo obtener datos a gran escala, analizar la diversidad y las funciones de los microorganismos en su contexto ambiental.

Por otra parte, existe la metabarcodificación o el “código de barras de ADN”, concepto referido al uso de secuencias de ADN cortas y estandarizadas como marcadores para el reconocimiento de especies. Esta técnica permite secuenciar un fragmento corto de la secuencia de ADN del gen de la subunidad I (COI) de la citocromo oxidasa mitocondrial, el “código de barras de ADN” animal, de un espécimen taxonómicamente desconocido, realizando comparaciones con una biblioteca de “código de barras de ADN” de especímenes previamente caracterizados y evidenciados en diversas bases de datos para establecer la identificación taxonómica. El “código de barras de ADN” requiere métodos básicos de biología molecular para extraer y amplificar el fragmento de secuencia de ADN de la muestra desconocida (Wilson et al., 2019).

Estudios como McHugh et al., (2021) y Rodríguez-López et al., (2020) utilizaron HTS como herramienta cultivo-independiente, eficiente y precisa en la identificación de microorganismos en diferentes etapas de la cadena alimentaria permitiendo potencialmente identificar las fuentes de contaminación y la implementación oportuna de medidas de control en la industria alimentaria, mejorando de esta forma el monitoreo ambiental. A su vez, esta metodología permite automatizar y simplificar los protocolos

convencionales de identificación microbiana, haciendo que esta herramienta sea valiosa en estudios relacionados con varios tipos de microorganismos.

1.6. Análisis metagenómico del gen ARN ribosomal 16S:

Los estudios metagenómicos comúnmente se realizan analizando el gen ARN ribosomal 16S. Este es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 pb con nueve regiones hipervariables entre regiones conservadas, codificado por el gen *rrs*, también llamado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S) (**Figura 1**) del cual a partir de su secuenciación se puede obtener información filogenética y taxonómica (Rodicio y Mendoza, 2004). Elegir qué región del ARNr 16S secuenciar es un área de debate, y su región de interés podría variar dependiendo de factores como los objetivos experimentales, el diseño y el tipo de muestra (Illumina, 2013).

1.7. Propiedades del ARNr 16S para su uso como implemento filogenético y taxonómico:

Si bien existen otros cronómetros moleculares alternativos al ARNr 16S para secuenciar, hasta el momento es el más utilizado. Según Woese, (1987), presenta una serie de características que hacen que este gen sea el más utilizado para la secuenciación, destacando entre ellas:

- a) Presenta una conservación evolutiva, es decir, se trata de una molécula muy antigua presente en la mayoría de las bacterias existentes actualmente, con un alto grado de consistencia funcional.
- b) La conservación en estructura secundaria puede ser útil en las comparaciones con otros microorganismos procariotas. Cabe destacar que el ARNr 16S además de regiones conservadas, presenta regiones hipervariables (**Figura 1**). Estas regiones contienen secuencias que varían significativamente entre especies y permiten distinguir entre bacterias estrechamente relacionadas. Al comparar las secuencias de estas regiones, es posible identificar y determinar relaciones filogenéticas y agrupaciones de bacterias en taxones más amplios, como géneros, familias e incluso, cepas.
- c) Puede ser secuenciado directamente y, por lo tanto, de forma rápida.
- d) El tamaño de ARNr 16S (1.500 pb), al ser pequeño, minimiza las oscilaciones estadísticas.

- e) Al mismo tiempo, al ser relativamente fácil su secuenciación, existen bases de datos amplias y en continuo crecimiento (Rodicio y Mendoza, 2004), entre ellas distinguir la NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), RDP (*Ribosomal Database Project*), SILVA *rRNA project* y *Greengenes*.

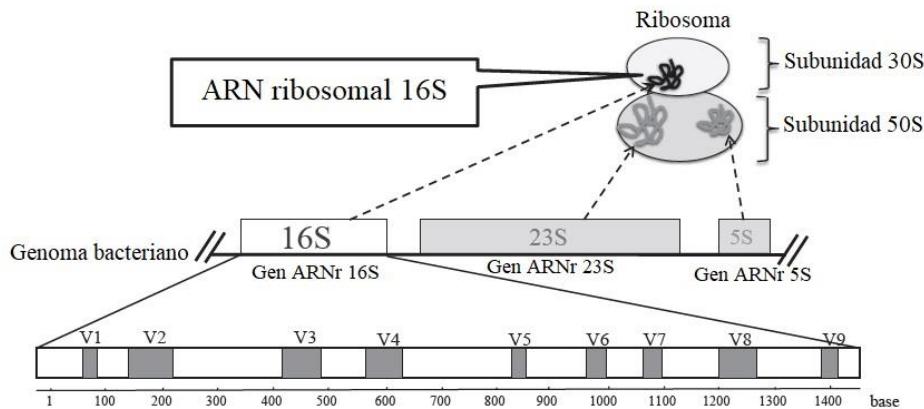


Figura 1. Esquema del complejo ribosómico y el gen ARNr 16S. Las cajas blancas y grises indican regiones conservadas y regiones hipervariables, respectivamente.

Modificado de Fukuda et al., (2016).

1.8. Hipótesis y objetivos del trabajo:

El presente estudio parte de la hipótesis en que la variedad de microorganismos presentes en superficies industriales evaluados a través del análisis metagenómico, difiere de los perfiles de abundancia derivados de los análisis por microbiología convencional.

Los objetivos generales del presente Trabajo de Fin de Máster fueron:

- I. La puesta a punto de la técnica de amplificación del ADN y la técnica de HTS mediante la utilización del secuenciador iSeq 100 de Illumina.
- II. La determinación de los niveles taxonómicos presentes en distintas zonas de una industria de procesamiento de cerdo ibérico recogidas en el estudio de Mazaheri, (2022).

Para alcanzar los objetivos propuestos, se establecieron una serie de objetivos específicos:

- I. Establecer los parámetros de secuenciación óptimos para el análisis de muestras ambientales.
- II. Decidir que categorías taxonómicas comparar entre las muestras evaluadas.
- III. Clasificar a los microorganismos identificados en función de su dominancia.

- IV. Conocer perfiles de riqueza y equitatividad ecológica empleando índices de diversidad.
- V. Comparar perfiles de abundancia entre metodologías de microbiología convencional y métodos de secuenciación masiva.

2. MATERIALES Y MÉTODOS:

2.1. Superficies de estudio:

Las muestras evaluadas en este estudio procedieron de distintas áreas dentro de una industria de procesamiento de cerdo ibérico distribuida en dos plantas (A y B). Estas fueron recogidas del trabajo de investigación de Mazaheri, (2022), estudio que deriva de Ripolles-Avila et al., (2019). En total se analizaron 10 muestras, distribuyéndose según **Tabla 1.**

Tabla 1. Distribución de las muestras analizadas.

Nº de muestra	Planta	Lugar de muestreo	Fecha de muestreo
M1			11/05/2021
M14	A	Mesa deshuesado	18/05/2021
M413			29/03/2022
M391	B	Armario útiles	8/03/2022
M427			5/04/2022
M394	B	Pared de lavadero de carros de curado	8/03/2022
M430			5/04/2022
M4	B	Pared cámara oreo de canales	11/05/2021
M392	B	Mesa de trabajo obrador	8/03/2022
M414	A	Mesa loncheado	29/03/2022

El estudio se enfocó en la identificación de superficies dentro de las instalaciones industriales que podrían actuar como fuentes de contaminación para los productos alimentarios (Mazaheri, 2022; Ripolles-Avila et al., 2019). Para monitorear el nivel de contaminación microbiológica a lo largo del tiempo, se emplearon sensores de superficie (SCH) compuestos por piezas de acero inoxidable que fueron instaladas en las áreas seleccionadas. Estos sensores se sometieron a las mismas condiciones de suciedad y limpieza que el resto de las instalaciones, de manera que también quedaron expuestos a

la misma contaminación. De esta forma, se logró llevar a cabo un monitoreo continuo de la contaminación microbiológica en el tiempo (Ripolles-Avila et al., 2019).

El análisis microbiológico convencional de las muestras seleccionadas consistió en el recuento de aerobios totales, enterobacterias, coliformes/*E. coli*, *Staphylococcus* coagulasa positivo, bacterias del ácido láctico y mohos y levaduras. Además, se investigó la presencia de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*. En base a los resultados obtenidos por Mazaheri, (2022) y siguiendo las hipótesis sobre inhibición competitiva, estimulación competitiva o competencia variable propuestas por Ripolles-Avila et al., (2019), se seleccionaron las muestras evaluadas en el presente estudio.

2.2. Pruebas previas para el procedimiento de amplificación del ADN:

Considerando como punto de partida que en el primer gel de electroforesis realizado en donde no aparecieron bandas de ADN posteriormente a la amplificación del mismo, se llevaron a cabo tres pruebas con el fin de ajustar el protocolo de amplificación siguiendo los lineamientos de la guía de solución de problemas de QIAGEN (2010) y utilizando las muestras indicadas en la **Tabla 2**. Concretamente, la primera prueba consistió en aumentar el número de ciclos del termociclador de 25 a 35, manteniendo la concentración de los cebadores y la cantidad de ADN de la muestra recomendados por el proveedor. En la segunda prueba, se aumentó la concentración de los cebadores de 1 μ M a 2 μ M, sin modificar el número de ciclos ni la cantidad de ADN indicados por el proveedor. Por último, se incrementó la cantidad de ADN de la muestra de 2,5 a 5 μ L en la reacción final, es decir, con una concentración final de 1 ng/ μ L, ya que el volumen final de la reacción fue de 25 μ L, manteniendo constante el número de ciclos y la concentración de los cebadores. El marcador utilizado en el gel de electroforesis fue Φ X174 ADN/BsuRI (HaeIII) (ThermoScientific, Vilna, Lituania).

Tabla 2. Descripción de las muestras utilizadas para la optimización del protocolo de amplificación del ADN.

Código	Descripción
C2N	Muestra ambiental 1 normalizada a 5 ng/ μ L
C2	Muestra ambiental 1
P3	Muestra ambiental 2
BK	Blanco de la corrida

2.3.Extracción del ADN:

El ADN fue extraído desde las suspensiones utilizando PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (Life Technologies, Carlsbad, California USA) siguiendo las indicaciones del proveedor, pero con algunas modificaciones. Debido a la ausencia de pellets en las suspensiones, durante la preparación del lisado, 200 µL de muestra fueron homogenizadas en vórtex y mezcladas con 600 µL de buffer de lisis. Por otra parte, durante el lavado y elución del ADN, se colocaron 50 µL de buffer de elución para concentrar la cantidad total. Luego se midió la concentración del ADN utilizando un espectrofotómetro de microvolumen, el NanoDrop (Thermofisher, Waltham, Massachusetts USA). Una vez cuantificado el ADN, se normalizaron todas las muestras a 5 ng/µL ya que es recomendable estandarizar las concentraciones antes de realizar la amplificación, porque la concentración de ADN puede variar significativamente entre las muestras. Este paso es importante para asegurar que todas las muestras tengan una cantidad similar de ADN, lo cual es fundamental para lograr una amplificación adecuada durante la PCR (Francioli et al., 2021). Las muestras de ADN fueron almacenadas a -20 °C hasta la preparación de las mismas para su secuenciación.

2.4.Preparación de la biblioteca de amplicones para la secuenciación:

La preparación de la biblioteca, o librería de amplicones en el caso de referirse a un grupo específico de fragmentos de ADN derivados de una única muestra para la secuenciación por Illumina iSeq 100, es un proceso fundamental que involucra una serie de pasos esenciales para preparar los fragmentos de ADN de manera adecuada y asegurar que estén en condiciones óptimas para la secuenciación. Estos pasos incluyen:

2.4.1. Primera etapa de PCR y purificación del ADN:

Durante esta etapa ocurre la amplificación de los fragmentos de ADN marcados con cebadores previamente seleccionados (Rubio et al., 2020). Para esto se seleccionó la región hipervariable 16S V3-V4 del ADN (Illumina, 2013), ya que las secuencias específicas de genes utilizadas en este protocolo se dirigen a estas regiones, las cuales fueron seleccionadas del estudio realizado por Klindworth et al., (2013). Según Sirichoat et al., (2021), los análisis que utilizaron la región V3 generalmente indican la mayor diversidad bacteriana seguida de las regiones V6–V7 y V4, mientras que la región V9

tiene la resolución bacteriana más baja. También, en el estudio de Barb et al., (2016) se demostró que la región V4 presenta el mejor promedio de detección a nivel de familia y género bacteriano.

La amplificación de la regiones hipervariables V3-V4 se realizó según modificaciones del protocolo de Illumina (2013). El total de la reacción de PCR fue de 25 μ L, conteniendo 12,5 μ L de APExBIO 2 \times HyPerFusion[®] High-Fidelity Master Mix (APExBIO Technology, Houston, Texas, USA) la cual posee actividad polimerasa 5'→3' y actividad exonucleasa 3'→5', 5 μ L del cebador 16S+Ad-Forward HTS (5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TATAAG AGA CAG CCTACG GGN GGC WGC AG-3') diluido a 2 μ M (Metabion International AG, Semmelweisstraße, Alemania), 5 μ L del cebador 16S+Ad-Reverse HTS (5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C-3') diluido a 2 μ M (Metabion International AG, Semmelweisstraße, Alemania) y 2,5 μ L de la extracción de ADN a 5 ng/ μ L. Las condiciones del termociclador fueron 95 °C por 3 minutos, 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos y 71°C por 5 minutos. Posteriormente, para purificar los amplicones 16S V3-V4, se utilizó el agente CleanNGS (CleanNA, Waddinxveen, Países Bajos) siguiendo el protocolo del proveedor. Esta etapa tiene como objetivo eliminar excesos de los cebadores y productos de amplificación que no son deseados.

Finalmente, se midió la cantidad de ADN amplificado y purificado utilizando 2 μ L del mismo a través del NanoDrop (Thermofisher, Waltham, Massachusetts USA). Para verificar el tamaño y carga del mismo se realizó un gel de electroforesis utilizando como marcador a OXGENTM 100-1500 bp/LADD-DN5-500 (GQUENCE, España) y colocando un control negativo para asegurar que no hubiera contaminación durante la manipulación de la técnica.

2.4.2. Segunda etapa de PCR y purificación del ADN:

Este paso conecta índices duales y adaptadores de secuenciación de Illumina utilizando el kit Nextera[®] XT Set A (Illumina, San Diego, California USA) (**Figura 2**). Para llevarlo a cabo se siguieron los lineamientos del proveedor según la guía de Illumina (2013). Para la purificación se utilizó el agente CleanNGS (CleanNA, Waddinxveen, Países Bajos)

siguiendo el protocolo del proveedor. Este paso se realizó con el fin de limpiar la librería final antes de su cuantificación.

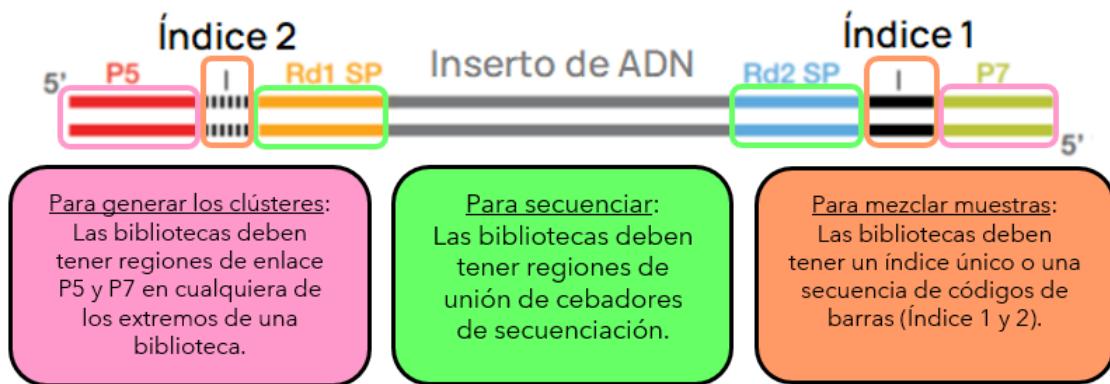


Figura 2. Librería luego de su preparación lista para ser secuenciada.

Adaptado de Illumina, (2023b).

2.4.3. Cuantificación y validación de la librería:

En esta etapa se cuantifica el ADN y se evalúa la calidad del mismo para preparar la librería para su secuenciación. El tamaño esperado de la librería debería de ser aproximadamente de 630 pb (Illumina, 2013).

En el presente estudio, se tomó la decisión de emplear diferentes métodos para evaluar la calidad del ADN en las muestras. La elección entre el Bioanalyzer y el gel de electroforesis dependió de la disponibilidad de equipos en el laboratorio. En algunos casos, se pudo acceder al Bioanalyzer, que permite una evaluación rápida y automatizada de la calidad del ADN. Sin embargo, en otros casos, resultó más práctico utilizar el método de gel de electroforesis, que es una técnica ampliamente utilizada y menos costosa.

De esta forma, algunas muestras (*i.e.* 391, 392, 394, 427 y 430) fueron enviadas al Servicio de Genómica de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), allí mediante el Bioanalyzer se analizó y caracterizó el ADN. Se obtuvo información sobre la calidad, cantidad y tamaño de las muestras de ácido nucleico, permitiendo de esta forma determinar si el ADN extraído estaba intacto o si pudo haber sufrido degradación. Con el resto de las muestras (*i.e.* 1, 4, 14, 413 y 414) se elaboró y corrió un gel de electroforesis para visualizar la presencia y tamaño del fragmento de ADN.

Con el fin de cuantificar y medir de manera precisa la concentración de ácidos nucleicos, las muestras fueron enviadas al Servicio de Genómica de la UAB, donde para su lectura se utilizó el kit de ensayo de ADNds HS Qubit (*i.e.* ADNds, ADN de doble cadena de HS, alta sensibilidad utilizando el sistema Qubit), obteniendo los resultados mediante el uso de fluorímetros Qubit.

2.4.4. Dilución de las librerías a la concentración inicial de carga:

Para calcular la concentración de ADN en nM según el tamaño de los amplicones, se utilizó la siguiente fórmula según Illumina, (2013):

$$\frac{ng/\mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{tamaño promedio de la librería (bp)}} = \text{Molaridad (nM)}$$

Una vez convertidos los valores a nM, se normalizaron todas las muestras a 1 nM utilizando Resuspension Buffer (RSB) (Illumina, San Diego, California USA), para luego diluirlas a 10 pM. Esta última fue la concentración utilizada para cargar la librería en el secuenciador junto con un 25 % de control PhiX v3 (Illumina, San Diego, California USA) a 10 pM. Estos parámetros fueron seleccionados tras diversas pruebas experimentales, siendo estos con los que se obtuvieron mejores resultados a nivel de porcentajes de detección a niveles taxonómicos.

El PhiX v3 sirve como control interno para la secuenciación de bibliotecas con baja diversidad nucleótida, debido a que tiene una composición de bases diversas (45 % de GC y 55 % de AT), lo cual proporciona señales fluorescentes equilibradas de las que carecen en las librerías de muestras con baja diversidad (*i.e.* como fue el caso del presente estudio) durante cada ciclo de secuenciación. A su vez, ayuda con el mapeo de clústeres y mejora el rendimiento general de la ejecución (Illumina, 2023a).

2.4.5. Agrupación y carga de las librerías en el secuenciador iSeq 100:

En cada corrida del secuenciador, se agruparon 5 librerías. Para esto se juntaron y mezclaron por 30 segundos en agitador vórtex, 15 μ L de cada librería diluidas a 10 pM (75 μ L en total), a la par con 25 μ L de PhiX v3 a 10 pM. De los 100 μ L del volumen final, 20 μ L se cargaron en el secuenciador.

2.4.6. Secuenciación de extremos emparejados:

Durante esta etapa se generan secuencias cortas a partir de fragmentos de ADN presentes en la librería. La secuenciación de extremos emparejados permite secuenciar en ambas direcciones. El proceso es idéntico al de la secuenciación de extremo único, pero luego del final del proceso de secuenciación, se ejecuta otra ronda de generación de clústeres y se eliminan las cadenas con la dirección que se ha secuenciado anteriormente.

Los clústeres son grupos compactos de hebras de ADN que contienen miles de copias de la misma secuencia de ADN en un área pequeña. Se generan mediante la amplificación en puente, donde los fragmentos de ADN se adhieren a una superficie sólida llamada celda de flujo. Cada fragmento se une a un oligonucleótido complementario en la celda de flujo, lo que permite su anclaje. Seguidamente, se produce la amplificación de los fragmentos de ADN en ambos extremos, formando una cadena doble de ADN. Este proceso se repite hasta que todos los oligonucleótidos en la superficie de la celda de flujo son utilizados. Posteriormente, se realiza la alineación de los fragmentos y se separan las hebras inversas, y el cebador de secuenciación se une para iniciar la secuenciación (Illumina, 2023b). Para iniciar la síntesis de nuevas hebras de ADN se utilizan nucleótidos marcados con fluoróforos. A medida que se incorporan los nucleótidos, se emiten señales fluorescentes que se detectan y registran para determinar la secuencia de nucleótidos (Rubio et al., 2020).

Este procedimiento permite secuenciar ambos extremos de un fragmento y generar datos de secuencias alienables de alta calidad. Facilita la detección de reordenamientos genómicos y elementos de secuencias repetitivas, así como fusiones de genes y transcripciones novedosas. Además de producir el doble de lecturas por el mismo tiempo de preparación de las librerías, las secuencias alineadas como pares de lectura permiten una alineación de lectura más precisa y la capacidad de detectar variantes de inserción-eliminación, lo que no es posible en una lectura única (Illumina, 2023c).

2.5. Análisis bioinformático y procesamiento de datos:

El sistema iSeq 100 proporciona diversas opciones para el análisis de datos. Una de ellas es el software integrado en el instrumento llamado *Local Run Manager* (LRM). LRM se destaca por su estructura modular, lo que le permite adaptarse a ensayos actuales y

futuros. Con este software, es posible realizar un seguimiento de las bibliotecas y visualizar los resultados del análisis y calidad de la secuenciación. Después de finalizar la secuenciación, LRM inicia automáticamente el análisis de los datos utilizando módulos específicos de la aplicación. Dentro de los indicadores de calidad el equipo brinda la puntuación Q30. Esta última se refiere a la calidad de las lecturas de secuenciación generadas el secuenciador de Illumina. Es un indicador de la precisión de las bases nucleotídicas en una lectura de secuencia y representa la probabilidad de que cada base esté incorrecta en una proporción de 1 en 1.000 (0,001) o una precisión del 99,9 %. En otras palabras, una puntuación Q30 de Illumina indica que hay una probabilidad del 99,9 % de que cada base en la lectura de secuencia sea correcta. Cuanto más alta sea la puntuación Q30, mayor será la confiabilidad de los resultados de secuenciación (Illumina, 2011, 2020).

Asimismo, el sistema genera un informe individual por muestra que proporciona información como el número total de lecturas, la cantidad y el porcentaje de lecturas que pasaron el filtro de calidad, así como la clasificación de los resultados según el nivel taxonómico mediante tablas que muestran las ocho clasificaciones taxonómicas más altas en cada nivel. Simultáneamente el mismo informe incluye gráficos circulares que muestran todas las clasificaciones por encima del 3,5 % de abundancia (Illumina, 2020).

A partir de los porcentajes de abundancia por taxón derivados del análisis bioinformático se obtuvieron las abundancias relativas y se procedió al cálculo de dos índices de diversidad alfa mediante el uso de las siguientes ecuaciones:

Índice de Shannon-Weaver (Lemos et al., 2011):

$$H = - \sum_{i=1}^s (p_i \ln p_i)$$

Donde:

- $p_i = \frac{n_i}{N}$, $i = \text{phylum, familia o género}$, $n_i = \text{número total de organismos de un phylum, familia o género en particular}$ y $N = \text{número total de organismos en todos los phylums, familias o géneros}$.

Índice de Simpson (Somerfield et al., 2008):

$$D = \frac{\sum n_i (n_i - 1)}{N (N - 1)}$$

Donde:

- n_i = Número total de organismos de un phylum, familia o género en particular.
- N = Número total de organismos en todos los phylums, familias o géneros.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

3.1. Optimización del protocolo de amplificación del ADN:

En el presente estudio, se llevó a cabo la optimización de la técnica de amplificación del ADN, ya que el protocolo suministrado por el proveedor no se adecuaba a las características particulares de las muestras utilizadas en este estudio. Las modificaciones en el protocolo son mencionadas en la sección 2.2 del presente trabajo.

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron información relevante sobre los efectos de ciertos ajustes en el proceso de amplificación de ADN. En primer lugar, se observó que, al aumentar el número de ciclos del termociclador, se generaron bandas de ADN en el gel de electroforesis, como se puede apreciar en las muestras C2N, C3 y P3 resaltadas en rojo en la **Figura 3**. Este hallazgo sugiere que un aumento en el número de ciclos de amplificación favorece la amplificación del ADN objetivo (Donald, 2006; Rychlik et al., 1990). Sin embargo, es importante destacar que este efecto positivo es válido hasta cierto punto. A partir de los 45 ciclos, se observa la aparición de bandas inespecíficas en el gel de electroforesis, lo cual indica una amplificación no específica del ADN. Por lo tanto, es recomendable no exceder los 45 ciclos para evitar la generación de productos no deseados y asegurar la especificidad de la amplificación (Kainz, 2000). Por otro lado, se identificó que las muestras que no fueron normalizadas a una concentración de 5 ng/ μ L y a las cuales se les aplicó un aumento en el número de ciclos recomendado por el proveedor, presentaron bandas inespecíficas en el gel de electroforesis. Este resultado se observa en las muestras C2 y P3 resaltadas en rojo en la **Figura 3**. Estas bandas inespecíficas indican que la amplificación no fue específica y se produjo la amplificación de fragmentos no deseados.

Asimismo, se analizó el efecto de aumentar la concentración de los cebadores en la reacción de amplificación a 2 μ M. Como se puede ver en la **Figura 3**, en las muestras C2,

C2N y P3 resaltadas en amarillo, se obtuvieron resultados mejorados al incrementar la concentración de los cebadores. Esto sugiere que un mayor número de cebadores disponibles en la reacción favorece la amplificación específica del ADN de interés (Mubarak et al., 2020).

Por último, se investigó el efecto de aumentar la cantidad de ADN en la reacción final de amplificación. Los resultados indican que no hubo cambios destacables al aumentar la cantidad de ADN, en comparación con la prueba anterior, pudiendo apreciarse en las muestras P3, C2 y C2N resaltadas en celeste en la **Figura 3**. Estos hallazgos sugieren que la cantidad de ADN utilizado en la reacción de amplificación no influye de manera significativa en el resultado final a las concentraciones probadas. No obstante, tal y como demostrado por Obradovic et al., (2013), aumentar sustancialmente el volumen de ADN puede dar como resultado amplificaciones no satisfactorias debido al exceso del residuo EDTA que acompaña al tampón de elución y que tiene el potencial de inhibir la reacción de PCR mediante la quelación de los iones de magnesio (Rossen et al., 1992). Por ello, se decidió mantener el volumen menor incluido en el resto de pruebas realizadas al haber demostrado una buena amplificación. Los resultados obtenidos proporcionan información importante sobre los ajustes en el proceso de amplificación de ADN, demostrando la influencia del número de ciclos, la concentración de cebadores y la cantidad de ADN en la eficacia y especificidad de la amplificación. Estos hallazgos contribuyen al desarrollo y optimización de la técnica de amplificación utilizada este estudio, asegurando resultados más precisos y confiables.

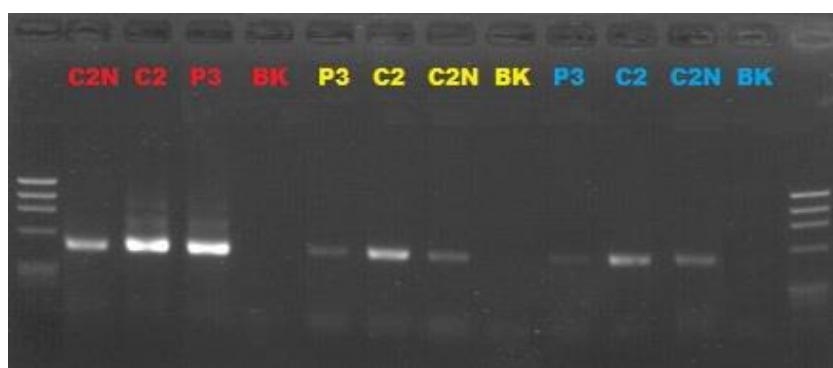


Figura 3. Gel de electroforesis con muestras de prueba para la optimización del protocolo de amplificación del ADN. Muestras con aumento del número de ciclos en el termociclador (Rojo), aumento de la concentración de cebadores (Amarillo) y aumento de la cantidad de ADN en la reacción final (Celeste).

3.2.Optimización de la técnica de secuenciación de alta resolución:

La puesta a punto de la técnica de secuenciación de ADN con el secuenciador iSeq 100 involucró un riguroso proceso de preparación de la librería, amplificación, purificación, cuantificación, carga y secuenciación, seguido del análisis de los datos obtenidos. Cada paso se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones y protocolos proporcionados por el fabricante, garantizando así la obtención de resultados confiables y de alta calidad.

En primer lugar, y seleccionando la muestra M4 como representación del resto, se puede observar que la clasificación de lecturas totales por nivel taxonómico dio porcentajes similares (*i.e.* 15 – 16 %) entre aquellos niveles primarios más inclusivos, a diferencia de los porcentajes obtenidos a nivel de especies, que demostraron ser los menores alcanzados (**Figura 4**). Por ello, se seleccionaron las categorías taxonómicas phylum, familia y género como descriptores para poder comparar las muestras evaluadas en el presente estudio. Esta elección, además, concuerda con los análisis de metagenómica en los que incluyen estas categorías debido a su representatividad a nivel taxonómico, su relevancia biológica, su abundancia relativa, tendiendo a ser los grupos de microorganismos más abundantes en una muestra, la consistencia y comparabilidad que ofrecen en la interpretación de los resultados (Portik et al., 2022). A niveles taxonómicos más detallados, como a nivel de especie, la mayoría de los métodos basados en la composición del ADN agrupan fragmentos utilizando características generales, como el ARNr 16S (Krause et al., 2008). Sin embargo, estos métodos no logran la precisión de predicción requerida para los datos metagenómicos altamente complejos que se encuentran en la actualidad. Esta dificultad se debe a varios factores, incluyendo la longitud del genoma, la falta de completitud en las bases de datos de secuencias públicas, la confiabilidad del vector de composición del genoma y la capacidad discriminatoria del clasificador utilizado para describir los datos genómicos de referencia, entre otros (Hou et al., 2015).

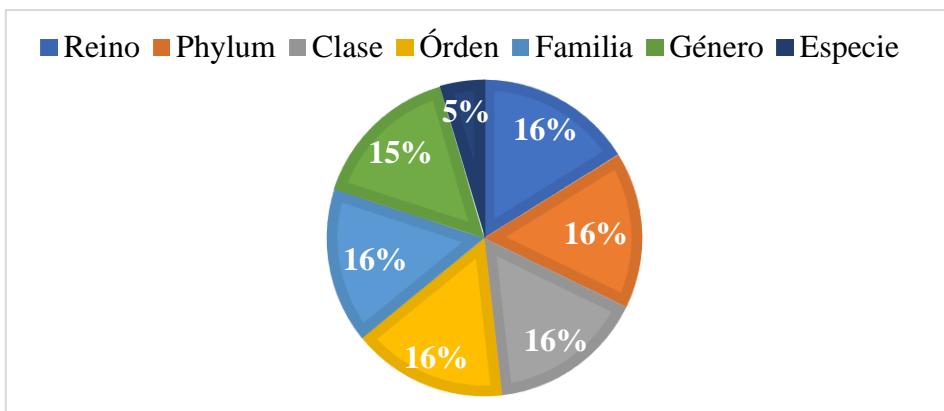


Figura 4. Porcentajes de lecturas clasificadas por nivel taxonómico para la muestra M4, correspondiente a la pared de la cámara oreo de canales de la industria de procesamiento de cerdo ibérico evaluada.

Para la optimización del protocolo de secuenciación, se llevaron a cabo dos corridas de prueba utilizando diferentes parámetros. La primera corrida se realizó de acuerdo con parámetros establecidos previamente por autores como Nakao, (2021) y Ushio, (2022), donde se cargaron 50 pM de concentración de las muestras y 20 % de PhiX. En la segunda corrida, debido a que las muestras presentaban una baja diversidad de bases, se decidió aumentar al 25 % el PhiX y utilizar una concentración de muestras de 10 pM. La disminución de esta concentración fue motivada a lo observado por Salazar et al., (2018) donde encontraron veintiocho géneros bacterianos distintos en alimentos de origen animal utilizando 10 pM como concentración de carga. Estas pruebas permitieron evaluar y comparar los resultados obtenidos con distintas configuraciones, con el objetivo de determinar la mejor combinación de parámetros para la secuenciación. Los resultados de ambas pruebas alcanzaron porcentajes por encima del 88 % para el valor Q30, indicando que la calidad de las secuenciaciones fue alta, lo que proporciona una base sólida para el análisis de los datos generados en las corridas. No obstante, al comparar los porcentajes de lecturas por nivel taxonómico obtenidos (**Tabla 3**), se observan mejoras en las tres categorías evaluadas (*i.e.* phylum, familia y género) que van desde un 10,39 % hasta un 29,88 % al disminuir la concentración de la muestra de 50 pM a 10 pM y aumentar el PhiX al 25 %. Estas mejoras representan un avance considerable en los porcentajes de lecturas totales a nivel taxonómico, evidenciando un progreso relevante entre los valores iniciales y los valores más recientes. El aumento de estos porcentajes indica un rendimiento incrementado y demuestra una mejoría notable en las muestras ambientales.

analizadas, dando por tanto el sustento suficiente para la inclusión de estos parámetros en la secuenciación.

Tabla 3. Porcentajes de lecturas totales por nivel taxonómico en las dos corridas de prueba, siendo la primera a una concentración 50 pM de muestra y 20 % de PhiX, y la segunda a 10 pM de muestra y 25 % de PhiX.

Muestra	Primera secuenciación			Segunda secuenciación		
	Phylum	Familia	Género	Phylum	Familia	Género
M1	30,53	30,13	30,00	60,41	59,69	59,44
M4	76,14	75,09	73,17	86,80	85,80	83,56
M14	28,59	28,20	27,87	42,88	42,40	42,01
M413	32,82	32,42	31,90	49,57	49,12	48,44
M414	30,57	30,19	29,69	44,71	44,32	43,63

3.3. Microbiota presente en superficies industriales a partir del análisis por secuenciación de alta resolución:

Los resultados obtenidos mediante secuenciación de alta resolución revelan una visión detallada y profunda de la diversidad microbiana presente en las muestras analizadas. En relación con la categoría taxonómica de phylum, se puede observar al comparar las abundancias relativas, la dominancia de Proteobacteria en todas las muestras evaluadas con porcentajes que oscilaron entre 26 % y 62 % de lecturas, a excepción de la muestra M414 (i.e. mesa de loncheado) donde predominó el phylum Firmicutes en un 32 % (**Figura 5**). Cabe destacar que la presencia de una alta abundancia de Proteobacterias no necesariamente indica un problema o riesgo para el ambiente. Este grupo taxonómico es muy diverso y contiene muchas especies beneficiosas y neutrales en el ecosistema, aunque también incluye algunas especies patógenas. La predominancia de Proteobacteria en superficies ambientales de industrias cárnica puede estar asociada a su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales y su participación en procesos de degradación de compuestos orgánicos, incluyendo los residuos de la producción cárnica (Stellato et al., 2016). En este sentido, autores como Emamjomeh et al., (2023) y Yang et al., (2016) también observaron que, para entornos de procesado cárnico en los que se manipula carne de vacuno, cerdo y pollo, el phylum Proteobacteria es el dominante en el microbioma de las instalaciones. Sin embargo, otros autores como Chaillou et al., (2014) y Rodríguez-López et al., (2020) encuentran una proporción mayor del phylum

Firmicutes y Actinobacteria en los productos cárnicos mientras que Proteobacteria y Bacteroidota los relacionan como más comunes en productos de la pesca. Por ello y derivado de la investigación limitada en esta área de estudio, se debe tener en cuenta que las diferencias en el muestreo, el procesamiento de muestras y los procedimientos de extracción podrían tener un efecto importante en las proporciones de los phylums observados (Hanlon et al., 2021).

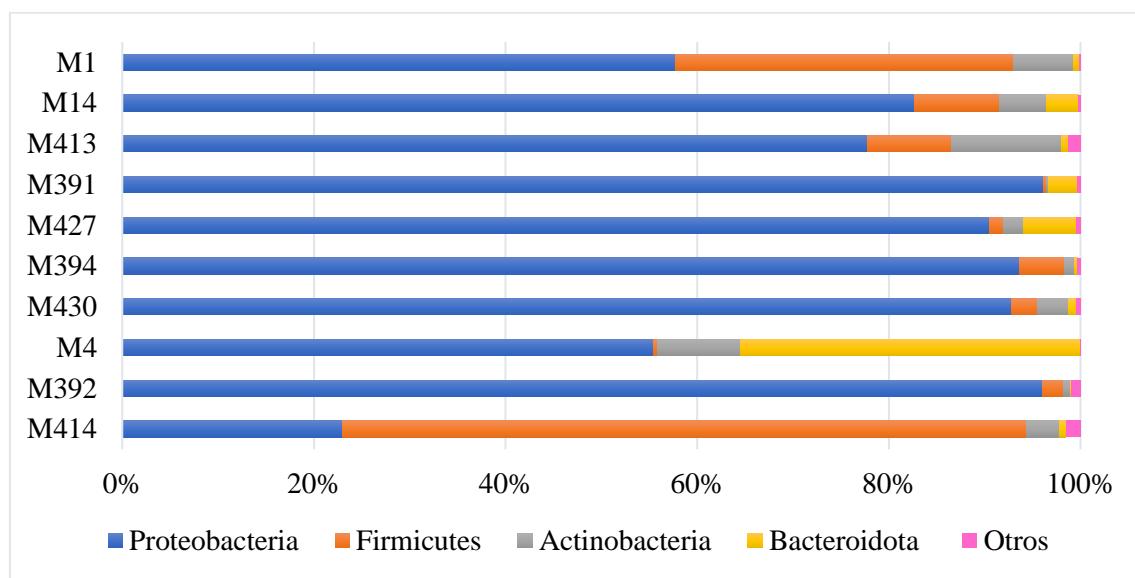


Figura 5. Abundancias relativas de phylums obtenidas en los ensayos metagenómicos del gen ARNr 16S de las muestras de una industria de procesamiento de cerdo ibérico.

La caja “otros” representa los phylums con una abundancia relativa <1 %.

La predominancia del phylum Firmicutes en la muestra M414, se relaciona con la dominancia posterior de la familia *Staphylococcaceae* y el género *Staphylococcus* (**Figura 6 y 7**). Esta muestra proviene de una mesa de loncheado de producto terminado, ambiente que podría ser considerado como propicio a encontrar este género debido a su amplia distribución en el entorno y su presencia en la piel y mucosas de los seres humanos si no se cumplen medidas mínimas de higiene. A su vez, estos datos coinciden con los encontrados en el estudio de Stellato et al., (2016), donde *Staphylococcus* mostró niveles elevados en muestras ambientales en una industria cárnicia, en concreto muestras de cuchillas, tablas de corte e incluso manos de los operarios.

La composición de bacterias a nivel de phylum proporcionó una descripción general del microbioma de las muestras. Sin embargo, no fue útil para comprender cambios específicos en el microbioma core, por lo que se realizó el análisis a una resolución más

alta (*i.e.* familia y género). A nivel de familia, los estudios metagenómicos brindan información sobre la abundancia relativa, lo que puede proporcionar datos sobre las dinámicas de la comunidad a lo largo del tiempo o en respuesta a cambios ambientales. Estudios como Rodríguez-López et al., (2019) caracterizaron familias y géneros con el objetivo de localizar, identificar y analizar las comunidades bacterianas que albergan *L. monocytogenes* presentes en instalaciones relacionadas con alimentos mediante análisis metagenómico del gen ARNr 16S. En este contexto, es interesante destacar que en las muestras que pertenecían a la misma superficie pero que fueron muestreadas a momentos distintos (*i.e.* M1, M4 y M413 correspondientes a la mesa de deshuesado, así como M391 y M427 correspondientes al armario de útiles), se obtuvieron prácticamente la misma abundancia en familias (**Figura 6**). No obstante, para la mesa de deshuesado se observó como excepción a *Staphylococcaceae* que disminuyó su abundancia hasta no detectarla y *Pseudomonadaceae* que tuvo la tendencia contraria. Este hecho indica que las comunidades microbianas residentes pueden ir cambiando a lo largo del tiempo en función de los procedimientos a los que están sometidos (Møretrø et al., 2013; Rodríguez-López et al., 2020).

En general, las familias con mayor abundancia detectadas en el presente estudio fueron *Brucellaceae*, *Staphylococcaceae*, *Moraxellaceae* y *Pseudomonadaceae*, estos resultados están en línea como lo observado en De Filippis et al., 2013 y Stellato et al., 2016. Según Nikolaev et al., (2022), las familias con dominancia dentro de una comunidad microbiana determinan la naturaleza heterogénea de la matriz que se produce en un biofilm y limita el desarrollo activo de representantes menores. Vale la pena señalar que varios microorganismos menores en las comunidades obtenidas son también bacterias típicas de biofilms alimentarios, por ejemplo, las familias *Enterococcaceae*, *Oxalobacteraceae* y *Caulobacteraceae* que se encontraron en todos los puntos de muestreo. En este sentido, se ha indicado que las subpoblaciones minoritarias pueden condicionar a la adquisición de resistencias y mejoran la aptitud de toda la población a sobrevivir condiciones de estrés (Bridier et al., 2011). Por ello, no solo resulta importante conocerlas sino ampliar los

estudios para ver cómo influyen en todo el sistema.

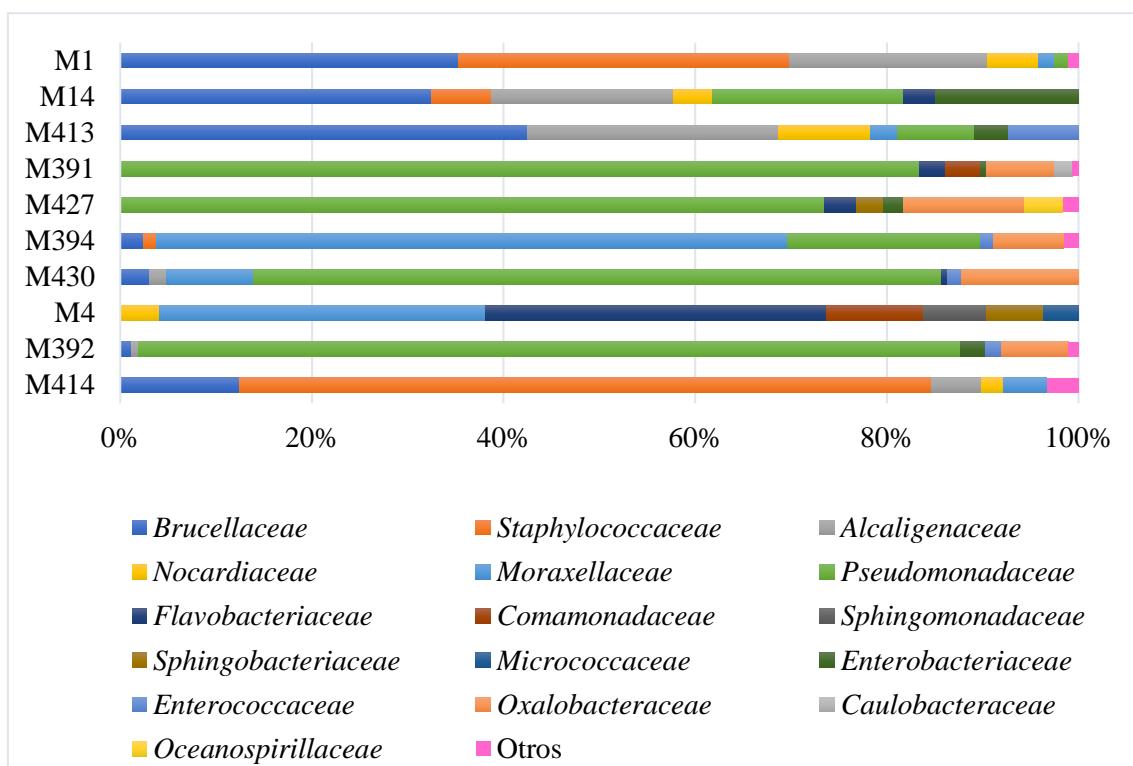


Figura 6. Abundancias relativas de familias obtenidas en los ensayos metagenómicos del gen ARNr 16S de las muestras de una industria de procesamiento de cerdo ibérico.

La caja “otros” representa las familias con una abundancia relativa <1 %.

De forma global, a nivel de género, el más abundante entre las diez muestras analizadas fue *Pseudomonas*, encontrándose incluso por encima del 50 % en M391 (**Figura 7**), lo que coincide con lo demostrado en el estudio de Stellato et al., (2017), donde se encontró que los mismos tipos de *Pseudomonas* presentes en los alimentos, también se hallaban en el entorno de las plantas procesadoras. Además, se ha señalado que *Pseudomonas* produce grandes cantidades de sustancias poliméricas extracelulares, lo que hace generar una matriz compleja permitiendo una mejor adhesión y protección (Nikolaev et al., 2022). Esto sugiere que el ambiente es una fuente de contaminación de alimentos con diferentes especies de *Pseudomonas* adaptadas a cada proceso. Aunque este género fue el más predominante, *Psychrobacter* presentó mayor abundancia en la muestra M394 (*i.e.* pared de lavadero de carros de curado) y *Acinetobacter* en la muestra M4 (*i.e.* mesa de loncheado) (**Figura 7**). Estos resultados también coinciden con los estudios de Brightwell et al., (2006), Møretrø et al., (2013) y Stellato et al., (2016), donde *Psychrobacter* y *Acinetobacter* se encontraron como parte del microbioma core presente en todas las muestras analizadas provenientes de industrias cárnicas.

En este contexto, un aspecto a tener en cuenta son el tipo de superficies que se analizan, así como el uso que se les da, ya que la microbiota esperada puede variar. En este escenario, la comunidad microbiana de la mesa de loncheado (*i.e.* M414) no es la misma que la presente en la mesa de deshuesado (*i.e.* M1, M14 y M413) puesto que, la primera, es una superficie de contacto directo con alimentos que pasaron por un proceso de elaboración específico y que pueden tener otros ingredientes además de la materia prima principal, en este caso la carne. Eso se puede observar en la **Figura 7**, donde las muestras pertenecientes a la mesa de deshuesado presentaron una mayor abundancia del género *Ochrobactrum*, mientras que la muestra de la mesa de loncheado (M414) presentó una mayor abundancia del género *Staphylococcus*. Este último género, tal y como discutido anteriormente, es ubicuo y puede estar presente en la piel y mucosas de los manipuladores, pudiendo ser introducido durante el procesado (Castro et al., 2016).

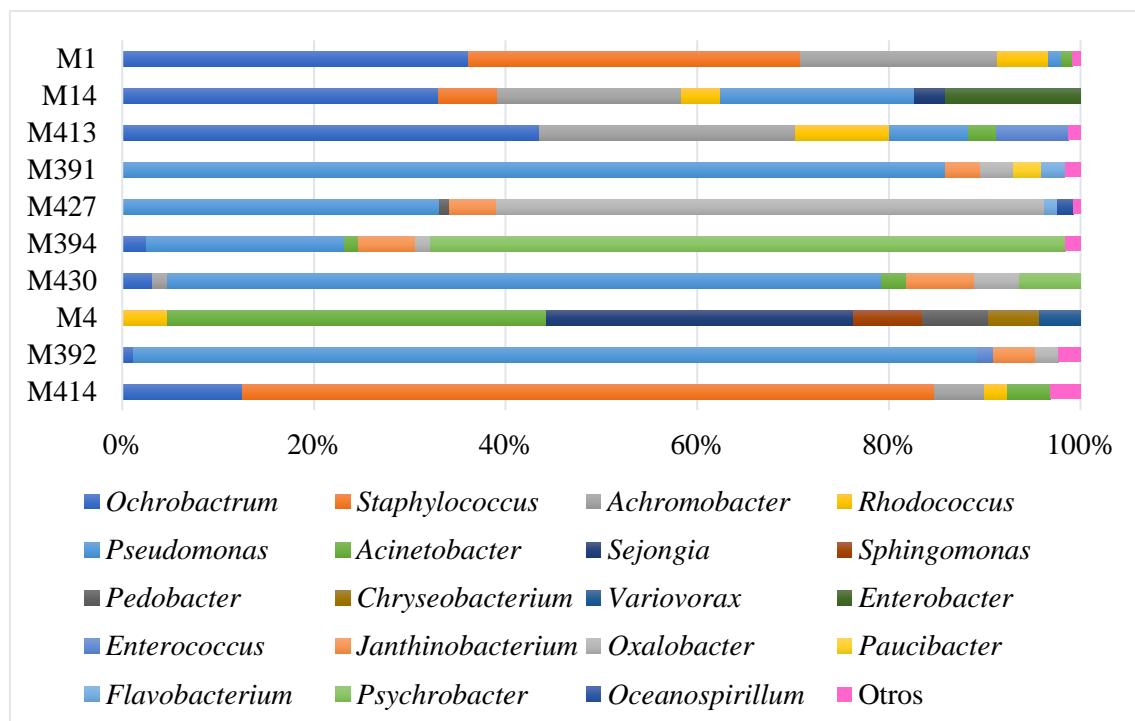


Figura 7. Abundancias relativas de géneros obtenidas en los ensayos metagenómicos del gen ARNr 16S de las muestras de una industria de procesamiento de cerdo ibérico.

La caja “otros” representa los géneros con una abundancia relativa <1 %.

Para poder cuantificar la diversidad de la comunidad microbiana, o “ecológica en general”, se utilizaron los índices de Simpson y Shannon-Weaver. El índice de Simpson se enfoca en la dominancia de ciertos phylums, familias o géneros, donde un valor bajo indica mayor diversidad en la comunidad. Varía entre 0 y 1, siendo 0 una alta diversidad

y 1 una baja diversidad. Por otro lado, el índice de Shannon-Weaver considera tanto la riqueza como la uniformidad de las abundancias relativas de los niveles taxonómicos. Su valor máximo depende del número de phylums, familias o géneros presentes. Cuanto mayor sea el índice de Shannon, mayor será la diversidad de la comunidad (Kim et al., 2017).

En relación al análisis de la diversidad microbiana de los phylums, la muestra M4 (*i.e.* pared de la cámara de oreo de canales) obtuvo el valor de índice de Shannon más alto (**Tabla 4**), indicando una comunidad más diversa y equitativa en comparación al resto de las muestras. Del mismo modo, esta fue la muestra que obtuvo el índice de Simpson más pequeño, sugiriendo nuevamente, que existe una comunidad con mayor diversidad, ya que hay menos dominancia de uno o unos pocos phylums sobre el resto. En particular, esta superficie se encuentra permanentemente en condiciones húmedas, lo que explicaría la mayor diversidad ya que la disponibilidad de agua es un elemento clave para la supervivencia bacteriana en la industria alimentaria (Esbelin et al., 2018). Por otra parte, la muestra M392 (*i.e.* mesa de trabajo obrador) presentó el valor más pequeño para el índice de Shannon, demostrando menor diversidad de la comunidad microbiana, con predominancia del 40 % aproximadamente para el phylum Proteobacteria. Además, la muestra M391 (*i.e.* armario útiles) presentó el valor más elevado para el índice de Simpson en el nivel taxonómico de phylum, demostrando la presencia de una comunidad menos diversa con una abundancia relativa del 62 % para Proteobacteria. En este sentido, la muestra M427, correspondiente a la misma superficie, pero muestreada un mes más tarde, obtuvo índices de Shannon y Simpson muy parecidos indicando que no hay cambios observables en cuanto a diversidad para esta categoría taxonómica.

Tal y como se ha indicado, las muestras M391 y M427 provienen del mismo lugar de muestreo, específicamente del armario de útiles. Al analizar la **Figura 6**, se destaca que la familia *Pseudomonadaceae* es la más predominante en ambas muestras, con una abundancia relativa del 25 % y 51 %, respectivamente. Cabe destacar que para la muestra M391, se obtuvo un 60 % de lecturas que no fueron clasificadas por el secuenciador en el nivel taxonómico de familia. Luego, al analizar la abundancia relativa de géneros obtenidas para estas muestras (**Figura 7**), se observa un cambio en estos, especialmente para la muestra M391, la cual se muestreó el 8/03/2022 y donde la predominancia fue de *Pseudomonas*. Es relevante destacar que existen interacciones interespecie sinérgicas

entre *L. monocytogenes* y *Pseudomonas* (Puga et al., 2018; Ripolles-Avila et al., 2022). En este caso, a la semana siguiente del muestreo de M391 se detectó en el armario de útiles presencia de *L. monocytogenes* (Mazaheri 2022). Al notificarle a la industria este resultado, la misma extremó las medidas de limpieza y desinfección, generando cambios en la comunidad microbiana de esta superficie en la muestra M427, la cual fue recogida 2 semanas después del positivo en el patógeno. Este cambio se puede visualizar en los géneros obtenidos, donde en lugar de predominar *Pseudomonas*, hubo mayor abundancia de *Oxalobacter*. En este contexto, se ha demostrado que *Pseudomonas* tiende a depositarse en zonas más superficiales de *biofilms*, protegiendo a patógenos que se quedan en zonas más profundas como es el caso de *L. monocytogenes* (Sasahara y Zottola, 1993). Por ello, la aplicación de procedimientos de limpieza y desinfección exhaustivos que eliminan capas superficiales de *biofilms* y garanticen valores bajos de este género podría ser una estrategia interesante para el control de *L. monocytogenes*. Los resultados del presente estudio demuestran como, después de la aplicación de dichos procedimientos, no se encontró presencia del patógeno pudiendo ser debido al cambio en el microbioma de la superficie. A su vez, es de destacar que en la muestra M427, obtuvo un mayor índice de Shannon que la muestra M391, indicando mayor diversidad microbiana, coincidiendo con el aumento de Unidades Operativas Taxonómicas (UTOs) para familia y género (**Tabla 4**).

Por último, las muestras obtenidas de la mesa de deshuesado (*i.e.* M1, M14 y M413) presentan una diversidad moderada según el índice de Shannon y una diversidad alta según el índice de Simpson (**Tabla 4**), lo que indica una comunidad microbiana con una presencia equitativa de diferentes géneros, sin uno dominante (**Figura 7**). A su vez, al comparar estas superficies con la muestra M392 (*i.e.* mesa de trabajo obrador), esta última presenta el índice de Simpson más alto de todas las muestras analizadas, llegando a ser cercano a 1 (*i.e.* 0,7670). Esto demuestra una menor diversidad de géneros en la comunidad, que al visualizar la **Figura 7**, se puede apreciar la dominancia del género *Pseudomonas*. Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con las conclusiones de De Filippis et al. (2013), quienes también identificaron a *Pseudomonas* como los principales microorganismos contaminantes en muestras de bistecs de carne de res. Estos hallazgos sugieren que los géneros bacterianos asociadas al deterioro se originan en las canales, y luego son transportadas al entorno de procesamiento donde se maneja la carne,

estableciendo una microbiota residente que puede contaminar otros productos cárnicos que entren en contacto con esa superficie.

Tabla 4. Índices de diversidad alfa y Unidades Taxonómicas Operativas (UTOs) obtenidas del análisis metagenómico de las muestras de una industria de procesamiento de cerdo ibérico.

Muestra	Phylum			Familia			Género		
	Shannon	Simpson	UTOs	Shannon	Simpson	UTOs	Shannon	Simpson	UTOs
M1	0,8992	0,4510	7	1,4168	0,2726	44	1,3289	0,2878	59
M14	0,6477	0,6393	10	1,7017	0,1899	71	1,6956	0,1920	110
M413	0,7665	0,6095	11	1,5518	0,2556	85	1,5273	0,2615	133
M391	0,1688	0,9187	13	0,4750	0,8047	96	0,6287	0,7379	212
M427	0,3885	0,8265	13	1,0145	0,5335	124	1,0411	0,4325	255
M394	0,2679	0,8440	11	1,0913	0,4568	96	1,0803	0,4624	175
M430	0,3428	0,8570	15	0,9849	0,5207	122	1,0182	0,5379	245
M4	0,9275	0,4319	13	1,5644	0,2532	112	1,5409	0,2639	274
M392	0,1583	0,9001	13	0,5664	0,7507	81	0,5580	0,7670	139
M414	0,7920	0,5465	10	0,9674	0,5401	95	0,9673	0,5400	182

En síntesis, en relación a los índices de diversidad alfa, se puede afirmar que el nivel taxonómico phylum, presenta los valores más elevados de Simpson y más bajos de Shannon en todas las muestras analizadas, afirmando el concepto que en este nivel existe menor diversidad, presentando mayor dominancia en ciertos phylums, como *Proteobacteria*. En cambio, para los niveles taxonómicos de familia y género, el índice Simpson tiende a disminuir, indicando mayor diversidad en todas las muestras. Esto se relaciona con el aumento de unidades taxonómicos operativas obtenidas en las lecturas del secuenciador para todas las muestras, demostrando de esta forma un abanico muy amplio de microorganismos en la comunidad de las superficies ambientales.

3.4. Abundancia de microorganismos por métodos convencionales:

Los resultados obtenidos mediante técnicas microbiológicas convencionales demostraron distintos perfiles de abundancia en comparación con los métodos de secuenciación masiva realizados en la sección anterior. Estos resultados podrían indicar que los métodos convencionales utilizados para analizar las muestras ambientales pueden estar subestimando la diversidad microbiana presente (Chen et al., 2020). Estos métodos, tienden a enfocarse en grupos específicos de microorganismos, como aerobios totales,

enterobacterias, coliformes y bacterias del ácido láctico, lo que podría limitar su capacidad para detectar otros géneros de microorganismos presentes en la muestra.

En la **Figura 8** se pueden observar los perfiles de abundancias para las muestras analizadas, siendo las bacterias aerobias mesófilas las más predominantes, seguidas por las bacterias del ácido láctico. Este último grupo se encontró por metodologías convencionales en un 50 % en M413 (*i.e.* mesa deshuesado), que, al comparar estos resultados con los obtenidos mediante la secuenciación de alta resolución, se observó 3,24 % de lecturas para el género *Enterococcus* (**Figura 7**). Aunque este género se encuentra en un porcentaje menor, también es un grupo de bacterias que puede estar involucrado en procesos de fermentación y producción de ácido láctico en ciertos contextos alimentarios y fermentativos, encontrándose en estudios como Hayes et al., (2003) en productos cárnicos vacunos, aviares, porcinos y de pavo. Aunque el género *Enterococcus* está presente en la muestra y podría contribuir en menor medida a la producción de ácido láctico, no ejerce un papel dominante en la comunidad microbiana de esta muestra. En este contexto es importante destacar que, al tratarse de una superficie que se encuentra en contacto directo con los alimentos, la posibilidad de contaminación cruzada es inminente si no se cumplen los protocolos de limpieza y desinfección correspondientes (Kusumaningrum et al., 2003; Pérez-Rodríguez et al., 2008). De esta forma, las dos metodologías brindan información relevante, donde los métodos microbiológicos ofrecen una información más genérica de la microbiota presente en las superficies, mientras que la secuenciación masiva, es más específica con sus hallazgos, permitiendo hacer un análisis más profundo y por lo tanto establecer planes de control y monitoreo más concretos en la industria alimentaria.

En el marco de este estudio, se distinguen hallazgos de gran interés, entre los cuales se destaca la detección del grupo de enterobacterias. Tal como se ilustra en la **Figura 8**, este grupo se encontró presente también en el 50 % de las muestras analizadas, con un ejemplo representativo en la muestra M14 (*i.e.* mesa de loncheado). A través del análisis metagenómico realizado en este trabajo, se identificó el género *Enterobacter* en la muestra M14, representando un 5,40 % del total de lecturas obtenidas (**Figura 7**). Si bien su presencia no fue dominante en términos de abundancia, es relevante considerar que, al tratarse de una superficie en contacto directo con alimentos listos para el consumo, la

detección de este género podría conllevar implicancias negativas para la calidad del producto y la inocuidad alimentaria.

Estos hallazgos resaltan la importancia de implementar protocolos de limpieza y desinfección efectivos en instalaciones de procesamiento de alimentos, especialmente en áreas de contacto directo con productos destinados al consumo humano (Finn et al., 2013). El monitoreo regular de la presencia de enterobacterias y otros microorganismos en estas superficies puede ser crucial para mantener la inocuidad y calidad de los alimentos, y garantizar la protección de la salud pública (Osimani et al., 2014). Paralelamente, es importante tener en cuenta que los análisis HTS no pueden discriminar entre células vivas y muertas, por lo que no pueden determinar la actividad biológica de los *biofilms* presentes en instalaciones alimentarias. Por lo tanto, a pesar de la valiosa información que aportan, los métodos basados en cultivo y/o actividad metabólica no pueden descartarse por completo, de forma que se requiere una combinación de ambos para conocer la globalidad de los resultados (Rodríguez-López et al., 2020). Esta investigación proporciona una base para futuros estudios sobre la diversidad microbiana en superficies de la industria cárnica y sus implicaciones en la seguridad y calidad de los productos alimentarios.

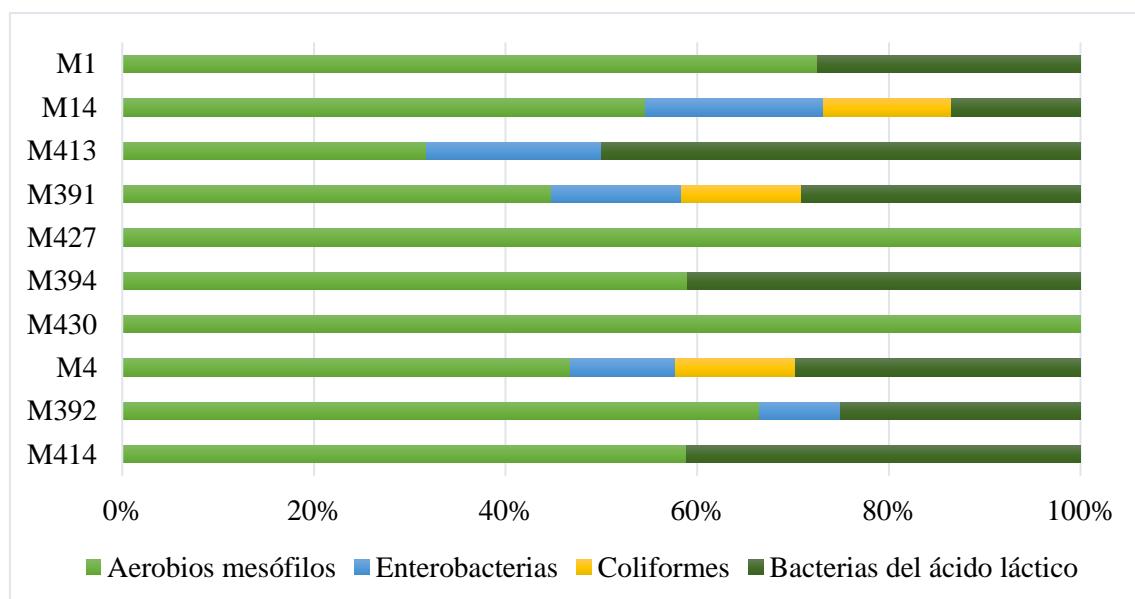


Figura 8. Abundancias relativas de diferentes grupos microbiológicos provenientes del estudio de Mazaheri, (2022).

4. CONCLUSIONES:

- 1) El análisis de la microbiota presente en entornos industriales es crucial para comprender la abundancia y variedad de microorganismos en la industria de alimentos, garantizando la seguridad alimentaria, mejorando los procesos y promoviendo prácticas innovadoras. Por ello, identificar microorganismos en superficies industriales ayuda a implementar medidas de control y prevención de contaminaciones cruzadas, contribuyendo a la seguridad alimentaria.
- 2) La puesta a punto del protocolo de amplificación del ADN y la secuenciación de alta resolución han resultado exitosas, ofreciendo resultados precisos y confiables. Los ajustes realizados en la amplificación, como el número de ciclos y la concentración de cebadores, han demostrado su impacto en la eficacia y especificidad del proceso. La optimización del protocolo de la secuenciación de alta resolución ha permitido un análisis detallado de la microbiota en las muestras. Estos avances son fundamentales para mejorar la calidad de los datos y contribuyen al progreso de la biología molecular.
- 3) La secuenciación masiva ofrece información detallada sobre la microbiota presente, permitiendo identificar géneros específicos y su relación con la calidad e inocuidad de los alimentos.
- 4) El conocimiento obtenido del análisis de la diversidad microbiana permite conocer la riqueza y equitatividad del ecosistema presente en las superficies de una industria alimentaria.
- 5) Los métodos microbiológicos convencionales subestiman la diversidad microbiana, pero son útiles para identificar bacterias comunes en superficies ambientales. Además, la combinación de métodos convencionales y secuenciación masiva brinda una visión completa de la diversidad microbiana en superficies industriales y facilita el diseño de estrategias de control para garantizar la inocuidad alimentaria.
- 6) Se sugiere continuar investigando tecnologías y métodos novedosos para lograr un análisis más rápido y preciso de la microbiota industrial, permitiendo una respuesta veloz ante posibles contingencias microbiológicas.

5. BIBLIOGRAFÍA:

- Authority, E. F. S. & European Centre for Disease Prevention and Control. (2022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 20(12), e07666. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>
- Barb, J. J., Oler, A. J., Kim, H. S., Chalmers, N., Wallen, G. R., Cashion, A., Munson, P. J., & Ames, N. J. (2016). Development of an Analysis Pipeline Characterizing Multiple Hypervariable Regions of 16S rRNA Using Mock Samples. *PloS one*, 11(2), e0148047. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148047>
- Barcina, I & Arana, I. (2009). The viable but nonculturable phenotype: A crossroads in the life-cycle of non-differentiating bacteria? *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 8. 245-255. 10.1007/s11157-009-9159-x.
- Bremer, P. J., Monk, I., & Osborne, C. M. (2001). Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp. *Journal of food protection*, 64(9), 1369–1376. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.9.1369>
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., & Dubois-Brissonnet, F. (2011). Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, 27(9), 1017–1032. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.626899>
- Brightwell, G., Boerema, J., Mills, J., Mowat, E. & Pulford, D. (2006). Identifying the bacterial community on the surface of Intralox belting in a meat boning room by culture-dependent and culture-independent 16S rDNA sequence analysis. *Int J Food Microbiol* 109:47–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.008>
- Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., Saraiva, A., & Raposo, A. (2021). Microbial Biofilms in the Food Industry-A Comprehensive Review. *International journal of environmental research and public health*, 18(4), 2014. <https://doi.org/10.3390/ijerph18042014>
- Castro, A., Santos, C., Meireles, H., Silva, J., & Teixeira, P. (2016). Food handlers as potential sources of dissemination of virulent strains of *Staphylococcus aureus* in the community. *Journal of infection and public health*, 9(2), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.08.001>
- Chaillou, S., Chaulot-Talmon, A., Caekebeke, H., Cardinal, M., Christieans, S., Denis, C., Desmonts, M. H., Dousset, X., Feurer, C., Hamon, E., Joffraud, J. J., La Carbona, S., Leroi, F., Leroy, S., Lorre, S., Macé, S., Pilet, M. F., Prévost, H., Rivollier, M., Roux, D., ... Champomier-Vergès, M. C. (2015). Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. *The ISME journal*, 9(5), 1105–1118. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.202>
- Chen, P., Sun, W., & He, Y. (2020). Comparison of the next-generation sequencing (NGS) technology with culture methods in the diagnosis of bacterial and fungal infections. *Journal of thoracic disease*, 12(9), 4924–4929. <https://doi.org/10.21037/jtd-20-930>
- De Filippis, F., La Storia, A., Villani, F., & Ercolini, D. (2013). Exploring the sources of bacterial spoilers in beefsteaks by culture-independent high-throughput sequencing. *PloS one*, 8(7), e70222. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070222>
- Donald M. Coen. (2006). The polymerase chain reaction. Current protocols in molecular biology. *Current Protocols in Molecular Biology*, 73(1), 15.0.1-15.0.3.

- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Emamjomeh, M., Hashim, A. M., Abdul-Mutalib, N. A., Mokhtar, N. F. K., Mustapha, N. A., Maeda, T., & Amin-Nordin, S. (2023). Profiling bacterial communities and foodborne pathogens on food-associated surface following contact with raw beef, chicken and pork using 16S amplicon metagenomics. *Food Control*, 149, 109698. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109698>
- Epstein S. S. (2009). Microbial awakenings. *Nature*, 457(7233), 1083. <https://doi.org/10.1038/4571083a>
- Esbelin, J., Santos, T., & Hébraud, M. (2018). Desiccation: An environmental and food industry stress that bacteria commonly face. *Food Microbiology*, 69, 82-88. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.017>
- Finn, S., Condell, O., McClure, P., Amézquita, A., & Fanning, S. (2013). Mechanisms of survival, responses and sources of *Salmonella* in low-moisture environments. *Frontiers in microbiology*, 4, 331. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00331>
- Francioli, D., Lentendu, G., Lewin, S., & Kolb, S. (2021). DNA Metabarcoding for the Characterization of Terrestrial Microbiota-Pitfalls and Solutions. *Microorganisms*, 9(2), 361. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020361>
- Frank, J. F., & Koffi, R. A. (1990). Surface-adherent Growth of *Listeria monocytogenes* is Associated with Increased Resistance to Surfactant Sanitizers and Heat. *Journal of food protection*, 53(7), 550–554. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-53.7.550>
- Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H., & Saito, M. (2016). Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *Journal of UOEH*, 38(3), 223–232. <https://doi.org/10.7888/juoeh.38.223>
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrød, S., Doulgeraki, A., Nychas, G. J., Kačániová, M., Czaczky, K., Ölmez, H., & Simões, M. (2015). Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in microbiology*, 6, 841. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841>
- González-Rivas, F., Ripolles-Avila, C., Fontecha-Umaña, F., Ríos-Castillo, A. G., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2018). Biofilms in the Spotlight: Detection, Quantification, and Removal Methods. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 17(5), 1261–1276. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12378>
- Green, E. D., Guyer, M. S., & National Human Genome Research Institute (2011). Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside. *Nature*, 470(7333), 204–213. <https://doi.org/10.1038/nature09764>
- Hanlon, K., McCann, J., Miller, M., Brashears, M., Smith, C., Brooks, J., & Legako, J. (2021). Microbial Profile Evaluation of Beef Steaks From Different Packaging and Retail Lighting Display Conditions. *Meat and Muscle Biology*, 5. <https://doi.org/10.22175/mmb.11711>
- Hascoët, A.-S., Ripolles-Avila, C., Guerrero-Navarro, A. E., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2019). Microbial Ecology Evaluation of an Iberian Pig Processing Plant through Implementing SCH Sensors and the Influence of the Resident Microbiota on *Listeria*

- monocytogenes. Applied Sciences*, 9(21), 4611. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/app9214611>
- Hassan, A. N., Birt, D. M., & Frank, J. F. (2004). Behavior of *Listeria monocytogenes* in a *Pseudomonas putida* biofilm on a condensate-forming surface. *Journal of food protection*, 67(2), 322–327. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.2.322>
- Hayes, J. R., English, L. L., Carter, P. J., Proescholdt, T., Lee, K. Y., Wagner, D. D., & White, D. G. (2003). Prevalence and antimicrobial resistance of enterococcus species isolated from retail meats. *Applied and environmental microbiology*, 69(12), 7153–7160. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7153-7160.2003>
- Hou, T., Liu, F., Liu, Y., Zou, Q. Y., Zhang, X., & Wang, K. (2015). Classification of metagenomics data at lower taxonomic level using a robust supervised classifier. *Evolutionary bioinformatics online*, 11, 3–10. <https://doi.org/10.4137/EBO.S20523>
- Illumina. (2011). *Quality Scores for Next-Generation Sequencing*. Illumina. Recuperado el día 7 de julio del 2023 de https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf
- Illumina. (2020). *Sistema iSeq™ 100*. Illumina. www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/iseq-100-sequencing-system-spec-sheet-770-2017-020-translations/iseq-100-sequencing-system-spec-sheet-770-2017-020-esp.pdf
- Illumina. (2023a). *Instrumentation General Reference Material List*. Illumina Knowledge. Recuperado el día 19 de Junio del 2023 de https://knowledge.illumina.com/instrumentation/general/instrumentation-general-reference_material-list/000001527
- Illumina. (2023b). Illumina Sequencing Overview: Library Prep to Data Analysis. [Diapositiva de PowerPoint].
- Illumina. (2023c). *What is Paired-End Sequencing?* Illumina. Recuperado el 19 de Junio del 2023 de <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/paired-end-vs-single-read.html>
- Illumina. (November 27, 2013). 16s Metagenomic Sequencing Library Preparation – Preparing 16s Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System. Document Part #15044223 Rev. B.
- Instituto Uruguayo de Normas Técnicas (UNIT) (2011). Sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP). Requisitos (UNIT 323: 2010).
- Ismaïl, R., Aviat, F., Michel, V., Le Bayon, I., Gay-Perret, P., Kutnik, M., & Fédérighi, M. (2013). Methods for recovering microorganisms from solid surfaces used in the food industry: a review of the literature. *International journal of environmental research and public health*, 10(11), 6169–6183. <https://doi.org/10.3390/ijerph10116169>
- Kainz P. (2000). The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochimica et biophysica acta*, 1494(1-2), 23–27. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(00\)00200-1](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(00)00200-1)
- Kim, B. R., Shin, J., Guevarra, R., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K. H., Lee, J. H., Kim, H. B., & Isaacson, R. (2017). Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *Journal of microbiology and biotechnology*, 27(12), 2089–2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>

- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1), e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Krause, L., Diaz, N. N., Goesmann, A., Kelley, S., Nattkemper, T. W., Rohwer, F., Edwards, R. A., & Stoye, J. (2008). Phylogenetic classification of short environmental DNA fragments. *Nucleic acids research*, 36(7), 2230–2239. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn038>
- Kusumaningrum, H. D., Riboldi, G., Hazeleger, W. C., & Beumer, R. R. (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International journal of food microbiology*, 85(3), 227–236. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00540-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00540-8)
- Lander E. S. (2011). Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature*, 470(7333), 187–197. <https://doi.org/10.1038/nature09792>
- Lemos, L. N., Fulthorpe, R. R., Triplett, E. W., & Roesch, L. F. (2011). Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. *Journal of microbiological methods*, 86(1), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.03.014>
- Mazaheri, T. (2022). *Control of Listeria monocytogenes biofilms in the food industry: fighting a recurring problem by studying its formation and elimination* [Tesis de doctorado no publicada]. Universitat Autònoma de Barcelona. Facultat de Veterinària.
- McHugh, A. J., Yap, M., Crispie, F., Feehily, C., Hill, C., & Cotter, P. D. (2021). Microbiome-based environmental monitoring of a dairy processing facility highlights the challenges associated with low microbial-load samples. *NPJ science of food*, 5(1), 4. <https://doi.org/10.1038/s41538-021-00087-2>
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2013). Guía de buenas prácticas para la producción, almacenamiento, distribución y comercialización de alimentos. Recuperado de <https://www.minsalud.gov.co/Documents/Archivos-temporal-jd/alimentos-temporal.pdf>
- Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. (27 de Septiembre del 2019). Informe de fin de seguimiento de brote de listeriosis. Recuperado de: https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/listeriosis/docs/Informe_cierre_Listeriosis_20190927.pdf
- Mizan, M. F., Jahid, I. K., & Ha, S. D. (2015). Microbial biofilms in seafood: a food-hygiene challenge. *Food microbiology*, 49, 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.009>
- Mørretrø, T., Langsrud, S & Heir, E. (2013). Bacteria on meat abattoir process surfaces after sanitation: characterisation of survival properties of *Listeria monocytogenes* and the commensal bacterial flora. *Adv Microbiol* 3:255– 264. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2013.33037>
- Mubarak, S.M., Al-Koofee, D.A., Radhi, O.A., Ismael, J.M., & Al-Zubaidi, Z.F. (2020). An Optimization and Common Troubleshooting Solving in Polymerase Chain Reaction Technique. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11, 427-436.
- Nakao, R., Inui, R., Akamatsu, Y., Goto, M., Doi, H., & Matsuoka, S. (2021). Illumina iSeq 100 and MiSeq exhibit similar performance in freshwater fish environmental DNA

- metabarcoding. *Scientific Reports* 11, 15763. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95360-5>
- Nikolaev, Y., Yushina, Y., Mardanov, A., Gruzdev, E., Tikhonova, E., El-Registan, G., Beletskiy, A., Semenova, A., Zaiko, E., Bataeva, D., & Polishchuk, E. (2022). Microbial Biofilms at Meat-Processing Plant as Possible Places of Bacteria Survival. *Microorganisms*, 10(8), 1583. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081583>
- Obradovic, J., Jurisic, V., Tasic, N., Mrdjanovic, J., Perin, B., Pavlovic, S., & Djordjevic, N. (2013). Optimization of PCR conditions for amplification of GC-Rich EGFR promoter sequence. *Journal of clinical laboratory analysis*, 27(6), 487–493. <https://doi.org/10.1002/jcla.21632>
- Olguín, N., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A., & Guillamón, J.M. (2006). Técnicas Independientes de cultivo para la identificación y cuantificación de microorganismos en el vino. *Tecnología del vino*. 34. 62.
- Oliver J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 34(4), 415–425. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (June, 2006). Food Security. Policy Brief. Issue 2. https://www.fao.org/fileadmin/templates/faoitaly/documents/pdf/pdf_Food_Security_Cocept_Note.pdf
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2021). La agricultura familiar y los desafíos de la sostenibilidad y el bienestar. Recuperado de <https://www.fao.org/family-farming/detail/es/c/1454895/>
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (7 de Junio del 2023). A guide to World Food Safety Day. Recuperado de <https://www.fao.org/3/cc3926en/cc3926en.pdf>
- Osimani, A., Garofalo, C., Clementi, F., Tavoletti, S., & Aquilanti, L. (2014). Bioluminescence ATP monitoring for the routine assessment of food contact surface cleanliness in a university canteen. *International journal of environmental research and public health*, 11(10), 10824–10837. <https://doi.org/10.3390/ijerph111010824>
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García, R. M., & Zurera, G. (2008). Understanding and modelling bacterial transfer to foods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 19(3), 131-144. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.08.003>
- Phadtare S. (2004). Recent developments in bacterial cold-shock response. *Current issues in molecular biology*, 6(2), 125–136.
- Portik, D. M., Brown, C. T., & Pierce-Ward, N. T. (2022). Evaluation of taxonomic classification and profiling methods for long-read shotgun metagenomic sequencing datasets. *BMC Bioinformatics*, 23(1), 541. <https://doi.org/10.1186/s12859-022-05103-0>
- Puga, C. H., Dahdouh, E., SanJose, C., & Orgaz, B. (2018). *Listeria monocytogenes* Colonizes *Pseudomonas fluorescens* Biofilms and Induces Matrix Over-Production. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1706. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01706>
- QIAGEN. (2010). *Taq* PCR Handbook. October edition.

- Ripolles-Avila, C., Hascoët, A. S., Martínez-Suárez, J. V., Capita, R., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2019). Evaluation of the microbiological contamination of food processing environments through implementing surface sensors in an iberian pork processing plant: An approach towards the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 99, 40-47. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.013>
- Ripolles-Avila, C., Martínez-Garcia, M., Capellas, M., Yuste, J., Fung, D. Y. C., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2020). From hazard analysis to risk control using rapid methods in microbiology: A practical approach for the food industry. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 19(4), 1877–1907. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12592>
- Ripolles-Avila, C., Guitan-Santamaria, M., Pizarro-Giménez, K., Mazaheri, T., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2022). Dual-species biofilms formation between dominant microbiota isolated from a meat processing industry with *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*: Unraveling their ecological interactions. *Food Microbiology*, 105, 104026. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104026>
- Rodicio, M. del R., & Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238-245.
- Rodríguez-López, P., Bernárdez, M., Rodríguez-Herrera, J. J., Comesaña, Á. S., & Cabo, M. L. (2019). Identification and metagenetic characterisation of *Listeria monocytogenes*- harbouring communities present in food-related industrial environments. *Food Control*, 95, 6-17. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.023>
- Rodríguez-López, P., Rodríguez-Herrera, J. J., & Cabo, M. L. (2020). Tracking bacteriome variation over time in *Listeria monocytogenes*-positive foci in food industry. *International journal of food microbiology*, 315, 108439. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108439>
- Roszen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., & Rasmussen, O. F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International journal of food microbiology*, 17(1), 37–45. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90017-w](https://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90017-w)
- Rubio, S., Pacheco-Orozco, R. A., Gómez, A. M., Perdomo, S., & García-Robles, R. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica: *Presente y futuro en la práctica clínica*. *Universitas Medica*, 61(2). <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed61-2.sngs>
- Rychlik, W., Spencer, W. J., & Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic acids research*, 18(21), 6409–6412. <https://doi.org/10.1093/nar/18.21.6409>
- Salazar, J. K., Carstens, C. K., Ramachandran, P., Shazer, A. G., Narula, S. S., Reed, E., Ottesen, A., & Schill, K. M. (2018). Metagenomics of pasteurized and unpasteurized gouda cheese using targeted 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiology*, 18(1), 189. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1323-4>

- Sasahara, K. C., & Zottola, E. A. (1993). Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* Utilizes a Primary Colonizing Microorganism in Flowing Systems. *Journal of food protection*, 56(12), 1022–1028. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.12.1022>
- Shaw, D. J. (2007). World Food Summit, 1996. En D. J. Shaw (Ed.), *World Food Security: A History since 1945* (pp. 347-360). Palgrave Macmillan UK. https://doi.org/10.1057/9780230589780_35
- Sirichoat, A., Sankuntaw, N., Engchanil, C., Buppasiri, P., Faksri, K., Namwat, W., Chanratita, W., & Lulitanond, V. (2021). Comparison of different hypervariable regions of 16S rRNA for taxonomic profiling of vaginal microbiota using next-generation sequencing. *Archives of microbiology*, 203(3), 1159–1166. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02114-4>
- Somerfield, P., Clarke, K., & Warwick, R. (2008). Simpson Index. En *Encyclopedia of Ecology* (pp. 3252-3255). <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00133-6>
- Stellato, G., Storia, A. L., Filippis, F. D., Borriello, G., Villani, F., & Ercolini, D. (2016). Overlap of Spoilage-Associated Microbiota between Meat and the Meat Processing Environment in Small-Scale and Large-Scale Retail Distributions. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 4045-4054. <https://doi.org/10.1128/AEM.00793-16>
- Stellato, G., Utter, D. R., Voorhis, A., De Angelis, M., Eren, A. M., & Ercolini, D. (2017). A Few *Pseudomonas* Oligotypes Dominate in the Meat and Dairy Processing Environment. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00264>
- Ushio, M., Furukawa, S., Murakami, H., Masuda, R., and Nagano, A. J. (2022). An efficient early-pooling protocol for environmental DNA metabarcoding. *Environ. DNA* 00, 1–17. <https://doi.org/10.1002/edn3.337>
- Wilson, J.-J., Sing, K.-W., & Jaturas, N. (2019). DNA Barcoding: Bioinformatics Workflows for Beginners. En *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* (pp. 985-995). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20468-8>
- Woese C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51(2), 221–271. <https://doi.org/10.1128/mr.51.2.221-271.1987>
- Yang, X., Noyes, N. R., Doster, E., Martin, J. N., Linke, L. M., Magnuson, R. J., Yang, H., Geornaras, I., Woerner, D. R., Jones, K. L., Ruiz, J., Boucher, C., Morley, P. S., & Belk, K. E. (2016). Use of Metagenomic Shotgun Sequencing Technology To Detect Foodborne Pathogens within the Microbiome of the Beef Production Chain. *Applied and environmental microbiology*, 82(8), 2433–2443. <https://doi.org/10.1128/AEM.00078-16>