



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

“EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD Y DINÁMICA BACTERIANA DEL CHORIZO TIPO ESPAÑOL DURANTE SU PROCESO DE MADURACIÓN, MEDIANTE DGGE Y SECUENCIACIÓN MASIVA”

T E S I S

para obtener el grado de
Doctora en Biotecnología

P R E S E N T A:

M. en B. Carmen Josefina Juárez Castelán

Directora de tesis:

Dra. Edith Ponce Alquicira

Asesores:

Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinosa

Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

Ciudad de México, 25 de septiembre del 2019

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNCP) del CONACYT, con la referencia 001466.

Agradecimiento al CONACYT por la beca de doctorado otorgada No. 253327.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00217

Matrícula: 210389327

Evaluación de la diversidad y dinámica bacteriana del chorizo tipo español durante su proceso de maduración, mediante DGGE y secuenciación masiva.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 25 del mes de septiembre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ALEJANDRO ALBERTO AZAOLA ESPINOSA
DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA BUENDIA
DRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH
DRA. MARIA DE LOURDES PEREZ CHABELA



CARMEN JOSEFINA JUÁREZ CASTELAN
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: CARMEN JOSEFINA JUAREZ CASTELAN

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REWSÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. ALEJANDRO ALBERTO AZAOLA
ESPINOSA

VOCAL

DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA
BUENDIA

VOCAL

DRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

SECRETARIA

DRA. MARIA DE LOURDES PEREZ CHABELA

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

“Evaluación de la diversidad y dinámica bacteriana del chorizo tipo español durante su proceso de maduración, mediante DGGE y secuenciación masiva”

que presentó:

M. en B. Carmen Josefina Juárez Castelán

El día 25 de septiembre del año 2019

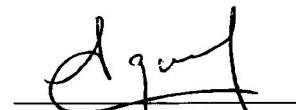
CÓMITE TUTORAL

Directora de tesis: Dra. Edith Ponce Alquicira



Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.

Asesor: Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinosa



Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Departamento de Sistemas Biológicos.

Asesor: Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

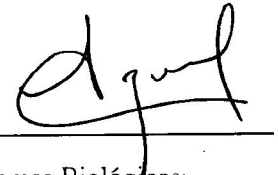


Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.

JURADO ASIGNADO

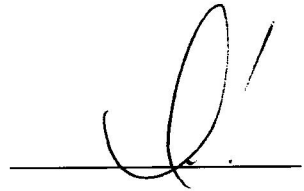
Presidente: Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinosa

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Departamento de Sistemas Biológicos:



Secretario: Dra. María de Lourdes Pérez Chabela

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.



Vocal: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.



Vocal: Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.



AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, la Dra. Edith Ponce Alquicira, por su confianza al aceptarme como parte de su grupo de trabajo, por sus enseñanzas, apoyo y conocimiento brindado, y por la gran paciencia que me brindo. Fue un gusto haber trabajado con usted.

A mis asesores:

Dr. Alejandro Azaola por su apoyo, asesoramiento y tiempo dedicado a este proyecto.

Dr. Héctor Escalona por sus observaciones y sugerencias.

A los revisores de esta tesis, por el tiempo dedicado, por todas las observaciones, comentarios, sugerencias y conocimientos que ayudaron a mejorar mi escrito, Dra. Lourdes Pérez Chabela y Dra. Maricarmen Quirasco Baruch.

Al Dr. Israel García Cano, por su asesoría, tiempo dedicado, propuestas y por su gran apoyo para cimentar las bases de este estudio.

A la Dra. Yenizey Merit Álvarez Cisneros, por todo el tiempo brindado, apoyo, sugerencias y consejos que ayudaron a aclarar dudas durante la elaboración de este proyecto.

A mis compañeros, Jessica, Adriana, Monse, José Luis, Arquímedes, Isadora, Edson, Mariel, Héctor y Zelick, por el apoyo, amistad y por los buenos momentos que me brindaron durante mi estancia en el laboratorio.

A la señora Marina Navarro Velázquez por el apoyo incondicional que me ha brindado, y por cuidar y amar a mis dos pequeños tesoros durante mi ausencia.

A Ulises Carrasco Navarro por caminar juntos.

DEDICATORIA

A mis hijos:

Rommel Sebastián Carrasco Juárez

y

Mía Natalia Carrasco Juárez

El tiempo que les he quitado está plasmado en estas páginas, espero comprendan que hay diferentes formas de escribirles que los amo.

A mis padres:

Elvira Castelán Bautista

y

Jesús Jacinto Juárez Jiménez

Mis padres me dieron lo mejor de ellos, lo mejor que tenían, sus mejores años y consejos.

Mi logro es gracias a ellos.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABLAS.....	vii
1.- RESUMEN.....	ix
2.- ABSTRACT	xi
3.- INTRODUCCIÓN.....	1
4.- MARCO TEÓRICO	4
4.1 Productos cárnicos	4
Chorizo	5
Proceso de maduración	7
Chorizo tipo español	8
4.2 Bacterias ácido-lácticas (BAL)	9
4.3 Análisis de las comunidades microbianas en alimentos.....	10
Marcadores RNA ribosomales 5S, 23S y 16S.....	11
PCR-DGGE.....	15
Tecnologías de secuenciación masiva	18
4.4 Análisis bioinformático de datos	21
Obtención de la información taxonómica y estudio de la biodiversidad	22
4.5 Medición de la diversidad.	24
Índices de diversidad.....	27
Rarefacción	27
Modelos no-paramétricos	27
Índice de Chao 1	28
Índices de equitatividad	28
Índice de Shannon-Wiener:	28
5.- JUSTIFICACIÓN	29
6.- HIPÓTESIS	30
7.-OBJETIVOS	31

8.- DIAGRAMAS EXPERIMENTALES.....	32
.....	33
9.- METODOLOGÍA	34
9.1 Muestras de chorizo tipo español	34
9.2 Análisis químico proximal	34
Determinación del contenido de humedad	34
Determinación del contenido de cenizas totales	35
Determinación del contenido de grasa.....	35
Determinación de proteína.....	35
9.3 Análisis fisicoquímico	36
Determinación de pH	36
Determinación de acidez total	36
Determinación de a_w	37
Contenido de MDA.....	37
9.4 Análisis microbiológico.....	37
9.5 Extracción de ADN de las colonias aisladas	38
Amplificación del gen completo 16S rRNA e identificación de la secuencia obtenida	39
9.6 Selección de cepas con potencial biotecnológico	39
Determinación de actividad antagónica	40
Determinación de actividad proteolítica	41
Determinación de actividad lipolítica.....	41
Selección de cepas para determinar la resistencia a pH, NaCl, temperatura y sales biliares.....	41
Resistencia a pH.....	41
Resistencia a NaCl.....	42
Resistencia a temperatura	42
Resistencia a sales biliares.....	43
9.7 Análisis molecular de la población bacteriana.....	43
Extracción del ADN total del producto cárnico.....	43
PCR-DGGE.....	44
Selección y secuenciación de bandas de la DGGE.....	46
9.8 Diversidad de especies	47
9.9 Secuenciación masiva con Illumina	48

9.10 Preparación y análisis bioinformático de secuencias	48
9.11 Dendograma	49
9.12 Análisis estadístico	49
10.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
10.1 Análisis Químico Proximal	50
10.2 Análisis fisicoquímico.....	51
10.3 Análisis microbiológico.....	54
10.4 Determinación del potencial biotecnológico de las BAL aisladas	62
10.5 Análisis molecular de la población bacteriana	71
Extracción del ADN total	71
Evaluación de la población bacteriana mediante PCR-DGGE.....	72
Evaluación de la población bacteriana mediante secuenciación masiva.....	81
11.- CONCLUSIONES.....	95
12.- PERSPECTIVAS	97
13. REFERENCIAS.....	98
14.- ANEXOS.....	105
Anexo 1.- Preparación de medios	105
Anexo 2.- Análisis digital de geles	107
Anexo 3.- Procedimiento para la secuenciación con tecnología Illumina.	107
Anexo 4.- Reporte de calidad de la secuenciación masiva	109
Anexo 5.- Gráfico interactivo tipo Krona	115
Anexo 6.- Tablas de anotación taxonómica	116
15.- PRODUCTOS GENERADOS	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama general del proceso de elaboración del chorizo tipo español.	9
Figura 2. RNA ribosomales 5S, 16S y 23S en células procariotas.	12
Figura 3. Gen 16S rRNA y las nueve regiones hipervariables con su número de pb que lo conforman. El número de pb puede variar según el diseño de los cebadores.	13
Figura 4. Representación de la técnica de la DGGE, basada en la separación electroforética de los productos de PCR en gel de poliacrilamida, conteniendo un gradiente químico desnaturizante de urea y formamida.	17
Figura 5. Anatomía de un dendograma (Imagen tomada de Mendoza-Revilla, 2012).	24
Figura 6. Representación gráfica de alfa, beta y gamma diversidad.	25
Figura 7. Clasificación de los métodos para medir la diversidad alfa (se remarcan los modelos utilizados en el análisis del chorizo tipo español).	26
Figura 8. Técnica para evaluar la actividad antagónica.	40
Figura 9. Resultados de los análisis fisicoquímicos (pH, a_w , AT y contenido de MDA), en la pasta cárnica (tiempo cero), y en las muestras obtenidas en los diferentes tiempos de maduración del chorizo tipo español. Las letras diferentes en cada uno de los gráficos representan diferencias significativas ($P \leq 0.5$) acorde a la prueba de Tukey para la comparación de medias.	53
Figura 10. Ejemplo de las diferentes morfologías de las colonias obtenidas del chorizo tipo español, crecidas en medio MRS-VB. [MRS-VB] medio control, [A] circulares, convexas de color verde claro con el centro verde oscuro, [B] circulares, convexas, grandes y blancas con el centro verde, [C] circulares, convexas, grandes y blancas, [D] circulares, convexas, pequeñas y de color blanco, [E] circulares, convexas, pequeñas y de color verde oscuro.	56
Figura 11. Ejemplo de las diferentes morfologías en las colonias obtenidas del chorizo tipo español, crecidas en medio EMB. [F] circulares, convexas, café oscuro y aspecto céreo, [G] grandes, convexas e irregulares, centro líquido, café oscuro, [H] puntiformes, café oscuro, [I] circulares, planas, aspecto céreo y color café oscuro.	57
Figura 12. Dendograma creado a partir del perfil de las secuencias de las BAL y enterobacterias aisladas en medio MRS-VB y EMB (respectivamente) e identificadas mediante la secuenciación del gen completo 16S rRNA. Se calculó con el método estadístico de Neighbor-Joining. El árbol consenso inferido por el	

método Boopstrap de 1000 repeticiones, muestra la relación entre las 24 diferentes secuencias parciales analizadas y comparadas con cuatro secuencias referencia obtenidas de la base de datos NCBI. La distancia de la relación fue calculada usando el método Tamura Nei. Se empleó el programa Mega-X. **61**

Figura 13. [Negativa] Actividad antagonica negativa de la cepa 1100, **[Positiva]** Actividad antagonica positiva derivada de la cepa 1101. **64**

Figura 14. Ejemplo de la actividad lipolítica y proteolítica presentada con cepas aisladas del chorizo tipo español en medios suplementados con tributirina y caseína (respectivamente). **[T+]** Formación de halo por actividad positiva de enzimas lipolíticas, **[C+]** Formación de halo por actividad positiva de enzimas proteolíticas, y **[T-]** Actividad negativa en medio tributirina. **64**

Figura 15. Visualización del ADN total y fragmentos obtenidos para las regiones V3 y V6-V8. **[A]** ADN total, visualizado en gel de agarosa al 0.8%. **[B]** Amplificación de la región V3 (~200 pb) y **[C]** Amplificación de la región V6-V8 (~400 pb). Visualizados en gel de agarosa al 0.1%. Muestras de pasta cárnica (0d), 10, 20 y 30 días de maduración del chorizo tipo español. **71**

Figura 16. Perfil de bandas de la DGGE (gradiente desnaturizante del 30 - 60%) de las BAL utilizando los cebadores correspondientes a la región V6-V8. Cada carril corresponde a cada una de las colonias aisladas. **73**

Figura 17. Perfil de bandas de la DGGE (gradiente desnaturizante del 30 al 60%) de las enterobacterias utilizando los cebadores correspondientes a la región V6-V8. Cada carril corresponde a cada una de las colonias aisladas. **75**

Figura 18. Perfil de bandeo obtenido de la DGGE (30-60%) de los fragmentos de ADN correspondientes a la región V6-V8. Carriles correspondientes a 0 d (pasta cárnica),10, 20 y 30 días de maduración del chorizo tipo español. **77**

Figura 19. Perfil de bandeo obtenido de la DGGE (30-60%) de los fragmentos de ADN correspondientes a la región V3 y V6-V8. Carriles correspondientes a 0 d (pasta cárnica),10, 20 y 30 días de maduración del chorizo tipo español. **81**

Figura 20. Distribución de la diversidad mediante un Análisis de Escala Multidimensional No Métrico (NMDS) de beta diversidad (Bray Curtis) de los OTUs al 97%, entre las muestras de chorizo tipo español. **85**

Figura 21. Curva de acumulación de especies (rarefacción). **86**

Figura 22. Abundancia relativa de la población en la pasta cárnica (0 días) y en los diferentes tiempos de maduración del chorizo tipo español (10, 20 y 30 días). [A] Anotación a nivel phylum. [B] Proteobacterias a nivel orden. [C] Firmicutes a nivel orden.	88
Figura 23. Abundancia relativa de la población a nivel de género en la pasta cárnica (0 días) y en los diferentes tiempos de maduración (10, 20 y 30 días).....	91
Figura 24. [A] Tableta de tonalidades de grises. [B] Curva de calibración.....	107
Figura 25. Representación de la técnica de secuenciación utilizando la tecnología de Illumina (imagen tomada de https://leandroroser.github.io).	108
Figura 26. Diagramas Per Base Sequence Quality para las secuencias obtenidas de los diferentes tiempos de maduración del chorizo tipo español. [A] Pasta cárnica (tiempo cero). [B] 10 días. [C] 20 días. [D] 30 días de maduración.	110
Figura 27. Diagramas Per Base Sequence Content para las secuencias obtenidas de los diferentes tiempos de maduración del chorizo tipo español. [A] Pasta cárnica (tiempo cero). [B] 10 días. [C] 20 días. [D] 30 días de maduración.	112
Figura 28. Diagramas Per Sequence GC Content para las secuencias obtenidas de los diferentes tiempos de maduración del chorizo tipo español. [A] Pasta cárnica (tiempo cero). [B] 10 días. [C] 20 días. [D] 30 días de maduración.....	113
Figura 29. Diagramas Sequence Length Distribution para las secuencias obtenidas de los diferentes tiempos de maduración del chorizo tipo español. [A] Pasta cárnica (tiempo cero). [B] 10 días. [C] 20 días. [D] 30 días de maduración.	114
Figura 30. Imágenes tomadas de los gráficos interactivos (Krona) de las muestras del chorizo tipo español. [A] Pasta cárnica (tiempo cero). [B] 10 días. [C] 20 días. [D] 30 días de maduración.	115

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Plataformas de secuenciación del ADN de 2 ^{da} y 3 ^{era} generación (Modificada de Glenn, 2011). ..	20
Tabla 2. Condiciones de la PCR para amplificar el gen completo 16S rRNA.	39
Tabla 3. Condiciones de la PCR para amplificar la región V3 del gen 16S rRNA.	45
Tabla 4. Condiciones de la PCR para amplificar la región V6-V8 del gen 16S rRNA.	45
Tabla 5. Secuencia de los cebadores utilizados en la amplificación del gen completo 16S rRNA y de las regiones V3, V6-V8 y V3-V4.	45
Tabla 6. Análisis químico proximal (base húmeda) de la pasta cárnica y del chorizo tipo español a los 10, 20 y 30 días de maduración.	50
Tabla 7. Análisis microbiológico de la pasta cárnica y del chorizo tipo español a diferentes tiempos de maduración. Los valores por columna que muestran diferentes letras (^a , ^b o ^c) son significativamente diferentes ($P \leq 0.5$) acorde a la prueba de Tukey para la comparación de medias.	55
Tabla 8. Identidad obtenida mediante el análisis del gen completo 16S rRNA de las cepas aisladas en agar MRS-VB, a partir de la pasta cárnica y el chorizo tipo español a los 10, 20 y 30 días de maduración. ...	57
Tabla 9. Identidad de las colonias aisladas en agar EMB; provenientes de la pasta cárnica y del chorizo tipo español a diferentes tiempos de maduración. Identificadas mediante el análisis del gen completo 16S rRNA.	59
Tabla 10. Tinción de Gram, evaluación de la actividad catalasa y producción de las BAL identificadas durante el proceso de maduración del producto cárnico.	62
Tabla 11. Evaluación de las actividades antagónica, lipolítica y proteolítica de las cepas aisladas en medio MRS-VB a partir de la pasta cárnica y durante el proceso de maduración del chorizo tipo español.	66
Tabla 12. Evaluación de la resistencia a diferentes valores de pH y concentraciones de NaCl de las BAL identificadas. Determinación espectrofotométrica.	68
Tabla 13. Evaluación de la actividad antagónica, lipolítica y proteolítica de las cepas aisladas en medio EMB a partir de la pasta cárnica y del proceso de maduración del chorizo tipo español.	70
Tabla 14. Identidad de las bandas seleccionadas correspondientes a las BAL aisladas en medio MRS-VB. Identificadas mediante el análisis de la región V6-V8 del gen 16S rRNA.	74

Tabla 15. Identidad de las bandas seleccionadas de la DGGE correspondiente al proceso de maduración del chorizo tipo español. Identificadas mediante el análisis de la región V6-V8 del gen 16S rRNA.....	78
Tabla 16. Evaluación digital de los índices de la comunidad microbiana. S (riqueza de especies), H (diversidad estructural), y J (uniformidad de Pielou).	80
Tabla 17. Índices de diversidad alfa, estimados a partir de la secuenciación masiva de los diferentes tiempos de maduración del chorizo tipo español.....	83
Tabla 18. Posibles cepas relacionadas con la población dominante y subdominante a nivel de especie en la pasta cárnica y en los tres tiempos del proceso de maduración del chorizo tipo español obtenidas del análisis de secuenciación masiva.	92

1.- RESUMEN

El chorizo tipo español es un producto cárnico madurado altamente apreciado por los consumidores debido a sus excelentes características sensoriales. Este producto cárnico fue analizado en diferentes etapas de maduración (0, 10, 20 y 30 días). Se realizó el análisis químico proximal y se evaluaron los parámetros fisicoquímicos de pH y actividad de agua (a_w), así como la acidez total (AT) y contenido de malonaldehído (MDA). Se determinó la población de mesófilos aerobios totales, bacterias ácido lácticas (BAL) y enterobacterias por métodos tradicionales de microbiología. Las colonias aisladas durante el proceso de maduración fueron identificadas mediante la secuenciación del gen 16S rRNA y evaluadas en su actividad antagónica ante microorganismos alterantes (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus curvatus* y *Pediococcus acidilactici*), lipolítica y proteolítica, además de su resistencia a pH, NaCl, temperatura y sales biliares, con el fin de conocer el potencial biotecnológico de cada una de las cepas identificadas. Por otra parte, se analizó la diversidad y dinámica bacteriana asociada al proceso de maduración mediante la técnica molecular de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) y mediante la secuenciación masiva de cada una de las muestras, la cual se llevó a cabo con tecnología de secuenciación de alto rendimiento MiSeq Illumina. El análisis químico proximal mostró un aumento en el contenido de cenizas, grasa y proteína, y una disminución de humedad en aproximadamente un 50%. Los valores obtenidos de los parámetros fisicoquímicos analizados fueron los esperados, acorde con la estabilidad comercial y seguridad microbiológica del producto. El pH y la a_w disminuyeron durante el proceso de maduración y el contenido de AT y MDA se incrementaron significativamente dentro de los parámetros de calidad y características del producto cárnico, estos cambios están correlacionados con la dinámica en la población bacteriana. Se observó una disminución en las UFC de las enterobacterias y un aumento de las BAL. Algunas de las bacterias identificadas mediante la secuenciación del gen completo 16S rRNA fueron: *Lactobacillus sakei*, *Weissella thailandensis* y *Pediococcus acidilactici*, está última como la única cepa que presentó mayor actividad antagónica contra los microorganismos alterantes probados (*Lactobacillus curvatus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*), y la mayor actividad lipolítica y proteolítica, por lo que se consideró como la cepa con mayor potencial biotecnológico. La diversidad obtenida mediante la técnica de PCR-DGGE, muestra a *Pseudomonas* y *Lactobacillus* como los géneros más abundantes al inicio y término del proceso de maduración (respectivamente), y se identificó a las cepas *Pseudomonas fragi*, *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus curvatus* como los más predominantes con este análisis. Los dos géneros anteriormente mencionados también fueron identificados en el análisis de secuenciación masiva. Sin embargo, con esta tecnología se logró visualizar con mayor profundidad los cambios en la diversidad bacteriana de cada una de las muestras analizadas. Se obtuvieron entre 679,000 y 868,000 secuencias pareadas de cada tiempo de maduración. La diversidad total bacteriana en la muestra inicial fue representada por los phyla Proteobacteria (44%) y Firmicutes (55%), donde los géneros *Pseudomonas* (23%), *Streptococcus* (21%), *Acinetobacter* (14%),

Bacillus (13%) y *Brochothrix* (11%) fueron los abundantes. En contraste, el phylum Firmicutes aumentó hasta en un 89%, siendo *Lactobacillus* y *Streptococcus* los géneros más representativos durante el proceso de maduración y dentro de las posibles especies dominantes y subdominantes se identificó a *Lactobacillus sakei*, *Streptococcus salivarius*, *Acinetobacter sp.*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fragi* y *Lactobacillus curvatus*, entre otros.

2.- ABSTRACT

Spanish-type chorizo is ripening meat product that is highly appreciated by consumers for its excellent sensory characteristics. This meat product was analyzed at different ripening stages (0, 10, 20 and 3 days). The proximal analysis was carried out, in addition to the physicochemical properties pH, water activity (a_w), total acidity (AT) and malonaldehyde content (MDA). The population of total aerobic mesophilic, lactic acid bacteria (LAB) and enterobacteria were determined by traditional microbiological methods. The colonies isolated during the ripening process were identified by the 16S rRNA gene sequencing; also, their antagonistic (against *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus curvatus* and *Pediococcus acidilactici*), lipolytic and proteolytic activity were evaluated; as well as their resistance to pH, NaCl, temperature and bile salts, in order to know the biotechnological potential of the identified strains. On the other hand, the diversity and bacterial dynamics associated with the maturation process were analyzed by means of the molecular electrophoresis technique with denaturing gradient gel (DGGE) and by massive sequencing of each of the samples, which was carried out with technology of MiSeq Illumina high-throughput sequencing technology. The proximal chemical analysis showed an increase in the content of ashes, fat and protein, and a decrease in humidity by approximately 50%. The values obtained from the physicochemical parameters analyzed were as expected, in accordance with the commercial stability and microbiological safety of the product. The pH and the a_w decreased during the ripening process, while the content of AT and MDA increased significantly in accordance to the quality and characteristics of the meat product. These data are correlated with changes in the bacterial population, a decrease in the CFU of the enterobacteria and an increase in the LAB were observed. Some of the bacteria that were identified by sequencing the 16S rRNA gene were: *Lactobacillus sakei*, *Weissella thailandensis* and *Pediococcus acidilactici*, the latter being the only strain that presented positive antagonistic activity against a greater number of the altered microorganisms tested (*Lactobacillus curvatus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*), and the highest lipolytic and proteolytic activity, which is why it was considered the strain with the greatest biotechnological potential. The diversity obtained by the DGGE technique shows the genera *Pseudomonas* and *Lactobacillus* as the most abundant at the beginning and end of the ripening process, respectively, and the strains *Pseudomonas fragi*, *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* were identified as the most predominant with this analysis. These two genera are also reported in the metagenomic analysis. However, with the massive sequencing it was possible to visualize in greater detail the changes within the bacterial diversity of each of the analyzed times. Between 679,000 and 868,000 paired sequences were obtained from each ripening stage. The total bacterial diversity in the initial sample was represented by phyla Proteobacteria (44%) and Firmicutes (55%), where *Pseudomonas* (23%), *Streptococcus* (21%), *Acinetobacter* (14%), *Bacillus* (13%) and *Brochothrix* (11%) were the most abundant genera, in contrast, Firmicutes phyla increased up to 89%, *Lactobacillus* and *Streptococcus* being the most representative genera during the ripening process, and within the

possible dominant and subdominant species, *Lactobacillus sakei*, *Streptococcus salivarius*, *Acinetobacter sp.*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fragi* and *Lactobacillus curvatus*, among others, were identified.

3.- INTRODUCCIÓN

Los productos cárnicos crudos-curados fermentados como el chorizo son productos tradicionales desarrollados desde la antigüedad como una forma para conservar la carne y que ha sido muy popular en diversos países de Europa y América latina. La preparación de este tipo de productos se basa en la mezcla de carne de cerdo, lardo, sales curantes, pimentón y otras especias. El proceso involucra el picado de los materiales cárnicos, el mezclado y amasado de la carne con las especias, el reposo y maceración por 24 h, embutido de la pasta en tripa natural, seguida de la maduración y secado en condiciones controladas de humedad y temperatura entre 12 a 18°C y una humedad relativa entre 65 a 75%. Además, en ocasiones los chorizos pueden ser ahumados antes de la maduración (Estevan-Fernández, 2013; Toldrá & Hui, 2014). En el mercado se pueden identificar diversos tipos de chorizos que se diferencian por el lugar donde se elaboran, el tipo de carne y las especias utilizadas, así como por la forma de atado, el peso y por algunas variaciones en el proceso. En México el consumo de chorizo es una tradición arraigada con productos descendientes del chorizo español con variaciones particulares, en parte debido a que el chorizo tipo español no requiere de refrigeración para su conservación o de algún tratamiento térmico previo a su consumo, y presenta muy agradables propiedades sensoriales. La calidad de las materias primas y la microbiota presente juegan un papel primordial en la calidad de los embutidos fermentados. Muchas bacterias fermentativas se encuentran en forma natural en la carne y tripas de animales, y se desarrollan de forma natural inducidas por las condiciones del proceso; sin embargo, cada vez es más común el empleo de algún cultivo iniciador de bacterias lácticas para asegurar la calidad microbiológica y las características sensoriales del producto final (Cocolin, Manzano, Cantoni, & Comi, 2001; Połka, Rebecchi, Pisacane, Morelli, & Puglisi, 2015). Sin embargo, a algunos productos no se les adiciona un cultivo iniciador y sus características sensoriales son aceptadas, debido a la calidad de la carne, del resto de los ingredientes y de las condiciones de maduración (Aquilanti et al., 2007; Cocolin et al., 2009; Bañón Arias, Martínez, & López, 2011; Fonseca, Cachaldora, Gómez, Franco, & Carballo, 2013).

Durante el proceso de maduración se producen cambios fisicoquímicos y bioquímicos que inducen al desarrollo de algunas poblaciones específicas de microorganismos (Tabanelli, Montanari, Grazia, Lanciotti, & Gardini, 2013). La mayoría de los microorganismos proliferan por encima de 0.97 de actividad de agua (a_w); sin embargo, algunos géneros son capaces de multiplicarse a valores por debajo de 0.90. Este factor no es el único que limita el crecimiento, existen otros como el pH, la acidez y los nutrientes, que influyen en el desarrollo bacteriano (Fonseca et al., 2013). Adicionalmente, la oxidación lipídica que ocurre durante el proceso de maduración es uno de los principales factores bioquímicos que determinan la calidad del producto y los cambios relacionados con el color, olor, sabor y textura (Wenjiao, Yongkui, Yunchuan, Junxiu, & Yuwen, 2014).

Estudios anteriores han reportado que la microbiota nativa del chorizo es diversa y compleja; y que los microorganismos desarrollados tienen una alta correlación con las condiciones de maduración (Pérez-Álvarez, Sayas-Barberá, Fernández-López, & Aranda-Catalá, 1999; Cocolin et al., 2001). Las especies dominantes de la microbiota descritas en alimentos han sido aisladas por métodos de microbiología tradicional usando medios de cultivo selectivos. Sin embargo, estos métodos tienen una desventaja, debido a que únicamente se analizan los microorganismos cultivables, generando una visualización incompleta de la microbiota total (Giraffa & Neviani, 2001). A principios de los años 1990s, surgieron nuevos métodos para la descripción de las comunidades bacterianas, a través del desarrollo de métodos de cultivo independiente, como la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD)-PCR, PCR tiempo real, electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE), y electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) (Fontana, Vignolo, & Cocconcelli, 2005; Iacumin, Comi, Cantoni, & Cocolin, 2006; Cocolin et al., 2007; Fonseca et al., 2013). Con el uso de estas técnicas se identificaron diversas bacterias ácido lácticas (BAL) en chorizo, incluyendo a *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, y *Lactobacillus plantarum*, y a algunas especies de los géneros *Enterococcus*, *Pediococcus*, y *Staphylococcus* (Fontana et al., 2005; Urso, Comi, & Cocolin, 2006; Cocolin et al., 2009; Fonseca et al., 2013). La mayoría de estos métodos permiten la identificación precisa a través de la secuenciación del gen ribosomal 16S rRNA. Posteriormente a finales de los 1990s, se

desarrollaron nuevos métodos de secuenciación del ADN, como la pirosecuenciación y la secuenciación por ligación. Estos métodos fueron descritos como tecnología de secuenciación de alto rendimiento (HTS), lo que revolucionó el estudio de los ecosistemas microbianos (Kergourlay, Taminau, Daube, & Champomier Vergès, 2015). incluyendo a los alimentos. Actualmente, estas tecnologías juegan un papel muy importante en el estudio de las comunidades microbianas en alimentos. En diversas investigaciones en salami italiano, chorizo fermentado y productos elaborados con carne de cerdo se han utilizado las HTS (Połka et al., 2015; Fontana et al., 2016; Koo, Baker, Kim, Park, & Ricke, 2016). Del mismo modo, Wang et al., (2016) y Yang et al., (2018), analizaron la comunidad microbiana en carne empacada a diferentes atmosferas modificadas.

El objetivo del presente estudio fue evaluar los cambios en las propiedades fisicoquímicas del chorizo tipo español y su relación con la microbiota en la pasta cárnica, y en tres diferentes etapas de maduración. Adicionalmente, analizamos, comparamos y conjuntamos los resultados de la diversidad bacteriana obtenida mediante microbiología tradicional, PCR-DGGE y secuenciación masiva, para tener una mejor comprensión de los posibles microorganismos responsables del proceso de maduración en el producto cárnico. Según nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que engloba las técnicas de microbiología tradicional, PCR-DGGE y la secuenciación masiva, para analizar la dinámica poblacional bacteriana y los cambios fisicoquímicos durante el proceso de maduración del chorizo tipo español.

4.- MARCO TEÓRICO

4.1 Productos cárnicos

Los productos cárnicos procesados son elaborados a partir de carne, vísceras, estructuras anatómicas, sangre o sus mezclas, provenientes de mamíferos o aves, los cuales pueden someterse a diferentes procesos como: ahumado, cocción, curación, desecación, maduración, salación, entre otros.

Según la materia prima de la que se componen y la tecnología de elaboración utilizada se clasifican de la siguiente manera (NOM-145-SSA1-1995; NOM-213-SSA1-2002):

- Productos cárnicos cocidos
- Productos cárnicos crudos
- Productos cárnicos desecados, secos o salados
- Productos cárnicos empanados o rebozados congelados
- Productos cárnicos fritos
- Productos cárnicos curados y madurados
- Productos cárnicos marinados o en salmuera

En México, el consumo per cápita de productos cárnicos procesados aumentó de 7.8 Kg en el 2011 a 8.6 Kg en el 2017. La salchicha ocupa el primer lugar en la lista de consumo de los embutidos en el país abarcando un 48% del mercado de este tipo de productos, seguida por el jamón con un 42% y el chorizo con un 3%, entre otros (información obtenida del Consejo Mexicano de la Carne. Compendio estadístico 2018, disponible en <https://comecarne.org/estadisticas/>), de los cuales existen diferentes tipos y costos dependiendo el tipo de carne, la materia prima y la localidad de elaboración.

Chorizo

El chorizo se clasifica como un producto crudo, curado y madurado, que por norma se define como aquel que se elabora con cortes de carne picada y grasa de algunas especies animales consideradas aptas para consumo humano, mezclada con sal, especias y en la mayoría de los casos con agentes curantes (nitritos, nitratos y ascorbatos), y carbohidratos, el cual es embutido en tripa natural o artificial, madurado y curado por un tiempo determinado por medio de la adición o no de cultivos microbianos (NOM-145-SSA1-1995; Gounadaki, Skandamis, & Nychas, 2009).

Existen diferentes tipos de chorizos dependiendo el tipo de carne (jabalí, caballo, cerdo, res, pollo, llama, etc), el país de origen o localidad (mexicano, español, argentino, etc), la forma (herradura, ristra, vela, etc), el contenido de proteína, por el nivel de secado (secos con el 30 al 35%, semisecos con un 40 al 50% y sin secar con una humedad superior al 60%) (Gounadaki et al., 2009; González-Tenorio et al., 2013; Cobos-Velasco et al., 2014; Ockerman & Basu, 2014).

Durante la elaboración del chorizo se llevan a cabo diferentes pasos los cuales se describen brevemente a continuación:

1.- Picado y troceado de carne y lardo: se realiza en función del tamaño que se quiera obtener, este proceso favorece la uniformidad del producto, de los ingredientes y facilita el proceso de mezclado. La temperatura óptima de picado es de 0 a 2°C. La operación del picado influye en la adecuada consistencia al corte del producto final.

2.- Mezclado y amasado: durante este proceso se obtiene una masa homogénea entre la carne, la grasa y una serie de aditivos que cumplen diversas funciones e influyen en las características del producto final.

Sal común: ingrediente esencial en los embutidos crudos curados, involucrado en la mejora del sabor, reduce la a_w , con lo que se restringen las condiciones de desarrollo de algunos microorganismos indeseables. Su importancia tecnológica radica en la influencia sobre múltiples reacciones de los procesos de maduración, como la desecación y ligazón en la pasta, ya que

interviene en la solubilización de las proteínas cárnicas, formando una película adhesiva lo que permite que las partículas de la carne y la grasa se intercalen. La cantidad de sal suele variar entre un 2 y 3% en el producto final.

Sales curantes (nitritos y nitratos): su principal objetivo es la inhibición de los microorganismos indeseables como *Clostridium botulinum*, también ayudan a la formación del color típico de los productos curados (por formación del complejo nitrosomioglobina) y en el desarrollo del aroma por reacción de varios componentes de la carne con los nitritos o el óxido nítrico.

Azúcares: Dentro de los hidratos de carbono la glucosa es asimilada rápidamente por casi todos los microorganismos, lo que ayuda a activar la acidificación y descenso del pH por acción de los microorganismos.

Espicias: ingredientes vegetales que se utilizan en pequeñas cantidades para conferir determinados sabores, aromas y colores a los productos cárnicos, algunas tienen papel antioxidante (pimienta negra y jengibre), o antimicrobiano (ajo).

3.- Reposo y maceración: durante este proceso se produce una serie de reacciones con cambios bioquímicos. Se lleva a cabo en una cámara de refrigeración a una temperatura de 1 a 5°C, en un tiempo de 24 a 36 h aproximadamente.

4.- Embutido de la pasta: es la introducción de la pasta cárnica al interior de la tripa natural o artificial que le sirve de receptáculo y protección.

5.- Atado (clipado o engrapado): se puede realizar atando un cordel o mediante el engrapado de la tripa. Tiene como objetivo reducir la presencia de aire, dar forma, consistencia y protección al embutido.

6.- Maduración/Curado: proceso que se lleva a cabo en cámaras con temperatura y humedad controladas. Durante este proceso, el producto es sometido a una deshidratación parcial (> 30%), bajo la acción de las condiciones ambientales y de cultivos añadidos o propios de la carne.

7.- Fermentación: El embutido se mantiene en cámaras de temperatura (10 a 12°C) y humedad relativa (80 a 95%) controladas, durante un período de tiempo que puede variar de 24 a 72 h. Durante esta etapa los microorganismos metabolizan los azúcares (presentes y/o añadidos) a ácido láctico, principalmente, y el pH disminuye a valores cercanos a 5.0 (alrededor del punto isoeléctrico de las proteínas cárnicas). Este cambio en el pH reduce la capacidad de retención de agua en la masa cárnica, facilitando el secado y promueve la coagulación de las proteínas cárnicas que aportan firmeza al producto final. Junto con los azúcares, las proteínas musculares cárnicas (actina y miosina) empiezan a ser degradadas a péptidos, principalmente por las proteasas musculares (catepsina). Al mismo tiempo, se inicia la lipólisis o hidrólisis lipídica debido a las lipasas microbianas y lipasas endógenas de la carne (Ordóñez, Hierro, Bruna, & Hoz, 1999; Martín-Juárez, 2005).

Proceso de maduración

El proceso de maduración se lleva a cabo mediante los microorganismos nativos de la carne y de los diferentes componentes del producto cárnico o por los microorganismos añadidos intencionalmente (cultivo iniciador). Un cultivo iniciador garantiza la estabilidad, seguridad microbiológica y estandariza las propiedades del producto cárnico, incluyendo las características sensoriales como: sabor, color, olor y textura (Cocolin et al., 2001). Durante dicho proceso se llevan a cabo diferentes reacciones químicas y cambios fisicoquímicos, provocando que el agua empiece a migrar hacia la superficie, donde se evapora, removiendo del 15 al 50% de humedad, obteniendo una relación de humedad y proteína de 2.3:1.0. En la etapa inicial de la fermentación la microbiota transforma los carbohidratos en ácido láctico y otros metabolitos como el ácido acético, acetoína y ácidos grasos de cadena corta, induciendo el descenso de pH a valores de 5.3 o inferiores, además del decremento en la capacidad de retención de agua, dependiendo de la

composición de la población bacteriana, la formulación y la temperatura (Gounadaki et al., 2009; Ockerman & Basu, 2014). El desarrollo microbiano y algunas reacciones enzimáticas como la proteólisis y la lipólisis por acción de proteasas y lipasas musculares como la catepsina D y lipasas lisosomales (ambas activas a pH ácido), influyen en los cambios de textura y de sabor en el producto alimenticio (Toldrá, 2017). Estos procesos dan como resultado un chorizo con un pH bajo y una a_w reducida que hace que el producto final sea estable y con una larga vida de anaquel.

Chorizo tipo español

Cada país le ha dado un toque distintivo a su chorizo, con adobos particulares o tipo de especias. América latina tiene sus propios chorizos, algunos descendientes del chorizo español el cual se caracteriza por ser elaborado específicamente con carne de cerdo condimentada con ajo y pimentón.

En el estado de Hidalgo en la zona centro de México, la empacadora Murgati S.A de C.V., produce industrialmente un chorizo tipo español madurado, sin la adición de un cultivo iniciador. Su proceso de elaboración (Figura 1) se basa en la mezcla de carne de cerdo, lardo, sales curantes, pimentón, ajo y otras especias. La pasta cárnica obtenida es embutida en tripa de cerdo natural y posteriormente madurada durante 30 días en condiciones controladas de temperatura y humedad. Este producto cárnico se caracteriza por no requerir de refrigeración para su conservación o de tratamientos térmicos previos a su consumo y por presentar características sensoriales agradables. Cabe mencionar que los componentes y cantidades específicas de cada uno de ellos, en la formulación del chorizo tipo español no se muestran por ser datos confidenciales por la Empacadora Murgati S.A de C.V.

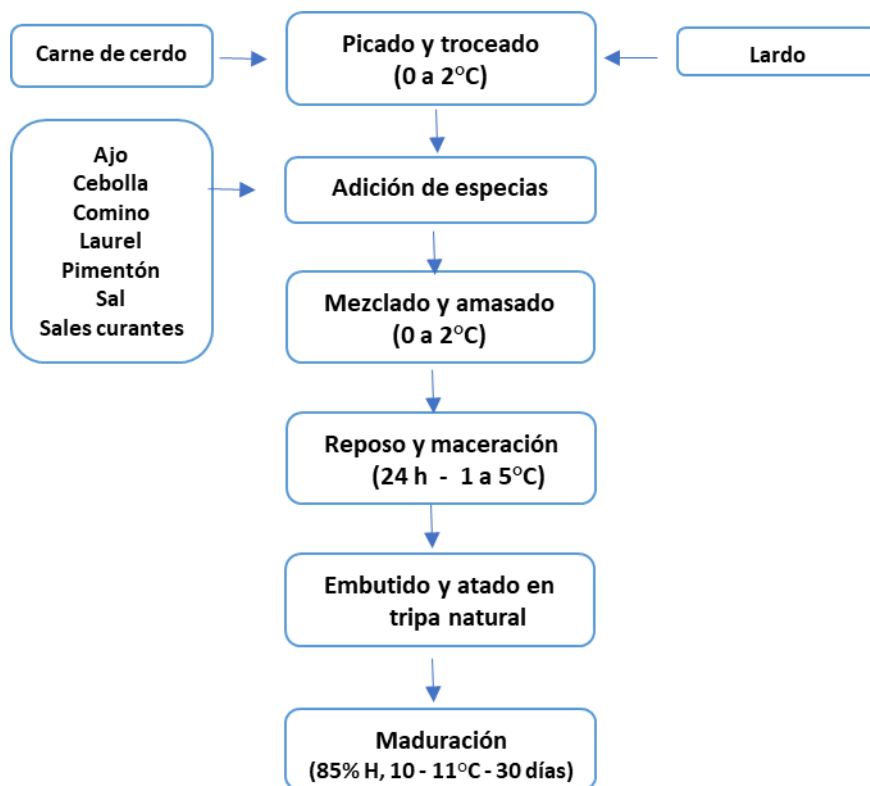


Figura 1. Diagrama general del proceso de elaboración del chorizo tipo español.

4.2 Bacterias ácido-lácticas (BAL)

Las BAL son un diverso grupo representado por varios géneros con características morfológicas y fisiológicas en común. Son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, aerotolerantes; oxidasa y catalasa negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos. Además, las BAL son ácidos tolerantes, algunas pueden crecer a valores de pH bajos como 3.2, otras a valores altos como 9.6, y la mayoría crece a un valor de pH entre 4 y 4.5 (Carr, Chill, & Maida, 2002). Los géneros representativos de las BAL pertenecientes al phylum Firmicutes son: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Weisella*, *Pediococcus* y *Lactococcus*, así como *Bifidobacterium* del phylum Actinobacteria. Se caracterizan por tener grandes requerimientos de factores de crecimiento como

péptidos y aminoácidos, no pueden asimilar nitrógeno inorgánico, pero son capaces de degradar proteínas y péptidos para satisfacer sus propiedades de crecimiento debido a diferentes enzimas presentes en su sistema como lipasas y proteasas (Shihata & Shah, 2000; Parra-Huertas, 2010).

Las BAL son microorganismos que son utilizados en la elaboración de productos alimenticios, presentes en los alimentos como microbiota natural o añadidos intencionalmente como cultivos iniciadores en productos fermentados, como leche, carne y vegetales para obtener productos como el yogurt, quesos, encurtidos, embutidos, ensilados y cerveza, entre otros. Estos microorganismos contribuyen en la biopreservación de alimentos y a su seguridad microbiológica debido a la producción de algunos metabolitos como ácido propiónico, ácido acético, ácido láctico, diacetilo, peróxido de hidrógeno, reuterina y bacteriocinas, etc.; además de mejorar las características sensoriales como sabor, olor y textura (Vázquez, Suárez, & Zapata, 2009). Las actividades metabólicas de las BAL pueden finalmente resultar en un efecto conservador debido a la inhibición de microorganismos patógenos, alterantes y/o de descomposición, así como resaltar sabores en alimentos cárnicos fermentados. Dentro de las BAL los *Lactobacillus* desempeñan un papel muy importante en la producción de embutidos fermentados como el chorizo. Los más predominantes en chorizos madurados son: *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus curvatus*, algunas otras como *Lactobacillus versmoldensis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus farciminis* y *Lactobacillus alimentarius* en conjunto con algunas especies pertenecientes a los géneros *Weissella*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* que se encuentran presentes pero en menor abundancia (Kröckel, 2013).

4.3 Análisis de las comunidades microbianas en alimentos

Durante décadas se han realizado diferentes estudios para determinar la microbiota o los microorganismos presentes en alimentos, mediante técnicas de microbiología tradicional (cultivo dependiente), aislando únicamente a los microorganismos cultivables, motivo por el cual se ha limitado el conocimiento de la diversidad total de las muestras analizadas, ya que se estima que más del 90% de los microorganismos que existen en ambientes naturales no pueden ser crecidos con los medios de cultivo actualmente disponibles. Por lo que la microbiología de alimentos ha

tenido que enfocar sus análisis en características fenotípicas, bioquímicas y moleculares (solo en microorganismos cultivables), por ejemplo, estudiar la sobrevivencia de un microorganismo patógeno o de un determinado grupo de microorganismos de descomposición, o la actividad de algún microorganismo fermentador sin visualizar en su totalidad la diversidad microbiana presente. Por lo que se tuvo la necesidad de utilizar métodos que mostraran una visión más amplia de las poblaciones microbianas presentes, tomando en cuenta que el crecimiento, la sobrevivencia y la actividad de cualquier especie, pueden estar determinados por la presencia de otras especies o por alguno de sus metabolitos producidos (Díaz Ruíz & Wachter Rodarte, 2003).

Motivo por el cual han surgido nuevos métodos y tecnologías de análisis de comunidades microbianas que no requieren de un cultivo previo (cultivo independiente) y que pueden identificar tanto a microorganismos cultivables o no cultivables (Handelsman, 2004). Diversos estudios, han utilizado este tipo de métodos, usando marcadores moleculares (gen 16S) cuya secuencia obtenida es comparada contra bases de datos para obtener información filogenética y taxonómica, revelando un número mayor de microorganismos, esto comparado con técnicas de microbiología tradicional (Vázquez-Euán, Vargas-Albores, Martínez-Córdoba, & Martínez-Porchas, 2016; Wooley, Godzik, & Friedberg, 2010).

Marcadores RNA ribosomales 5S, 23S y 16S

Para que un marcador molecular pueda ser utilizado en estudios taxonómicos o de evolución debe de cumplir con las siguientes características: (a) contener una variabilidad y divergencia genética significativa a nivel de especie, (b) poseer sitios conservados adyacentes, que permitan el diseño de iniciadores universales para su amplificación por PCR, y (c) tener una longitud adecuada que permita la extracción y secuenciación de forma fácil, reproducible y precisa (Valenzuela-González, 2015). En la década de los 80s, surgieron diversas regiones o genes como propuestas de marcadores, dentro de los cuales los RNA ribosomales 5S y 23S, y 16S que se encuentran en las subunidades 50S y 30S (respectivamente) del ácido ribonucleico ribosomal (rRNA) procarionte (Figura 2). Los genes que codifican a los RNA ribosomales se les llama 5S rRNA, 23S rRNA y 16S rRNA. De los tres genes del rRNA el gen 23S se considera como el marcador más informativo

ya que duplica el tamaño y la información contenida en el gen 16S rRNA. Sin embargo, Pace, Stahl, Lane, & Olsen, (1986), presentaron al gen 16S rRNA como una buena opción para la clasificación de bacterias, debido a que brinda la información suficiente para la clasificación taxonómica. Además de que, por cuestiones técnicas y económicas se vio facilitado el crecimiento en las bases de datos especializadas, completas y de alta calidad y fue utilizado como una herramienta importante en la reconstrucción de relaciones filogenéticas. El gen 16S es un marcador evolutivo particularmente útil para los niveles taxonómicos que va de reino a familia y hasta género, actualmente es el único ampliamente usado junto con las nuevas técnicas genómicas (Yarza et al., 2010, 2014), dando lugar al comienzo de la ecología microbiana en el año de 1990 con la amplificación y secuenciación directa del gen 16S rRNA. Este procedimiento y la adopción de herramientas moleculares revolucionó los estudios de ecología microbiana, en términos de conocimiento, función, diversidad y abundancia en procariontes (Case et al., 2007).

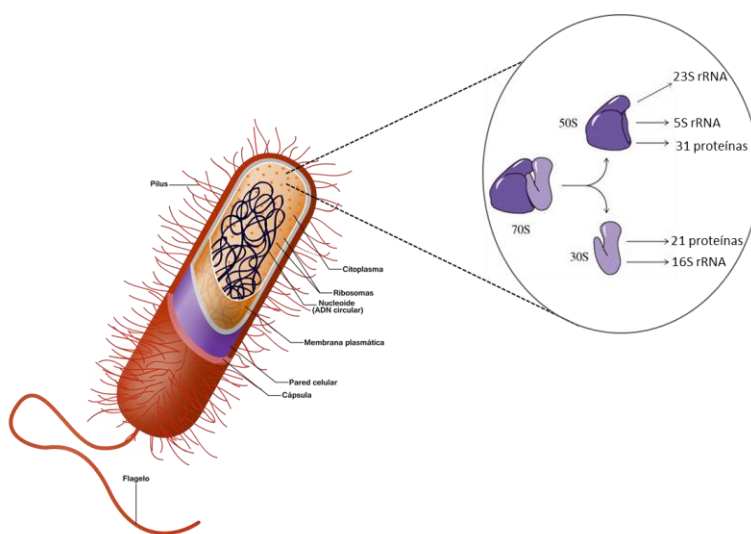


Figura 2. RNA ribosomales 5S, 16S y 23S en células procariotas.

El polirribonucleótido RNA ribosomal 16S, es un componente de la subunidad pequeña 30S de los ribosomas procariotas. Se encuentra conformado por aproximadamente 1500 pb, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S. Este marcador posee suficiente variabilidad para diferenciar no solo a los organismos más alejados, sino también los más

próximos y es posible diferenciar cepas o especies. Su tamaño relativamente largo y su estructura de doble cadena favorece el alineamiento preciso durante la comparación de secuencias. El gen 16S rRNA tiene regiones hipervariables (poco conservadas) y regiones conservadas. Existen nueve regiones hipervariables (V1 a V9), estas son diferentes entre especies y aportan la mayor cantidad de información útil para estudios filogenéticos y taxonómicos, y las regiones conservadas son aquellas que se pueden encontrar en todas las bacterias y son de gran ayuda para diseñar iniciadores universales que permitan la amplificación de las regiones hipervariables de los genes 16S rRNA de casi todos los microorganismos presentes en una comunidad (Valenzuela-González, 2015; Ortiz-Estrada, Martínez-Porchas, & Vargas-Albores, 2017). En la Figura 3, se muestran los tres RNA ribosomales y las nueve regiones del rRNA 16S y las pb aproximadas para cada una de ellas (Yu, García-González, Schanbacher, & Morrison, 2008; Yu et al., 2008).

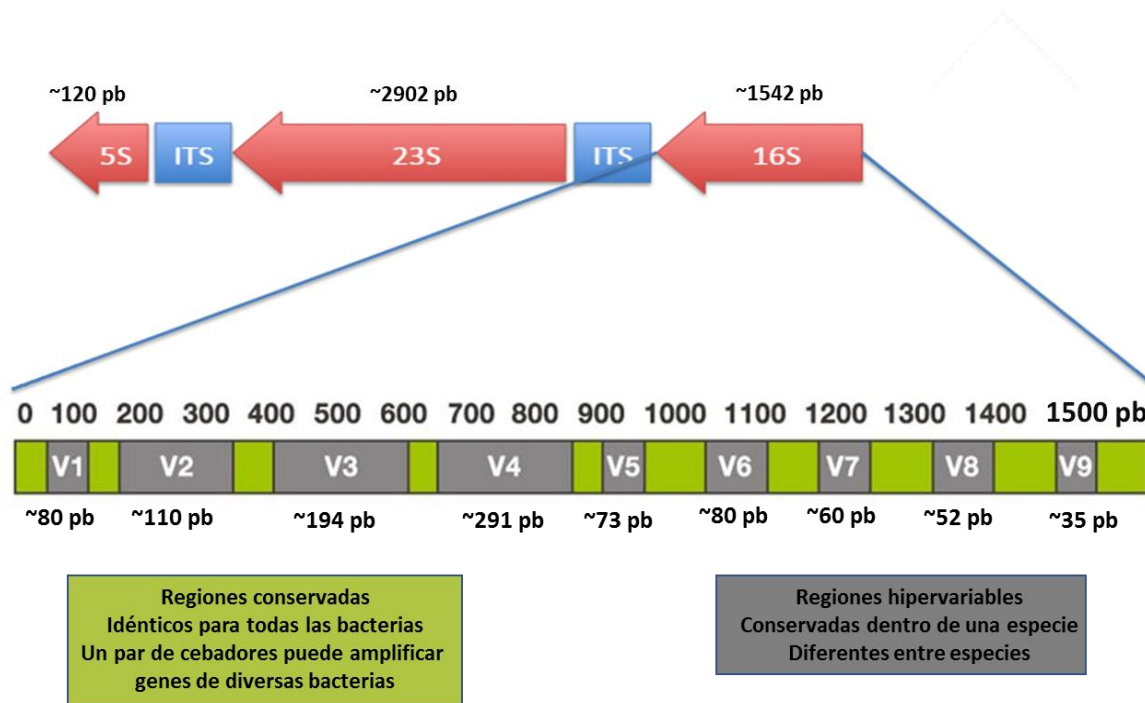


Figura 1. Gen 16S rRNA y las nueve regiones hipervariables con su número de pb que lo conforman. El número de pb puede variar según el diseño de los cebadores.

Yu & Morrison, (2004), realizaron una comparación de las diferentes regiones hipervariables del gen 16S rRNA en comunidades microbianas mediante PCR-DGGE. Amplificaron regiones aisladas y combinaciones de dos o tres regiones de diferentes alícuotas de ADN provenientes de la misma muestra, las regiones analizadas fueron: V1 (80 pb), V1-V3 (489 pb), V3 (194 pb), V4-V5 (412 pb), V3-V5 (586 pb), V6-V8 (450 pb) y V8 (352 pb). Las regiones V1, V1-V3, V4-V5 y V8, mostraron un menor perfil de bandeo en el análisis de DGGE. Los resultados obtenidos con la región aisladas V1 y V8 fueron inferiores al mostrado con los cebadores específicos para la región V3, lo cual atribuyen a la limitada longitud de las regiones. Con las regiones V3, V3-V5 y V6-V8 se visualizó un mayor número de bandas en los geles de poliacrilamida. Yu y Morrison, recomiendan utilizar la región V3 para el análisis de comunidades bacterianas mediante PCR-DGGE, y como alternativa, amplificar con las regiones V3-V5 o V6-8. Cabe mencionar que las condiciones de corrida de los geles (temperatura, concentración, e inicio y termino de los cebadores utilizados para la misma región) interfieren de manera importante en los perfiles de bandeo obtenidos y cabe resaltar que actualmente los secuenciadores de ADN producen más de 500 pb de secuencia inequívoca lo que abarca al menos dos regiones hipervariables del gen 16SrRNA (Yu & Morrison, 2004; Yu et al., 2008).

Por otra parte, la región V3-V4 del gen 16S rRNA amplificada con los cebadores SD-Bact-0341-bS-17 y SD-Bact-0785-a-A-21 con un tamaño de producto de ~464 pb es uno de los marcadores bacterianos más usados en los estudios de diversidad microbiana utilizando secuenciación de segunda generación, estos cebadores tienen una cobertura más alta en bacterias (91.2%) ya que se detecta una cantidad mayor de phyla en comparación con otros cebadores, según lo reportado por (Klindworth et al., 2013).

Desarrollo de técnicas para el análisis de comunidades bacterianas.

Algunas técnicas desarrolladas para el análisis de comunidades bacterianas son: la Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE por sus siglas en inglés) y la Electroforesis en Gel

con Gradiente de Temperatura (TGGE por sus siglas en inglés), las cuales permiten el análisis simultáneo de microorganismos de diferentes muestras (Díez, Pedrós-Alió, Marsh, & Massana, 2001; Ercolini, 2004), entre otras que han incorporado sistemas de secuenciación automatizado para la detección de fragmentos de ADN marcadas con fluoróforos, por ejemplo, el Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción Terminal (T-RFLP por sus siglas en inglés) y la Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD por sus siglas en inglés) (Fontana et al., 2005; Iacumin et al., 2006; Cocolin et al., 2007; Fonseca et al., 2013).

Estas técnicas se basan en la detección de fragmentos de ADN de alguna región conservada del gen 16S rRNA, mediante la visualización de la huella genética para caracterizar bacterias aisladas o comunidades bacterianas.

La huella genética proporciona un patrón o un perfil de la diversidad basado en la separación física de secuencias únicas de ácidos nucleicos a partir de una región específica.

Es importante mencionar que todas las técnicas de este tipo son altamente reproducibles, sin embargo, presentan una baja cobertura y resolución taxonómica, ya que se pueden obtener fragmentos del mismo tamaño que pueden identificarse en grupos filogenéticos distintos (Osborn, Moore, & Timmis, 2000).

PCR-DGGE

La PCR acoplada a la DGGE es una técnica molecular diseñada por Fischer & Lerman en 1983, utilizada en el estudio de la dinámica poblacional en productos alimenticios (Hu, Zhou, Xu, Li, & Han, 2009; Cocolin, Dolci, & Rantsiou, 2011), técnica que a la fecha se sigue utilizando para obtener una visualización general de los microorganismos presentes en alimentos. La DGGE, es un tipo de electroforesis que permite la separación física de secuencias de ADN del mismo tamaño amplificadas por la PCR, pero con diferente secuencia de nucleótidos, utilizando un gradiente lineal creciente de agentes químicos desnaturizantes del ADN (mezcla de urea y formamida) que se incorpora en un gel de poliacrilamida (Muyzer, de Waal, & Uitterlinden, 1993; Ercolini, 2004) los cuales separan las secuencias que difieran en al menos una base nitrogenada (Cocolin et al., 2001). En general, los fragmentos de ADN amplificados deben tener un tamaño

entre 200 y 500 pb aproximadamente, ya que generar secuencias de mayor tamaño pueden llevar a la formación de moléculas heteroduplex (moléculas híbridas) o a la amplificación de otras regiones del genoma, los cuales generarían una banda errónea en la DGGE (Ercolini, 2004).

Durante el proceso de electroforesis las dobles cadenas de ADN se desplazarán por el gel hasta encontrar la concentración de urea y formamida necesaria para romper el mayor número de enlaces posible provocando un cambio conformacional de la doble cadena a cadena sencilla, el paso del ADN a través del gel se ve disminuido hasta que finalmente se detiene, visualizando la distancia recorrida mediante la aparición de bandas teñidas con tinción de plata. Aquellas secuencias con un mayor contenido de guaninas y citosinas requieren una mayor concentración de los agentes desnaturizantes debido a que se encuentran unidas por tres enlaces de hidrógeno. Las variaciones particulares de cada secuencia determinarán diferentes patrones de migración en el gel (Figura 4) (Fischer & Lerman, 1983; Temmerman, Huys, & Swings, 2004). Para evitar la completa desnaturalización de la doble hebra de ADN, se incorpora una secuencia conocida como grapa o clamp compuesta de 30 a 40 G y C en alguno de los extremos de uno de los cebadores (Myers, Fischer, Lerman, & Maniatis, 1985).

Una de las ventajas de esta técnica es que el ADN contenido en cada una de las bandas de los perfiles del DGGE puede ser recuperado para posteriormente ser reamplificado e identificado mediante la secuenciación y análisis de la región amplificada del gen 16S rRNA. Así mismo, se considera una técnica útil para monitorear la dinámica de las poblaciones bacterianas a través del tiempo (Aldudo, Bullido, & Valdivieso, 1999).

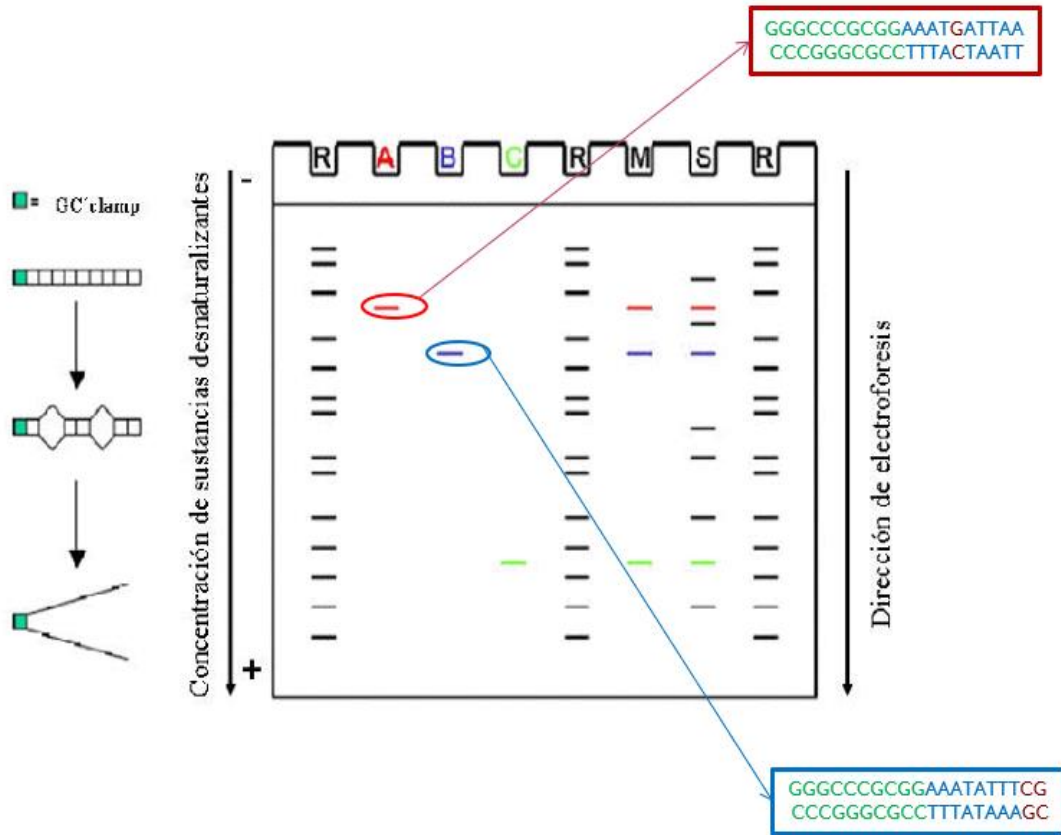


Figura 4. Representación de la técnica de la DGGE, basada en la separación electroforética de los productos de PCR en gel de poliacrilamida, conteniendo un gradiente químico desnaturalizante de urea y formamida.

Cabe señalar que la técnica de DGGE tiene sus propios sesgos y complicaciones, tales como la microheterogeneidad del gen 16S dentro de un genoma, en donde el ADN extraído de bandas con diferente secuencia y nivel de migración pueden representar a un mismo microorganismo, de manera que al interpretar los perfiles del DGGE puede sobreestimarse la diversidad (Nübel et al., 1996; Case et al., 2007; Escobar-Zepeda, 2016); también es posible que ocurra la co-migración de fragmentos de ADN, es decir, que dos secuencias diferentes de ADN compartan una misma posición en el gel, esto puede provocar la subestimación de la diversidad (Nübel et al., 1996; Nikolausz, Sipos, Révész, Székely, & Márialigeti, 2005; Case et al., 2007).

Tecnologías de secuenciación masiva

El desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación o también conocidas como de primera generación, surgió a principios de la década de los 90' s, basadas en el método desarrollado por Sanger y sus colaboradores (Sanger & Coulson, 1975; Sanger, 1988), y aplicados en 1977 donde se publica el primer genoma totalmente secuenciado de un microorganismo (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977). El método conocido como secuenciación de Sanger dideoxi, se basa en el uso de la ADN polimerasa para sintetizar cadenas de ADN utilizando deoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y dideoxinucleótidos (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP) marcados radiactivamente con P³² (fósforo 32). Se llevan a cabo cuatro mezclas independientes de los dNTPs con cada uno de los ddNTPs. Al sintetizar la hebra complementaria, la ADN polimerasa va añadiendo los dNTPs, hasta que de forma aleatoria incorpora al extremo 3' el ddNTP y se interrumpe la síntesis, obteniendo productos de extensión de diferentes longitudes que terminan con un residuo específico. Finalmente, los fragmentos se separan mediante electroforesis en un gel de acrilamida de cuatro carriles distintos y se toma una radiografía para detectar el marcaje y determinar la secuencia de la hebra molde.

Con el fin de mejorar el método de Sanger, se reemplazó el isótopo radioactivo por un fluoróforo, lo que contribuyó al desarrollo de técnicas automatizadas. Smith et al., (1986), reportaron el uso de la primera máquina automatizada, basada en la detección de fluoróforos, utilizando un detector óptico para determinar la absorción (Huang, Quesada, & Mathies, 1992), la cual podía detectar hasta 200 pb de la secuencia en un capilar.

Una de las desventajas principales de esta técnica fue su falta de practicidad por lo que se tuvo la necesidad de una metodología más rápida, fácil, económica, de alto rendimiento y altamente confiable para analizar moléculas más largas, lo que impulsó el desarrollo de las tecnologías de secuenciación denominadas como Secuenciación de la Siguiete Generación (NGS, por sus siglas en inglés) o segunda generación (Kergourlay et al., 2015).

La primera plataforma comercial de segunda generación fue desarrollada por la compañía 454 en el año 2005, y se conoce como 454 o pirosecuenciación (Glenn, 2011; Escobar-Zepeda, 2016). A

diferencia de la secuenciación de Sanger, 454 es un método enzimático que permite determinar la secuencia de una molécula de ADN, mediante una señal luminosa generada por una reacción de quimioluminiscencia. Se llevan a cabo cuatro pasos principales: (1) el cebador hibrida con la hebra molde en presencia de cuatro enzimas (ADN polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y enzima apirasa, de los sustratos APS y de la luciferina, (2) se añade uno de los cuatro deoxirribonucleótidos trifosfato (dGTP, dCTP, dTTP y dATP-S). Si este se incorpora a la cadena de ADN se produce una molécula de PP_i (por cada deoxirribonucleótido incorporado se produce un PP_i), (3) la ATP sulfurilasa convierte el PP_i en ATP, el cual provoca la conversión de la luciferina en oxiluciferina mediante la enzima luciferasa, lo que genera una cantidad de luz proporcional a la cantidad de ATP consumido. La luz es captada por un fotodetector generando un pico en un pirograma y la altura de este es proporcional al número de nucleótidos que se han incorporado, (4) Finalmente, la enzima apirasa es encargada de degradar los deoxirribonucleótidos trifosfato no incorporados y el ATP producido en exceso (Ansorge, 2009).

En el 2005, Solexa desarrolló la segunda plataforma comercial, posteriormente adquirida por Illumina. En esta tecnología los fragmentos a secuenciar son preparados con adaptadores en los extremos, para permitir que sus cadenas desnaturalizadas puedan unirse a un soporte sólido, en la cual se lleva a cabo la síntesis de la cadena complementaria mediante una PCR tipo puente, generando *clusters* de cadenas del mismo fragmento con el fin de amplificar la señal generada por los nucleótidos modificados unidos a un fluoróforo incorporado a la cadena complementaria y detectar la señal fluorescente mediante una cámara (Anexo 3) (Huang et al., 1992; Glenn, 2011).

Applied Biosystems desarrolló la tercera plataforma comercial NGS, conocida como Solid (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection). Se basa en un único proceso de secuenciación catalizada por una ADN ligasa que sella la unión entre la hebra alargada y los oligonucleótidos complementarios recién incorporados (Huang et al., 1992; Glenn, 2011).

Ion Torrent es otra tecnología de secuenciación en donde se realiza la amplificación del fragmento de ADN por la PCR. Se basa en la detección de los iones hidrógeno (H^+) que se generan cuando un nucleótido es incorporado por la polimerasa a la cadena creciente de ADN. La incorporación de cada uno de los nucleótidos a la cadena provoca la liberación de un protón único para cada uno de ellos, este protón produce un cambio en el pH de la solución (0.02 unidades de pH por base incorporada), cambio que es detectado por un sensor en cada reacción de secuenciación (Rothberg et al., 2011).

Por otra parte, existen tecnologías o plataformas que realizan la secuenciación directa de las moléculas de ADN, sin amplificar una región específica, a las cuales se les conoce como tecnologías de tercera generación. Algunas de estas tecnologías se muestran en la Tabla 1. La característica principal de las plataformas de segunda y tercera generación es su capacidad de analizar simultáneamente una gran cantidad de moléculas de ADN, conocida como secuenciación masiva, y generar millones de secuencias de una comunidad microbiana (Rodríguez-Santiago & Armengol, 2012).

Tabla 1. Plataformas de secuenciación del ADN de 2^{da} y 3^{era} generación (Modificada de Glenn, 2011).

Plataforma	Compañía actual	Compañía fundadora	Método de secuenciación	Método de amplificación	Bases/Lectura*
SEGUNDA GENERACIÓN					
454	Roche	454	Síntesis (pirosecuenciación)	PCR	400-700
Illumina	Illumina	Solexa	Síntesis	PCR puente	300
Solid	Life Technologies	Applied Biosystems	Ligación	PCR	120
Ion Torrent	Life Technologies	Ion Torrent	Síntesis (detección de H^+)	PCR	100
TERCERA GENERACIÓN					
HeliScope	Helicos	-----	Síntesis	Ninguno	35
PacBio	Pacific Biosciences	-----	Síntesis	Ninguno	860-1100
Starlight	Life Technologies	-----	Síntesis	Ninguno	>1000

*Longitud promedio de bases leídas por cada lectura (alta calidad).

Actualmente la tecnología de Illumina es una de las más utilizadas en el análisis de secuenciación masiva debido a su fácil manejo, bajo costo, rendimiento, baja tasa de error y amplia gama de aplicaciones en secuenciación de ADN y ARN (Mardis, 2008).

Una ventaja de esta tecnología sobre las anteriormente mencionadas es la formación de *clusters* sobre un soporte sólido, lo que hace posible la secuenciación desde ambos extremos de la cadena molde, permitiendo la obtención de lecturas pareadas (Escobar-Zepeda, Sanchez-Flores, & Quirasco Baruch, 2016).

Con este tipo de tecnología se han realizado diversos análisis de secuenciación masiva en áreas como: biología molecular, genómica aplicada, oncología, microbiomas, desarrollo de medicamentos, análisis de alimentos, entre otros.

La secuenciación masiva permite identificar organismos cultivables y no cultivables mediante el análisis de todos los genomas presentes en un determinado ambiente a partir del ADN genómico total de una muestra y su posterior análisis bioinformático (Wooley et al., 2010; Gilbert & Dupont, 2011). Con este tipo de análisis se logra obtener un conocimiento más amplio de la diversidad microbiana y su potencial metabólico (Vázquez-Euán et al., 2016) respondiendo a las preguntas: ¿Qué microorganismos se encuentran presentes en cada ecosistema? y ¿Qué están haciendo?

4.4 Análisis bioinformático de datos

El análisis bioinformático consiste en el ordenamiento de los resultados generados por las nuevas plataformas de NGS, de tal manera que se le pueda dar un significado biológico a los datos.

Cada plataforma cuenta con un formato de salida de datos diferente, sin embargo, existe la forma de convertirlos a formato fastq que es un tipo de texto plano que contiene información de cada una de las secuencias y que permite la extracción y análisis de los datos obtenidos. Para analizar grandes cantidades de datos, es necesario utilizar equipos computacionales de alto rendimiento.

Las secuencias sin procesar requieren de algunos pasos esenciales para llevar a cabo su traducción. Algunos de ellos son: de limpieza (quitar adaptadores y secuencias contaminantes) y de análisis de calidad. Este último se lleva a cabo eliminando las lecturas de mala calidad y las lecturas duplicadas mediante filtrados. Sin embargo, llevar a cabo un filtrado demasiado estricto podría llevar a la pérdida de información de secuencias de baja cobertura (Liu et al., 2012; Escobar-Zepeda, 2016). A partir de las lecturas que se obtienen de la secuenciación del ADN genómico, es posible la extracción de información taxonómica mediante el análisis de genes que funcionan como marcadores filogenéticos, y de datos que muestran el potencial metabólico.

Obtención de la información taxonómica y estudio de la biodiversidad

Existen dos formas de analizar las secuencias obtenidas de la amplificación del gen 16S rRNA, una por la composición taxonómica y la otra basada en la homología o similitud.

Los métodos establecidos en la composición taxonómica se basan en las características observables sobre las secuencias, como el contenido de GC y no en la predicción por los marcadores filogenéticos.

En los métodos basados en la homología o similitud, las secuencias son comparadas con bases de datos previamente construidas, mediante un alineamiento con una herramienta conocida como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), la cual se utiliza habitualmente para comparar una secuencia dada contra toda una base de millones de secuencias. Una vez identificadas y separadas las secuencias de interés en el metagenoma, se agrupan en unidades taxonómicas operacionales (OTUs). Y la taxonomía se asigna a cada grupo tomando en cuenta la similitud entre secuencias nucleotídicas, utilizando un valor mínimo del 97%.

Existen diferentes bases de datos para llevar a cabo la comparación de los marcos de lectura, algunas públicas de acceso libre, como el Gen Bank NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), y algunas privadas, como MicroSeq de Applied Biosystems, entre otras. Estas bases permiten la comparación de secuencias en línea, y ofrecen muchos otros análisis, como la elaboración de árboles filogenéticos y dendogramas.

Un dendograma es una representación esquemática en forma de gráfico (árbol) que resume el proceso de agrupación de un conjunto de datos moleculares ya sea de ADN, ARN o proteínas. En donde los datos moleculares o secuencias similares se conectan mediante enlaces cuya posición en un diagrama está determinada por el nivel de similitud/disimilitud entre las secuencias.

Existen dos formas de obtener este tipo de diagramas, aquellas basadas en matrices de distancia y los establecidas en datos de caracteres discretos (características por las cuales es posible clasificar a los individuos de una población). Uno de los métodos más utilizados basado en matrices de distancia es el de Neighbor-Joining (NJ), el cual crea una matriz de distancia al contar las diferencias de nucleótidos que existen entre todas las secuencias. Finalmente, se genera un dendograma al unir las secuencias que posean la menor cantidad de diferencias o la menor distancia genética (Michu, 2007).

Un dendograma contiene varios componentes como se muestra en la Figura 5. En la parte derecha de la figura se observan los nodos terminales o puntas, que representan los OTUs o taxones, estos pueden ser individuos de una especie o grupos taxonómicos mayores. Cada uno de estos nodos terminales se encuentran unidos mediante ramas a un nodo interno, el cual representa al ancestro común entre los nodos terminales. De tal manera que los nodos terminales representan el presente, mientras que los nodos internos representan el pasado. Referente a los taxones A y B, se les denomina taxones hermanos, ya que comparten un ancestro común y tienen una similitud mayor y que no lo comparten con otro. Al taxón E, se le denomina “grupo externo”, el cual es el taxón más lejanamente emparentado y menos parecido o similar al resto de los taxones y sirve para enraizar el árbol, es decir, donde se encuentra la primera ramificación (Mendoza-Revilla, 2012).

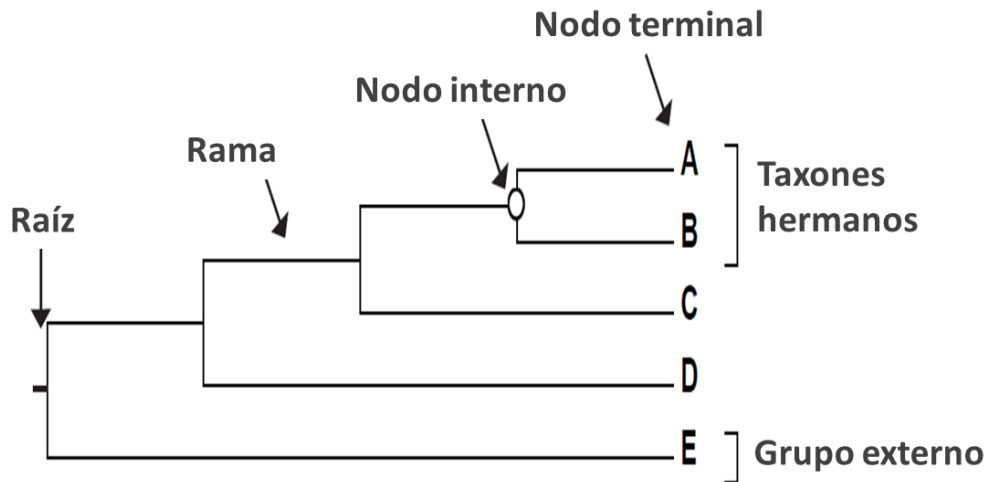


Figura 5. Anatomía de un dendograma (Imagen tomada de Mendoza-Revilla, 2012).

4.5 Medición de la diversidad.

La diversidad se puede detectar a escala molecular estudiando directamente los cambios en la estructura del ADN, o indirectamente en las proteínas codificadas por genes específicos. El estudio de la biodiversidad se refiere a la variabilidad que existe entre los organismos vivientes de cualquier fuente (terrestres, marinos, ecosistemas acuáticos, etc.), ayudando a determinar la diversidad entre las especies, dentro de las especies y como ecosistemas. Los estudios sobre la medición de biodiversidad se han centrado en la búsqueda de parámetros para caracterizarla como la propiedad emergente de las comunidades. Dado que las comunidades no están aisladas, se necesita estudiar diferentes componentes como: alfa, beta y gamma que son de gran utilidad para medir y monitorear los cambios en las comunidades (Moreno, 2001; Merle Farinos & Ferriol Molina, 2008).

La diversidad alfa, se utiliza para monitorear la riqueza de especies y el efecto de los cambios en el ambiente en una comunidad en particular, la diversidad beta es la tasa de cambio o reemplazo en la composición de especies (biodiversidad) entre distintas comunidades, pero adyacentes, descrito como la diferencia de especies en dos puntos, dos comunidades o dos paisajes, y la diversidad gamma, es la riqueza de especies de un conjunto de comunidades que integran un

paisaje la cual se obtiene de las diversidades alfa y beta como se muestra en la Figura 6 (Moreno, 2001; Merle Farinos & Ferriol Molina, 2008; Sonco-Suri, 2013).

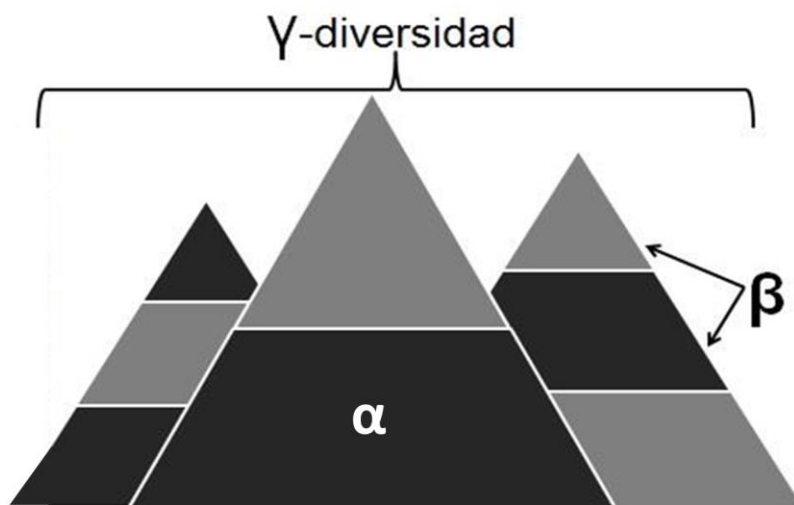


Figura 6. Representación gráfica de alfa, beta y gamma diversidad.

La gran mayoría de los métodos propuestos para evaluar la diversidad de especies se refieren a la diversidad dentro de las comunidades (diversidad alfa). La clasificación para medir la diversidad alfa (Figura 7), se basa en dos métodos: el primero se fundamenta en la cuantificación del número de especies presentes (riqueza específica) y el segundo en la estructura de la comunidad, mediante la distribución proporcional del valor de importancia de cada especie (abundancia relativa de los individuos, su biomasa, cobertura, etc.) (Moreno, 2001; Rodríguez-Vicente, 2017).

Medir la abundancia relativa de cada especie permite identificar aquellas especies que se encuentran presentes en menor proporción (especies poco frecuentes o raras) y que por lo tanto son más sensibles a los cambios ambientales.

Para calcular el número de especies, la diversidad y riqueza existen diversos análisis estadísticos como las curvas de rarefacción, el índice de equidad de Shannon-Wiener y el índice no

paramétrico de Chao, que aportan un resumen a partir de mucha información y dan un solo valor que permite hacer comparaciones rápidas entre la diversidad de distintos hábitats o la diversidad de un mismo hábitat a través del tiempo (Lou & González-Oreja, 2012).

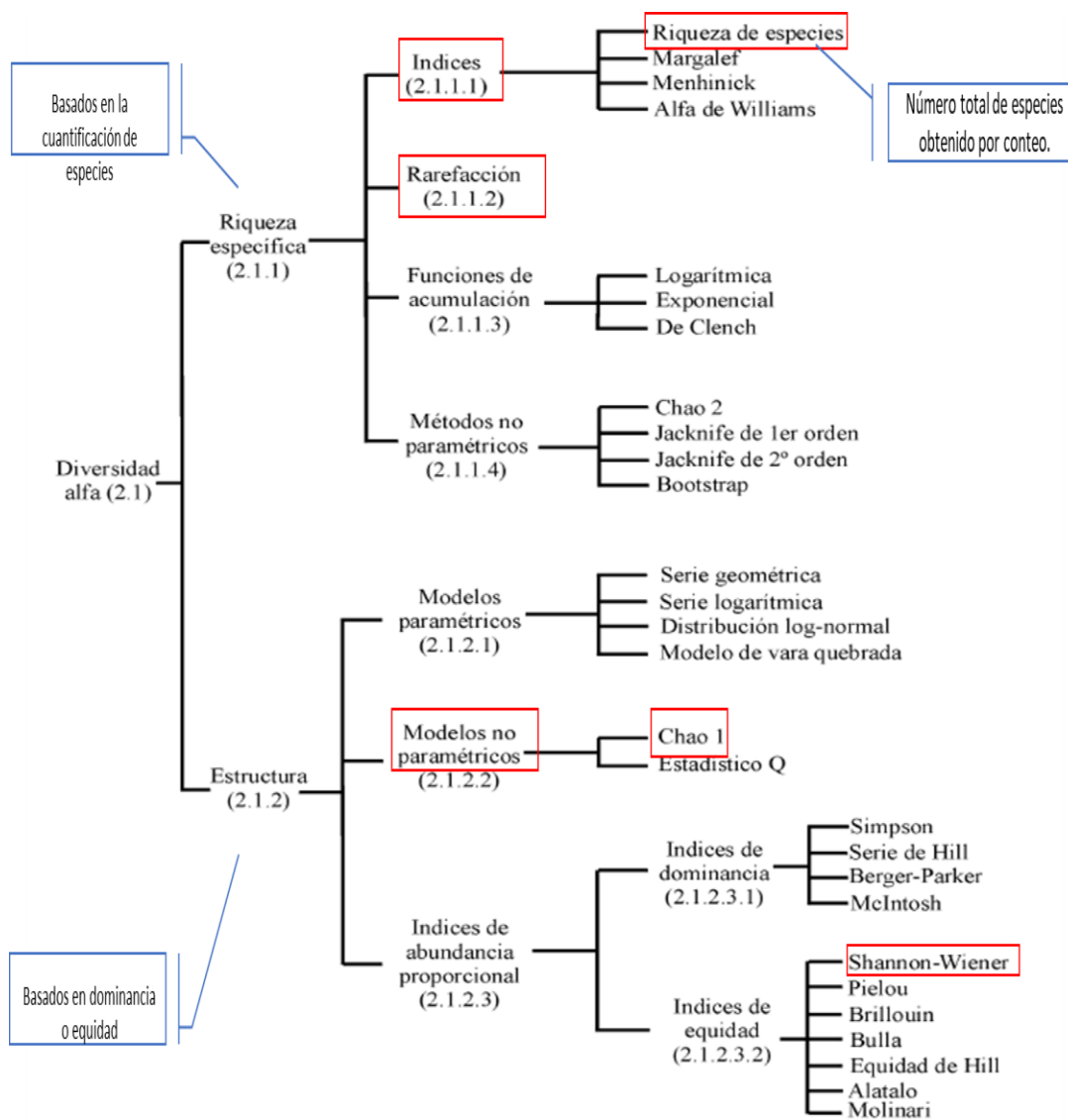


Figura 7. Clasificación de los métodos para medir la diversidad alfa (se remarcan los modelos utilizados en el análisis del chorizo tipo español).

Índices de diversidad

Dentro de los diferentes índices, el índice de diversidad o riqueza específica es el más sencillo para estimar la biodiversidad, ya que se basa únicamente en el número de especies presentes sin tomar el valor de importancia de estas. La mejor manera de medir la riqueza específica es mediante un inventario y realizando un censo de la comunidad. Más adelante, se describen los índices más comunes para medir la riqueza de especies.

Rarefacción

Permite hacer comparaciones de números de especies entre comunidades cuando el tamaño de la muestra no es igual. Calcula el número esperado de especies de cada muestra si todas las muestras fueran consideradas de un tamaño estándar.

$$E(S) = \sum 1 - \frac{(N - N_i)/n}{N/n}$$

Donde:

E(S) = número esperado de especies

N = número total de individuos en la muestra

N_i = número de individuos de la iésima especie

n = tamaño estandarizado de la muestra

En este método se lleva a cabo extrapolación en dónde el límite máximo es determinado por la muestra más grande (González-Oreja, De la Fuente-Díaz-Ordaz, Hernández-Satín, Buzo-Franco, & Bonache-Regidor, 2010).

Modelos no-paramétricos

Son un conjunto de estimadores no-paramétricos en el sentido estadístico, ya que no asumen el tipo de distribución del conjunto de datos y no los ajustan a un modelo determinado. Requieren solamente datos de presencia-ausencia (Moreno, 2001; Rodríguez-Vicente, 2017).

Índice de Chao 1

Es un estimador del número de especies en una comunidad, basado en el número de especies raras en la muestra. Se calcula con la siguiente fórmula:

$$Chao\ 1 = S + \frac{a^2}{2b}$$

Donde:

S = número de especies en la muestra

a = número de especies representadas únicamente por un único individuo

b = número de especies representadas por únicamente dos individuos

Índices de equitatividad

Algunos de los índices más reconocidos sobre la diversidad se basan principalmente en el concepto de equidad.

Índice de Shannon-Wiener:

Expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra, combinando los componentes de variedad y uniformidad. Y mide el contenido de información por individuo en muestras obtenidas al azar provenientes de una comunidad de la que se conoce el número total de especies (Lou & González-Oreja, 2012).

Para el cálculo de este índice se utiliza la siguiente fórmula:

$$H' = -\sum p_i \ln p_i$$

Donde:

Pi = Abundancia relativa de la banda individual (densidad integrada)

ln = logaritmo natural

Pi = ni/N

ni = intensidad de la banda en el carril

N = suma de intensidad de las bandas de un carril

5.- JUSTIFICACIÓN

Existen diversos estudios en donde se ha logrado identificar la microbiota de una amplia variedad de muestras obtenidas de diferentes áreas o productos. Sin embargo, solo se pueden identificar a aquellos microorganismos cultivables, por lo que más del 90% de la población bacteriana en las diferentes muestras es desconocida. Por tal motivo, surgieron técnicas moleculares y tecnologías de secuenciación de alto rendimiento que han revolucionado los métodos de identificación de poblaciones bacterianas, debido a que pueden ser utilizadas para determinar la identidad de microorganismos no cultivables, así como la diversidad y dinámica bacteriana presente en muestras complejas, debido a que se extrae el material genético.

En la actualidad existen reportes sobre el análisis de la diversidad bacteriana en productos cárnicos fermentados como el salami y el chorizo, mediante microbiología tradicional y técnicas moleculares como la PCR-DGGE (Fontana et al., 2005; Rantsiou et al., 2005; Aquilanti et al., 2007; Polka et al., 2015; Fontana et al., 2016). A los microorganismos resultantes de estos estudios se les ha atribuido la responsabilidad de ser los causantes del proceso de fermentación y de producir olores, sabores y colores característicos de este tipo de productos, pero cabe recalcar que con estas técnicas no se ha llegado a conocer en su totalidad la población bacteriana presente.

Por otra parte, no existen reportes acerca de la diversidad y dinámica bacteriana del chorizo tipo español durante su proceso de maduración, así como la identificación de los géneros y especies presentes analizados mediante secuenciación masiva. Por lo que los resultados que se obtengan en este estudio darán a conocer casi en su totalidad la riqueza que existe durante dicho proceso y que posiblemente algunos otros géneros o especies no cultivables se encuentran involucradas en el proceso de maduración y en la producción de sustancias responsables del olor y sabor característicos, y con los cambios en los factores fisicoquímicos, además de ser una aportación relevante en el campo de la microbiología de alimentos.

6.- HIPÓTESIS

Los cambios fisicoquímicos influyen en la diversidad y dinámica bacteriana del chorizo tipo español, la cual podrá ser descrita casi en su totalidad en cada uno de los tiempos analizados, conjuntando los resultados obtenidos de los análisis de microbiología tradicional, PCR-DGGE y secuenciación masiva, además de lograr identificar a las cepas con mayor potencial biotecnológico como posibles responsables del proceso de maduración.

7.-OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar la diversidad y dinámica bacteriana durante el proceso de maduración del chorizo tipo español, así como su relación con los cambios en las propiedades fisicoquímicas del producto.

Objetivos Particulares

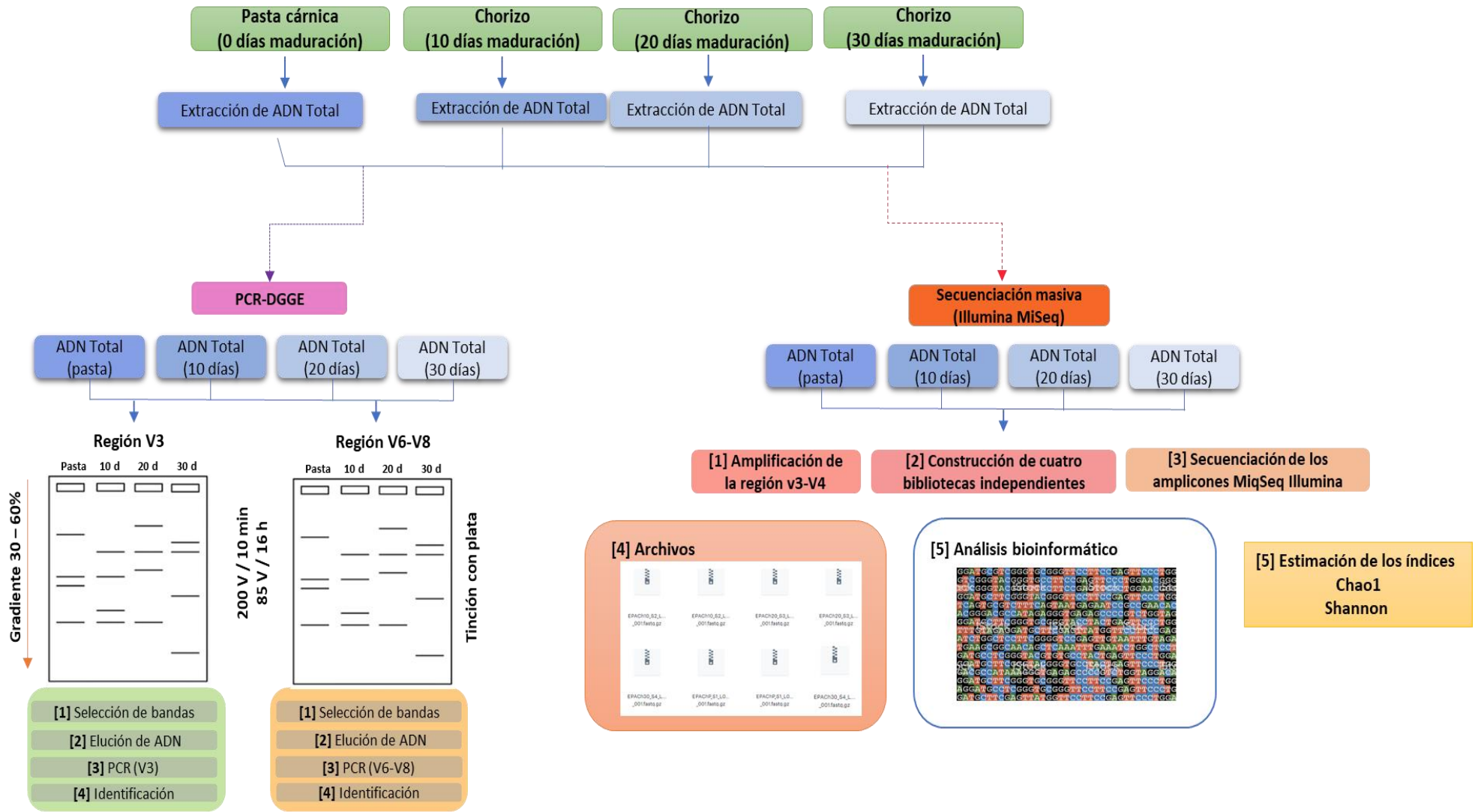
- Realizar una evaluación de los parámetros fisicoquímicos en la pasta cárnica y en el chorizo tipo español durante diferentes tiempos de maduración.
- Aislar a las enterobacterias y BAL presentes en la pasta cárnica y en el chorizo tipo español durante su proceso de maduración.
- Evaluar el potencial biotecnológico de las cepas aisladas en función de: su capacidad antagonica contra microorganismos alterantes de los productos cárnicos, su actividad lipolítica y proteolítica, y su resistencia a pH, temperatura, sales biliares y NaCl.
- Determinar la diversidad bacteriana en la pasta cárnica y en el chorizo tipo español durante su proceso de maduración utilizando PCR-DGGE y secuenciación masiva.
- Evaluar la dinámica bacteriana durante el proceso de maduración del chorizo tipo español utilizando DGGE y secuenciación masiva.

8.- DIAGRAMAS EXPERIMENTALES

Para desarrollar los objetivos planteados se siguieron las metodologías mostradas en los siguientes diagramas.



Análisis de la población microbiana



9.- METODOLOGÍA

9.1 Muestras de chorizo tipo español

Se analizaron cuatro lotes independientes de la formulación de chorizo tipo español, producidos a nivel industrial en el estado de Hidalgo, México. Las muestras consistieron en la pasta cárnica antes de embutir (tiempo cero) la cual es en una mezcla de carne de cerdo con lardo, sales de curado, especias, ajo y pimentón, y en el producto cárnico embutido con 10, 20 y 30 días de maduración, proceso que se llevó a cabo en una cámara con humedad relativa (85%) y temperatura (9-11°C) controladas. Para las determinaciones fisicoquímicas, cada lote fue analizado por triplicado. Para la evaluación de la dinámica poblacional bacteriana se llevó a cabo una mezcla del ADN total de cada uno de los tiempos analizados, provenientes de cada uno de los cuatro lotes producidos.

9.2 Análisis químico proximal

Se llevó a cabo el análisis químico proximal de la pasta cárnica y de los tres diferentes tiempos de maduración del chorizo tipo español (10, 20 y 30 días), las determinaciones se realizaron por triplicado.

Determinación del contenido de humedad

Charolas a peso constante con 5 g de muestra se colocaron en un horno a 105°C durante 24 h hasta alcanzar peso constante, posteriormente se determinó el porcentaje de humedad (%H) por diferencia de pesos, de acuerdo al método oficial 950.46 (AOAC, 1995; James, 1995).

$$\% H = 100 - \left[\frac{(\text{peso charola con muestra sin humedad} - \text{peso charola})}{\text{peso muestra}} * 100 \right]$$

Determinación del contenido de cenizas totales

El porcentaje de cenizas (%C) se determinó en 5 g de muestra colocada en crisoles a peso constante, las muestras se calcinaron en una mufla a 650°C durante 6 h, el contenido de cenizas se determinó por diferencia de pesos, utilizando la siguiente ecuación, de acuerdo al método oficial 920.153 (AOAC, 1995; James, 1995).

$$\% C = \left[\frac{(\text{peso crisol con cenizas} - \text{peso crisol})}{\text{peso muestra}} \right] * 100$$

Determinación del contenido de grasa

El porcentaje de grasa (%G) se determinó en 3 g de muestra sin humedad, cuantificando las sustancias extraíbles con éter de petróleo mediante la técnica de Soxhlet, basado en el método oficial 991.36 (AOAC, 1995; James, 1995), aplicando la siguiente ecuación.

$$\% G = \left[\frac{(\text{peso vaso con grasa} - \text{peso vaso})}{\text{peso muestra}} \right] * 100$$

Determinación de proteína

El contenido de proteína (%P) se determinó por el método de Kjeldahl en la unidad de destilación K-350 (Büchi, Suiza) de la siguiente manera. Se colocaron en tubos digestores 0.2 g de muestra (seca y desengrasada), 10 mL H₂SO₄, y como catalizadores 0.15 g de CuSO₄ y 2.5 g de K₂SO₄, las muestras se digirieron hasta alcanzar un color translucido verde claro, reduciendo el nitrógeno orgánico de la muestra hasta amoníaco, el sulfato de amonio producido se alcaliniza con 40 mL de NaOH al 36% y se destila para desprender el amoníaco que posteriormente es atrapado en 100 mL de una solución de H₃BO₃ al 4% y titulado con HCl 0.08927 N, conforme al método oficial 2001.11 (James, 1995; AOAC, 2001). El porcentaje de proteína se calculó aplicando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Nitrógeno (mg)} = N * V * 0.014$$

Donde:

N = la normalidad del ácido

V = volumen consumido

14 = peso molecular del nitrógeno

$$\% P = \left[\frac{\text{Nitrógeno (mg)}}{\text{peso muestra}} \right] * 100 * F$$

Donde:

F = factor proteínico de 6.25

9.3 Análisis fisicoquímico

Determinación de pH

El pH se determinó utilizando 10 g de muestra homogenizada con 90 mL de agua destilada (pH del agua ajustado a 7.0) en un Ultra-Turrax (IKA T18, Wilmington, NC, EUA). Posteriormente se filtró con gasa, y el filtrado se empleó para determinar el pH de la muestra, utilizando un potenciómetro HI2550 (HANNA, Woonsocket, RI, EUA).

Determinación de acidez total

La acidez total (AT) se evaluó en 5 g de muestra homogenizada (Ultra-Turrax) con 100 mL de agua destilada, posteriormente se filtró con gasa y se tituló con NaOH 0.1 N (HYCEL, CDMX, México), usando fenolftaleína como indicador (Cira, Huerta, Hall, & Shirai, 2002). Los resultados se expresan en porcentaje de ácido láctico.

Determinación de a_w

El valor de a_w se obtuvo utilizando un higrómetro 4TE (AQUA LAB, Pullman, WA, EUA) a temperatura ambiente, colocando aproximadamente 3 g del producto cárnico en el porta muestras.

Contenido de MDA

Los productos de oxidación lipídica se determinaron espectrofotométricamente mediante la técnica de sustancias reactivas con ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), donde el malonaldehído (MDA) y otros productos de oxidación reaccionaron con el ácido 2-tiobarbitúrico en condiciones ácidas para formar un pigmento rosado con una absorbancia máxima de 532 a 535 nm. Para esta determinación se homogenizaron y filtraron 5 g de muestra con 25 mL de ácido tricloroacético al 20% y se filtró con papel Whatman del No. 4. Posteriormente, se tomaron 3 mL del filtrado y se mezcló con 3 mL de ácido 2-tiobarbitúrico (80 mM; JT Baker, Valley, EUA). Se calentó a 90°C en baño María durante 30 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se midió la absorbancia máxima a 530 nm en un Lector Multimodal Synergy HT (Bio Tek Instruments, Vermont, EUA). Se realizó una curva estándar con diluciones de una solución acuosa de tetrametoxipropano (TMPO) de 0-0.14 µg/mL, estas diluciones fueron tratadas con TBA como se indicó anteriormente, los resultados se expresaron en mg MDA/kg de muestra (Rojano, Gaviria, & Sáez, 2018).

9.4 Análisis microbiológico

En esta determinación se homogenizaron 25 g de muestra en 225 mL de agua peptonada estéril 0.1% (0.1% de peptona y 0.85% de NaCl) se homogenizaron durante 1 minuto a 300 rpm dentro del Stomacher 400 Circulator (Seward, West Sussex, BN, UK) (Iacumin, Manzano, Stella, & Comi, 2017) y se prepararon diluciones decimales. Las soluciones fueron utilizadas para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC/g) en cajas de Petri con diferentes medios de cultivo:

- (i) Mesófilos Aerobios Totales (MAT) en agar estándar (BD, Bioxon, Cuautitlán Izcalli, EMX, México) (Iacumin et al., 2017).

- (ii) BAL en agar Man Rogosa and Sharpe (MRS, por sus siglas en inglés) suplementado con verde de bromocresol (VB) (Difco, Sparks, MD, EUA) en condiciones anaerobias (Najjari, Ouzari, Boudabous, & Zagorec, 2008).
- (iii) Enterobacterias en agar Eosina Azul de Metileno (EMB, por sus siglas en inglés) (BD, Heidelberg, Alemania) (Hernández-Vidal et al., 2010).
- (iv) *Staphylococcus* en agar sal manitol (BD, Heidelberg, Alemania) (Durán-Vila, Zhurbenko, & Viera-Oram., 2004).

Todas las cajas fueron incubadas de 24 a 48 h a 37°C. Los resultados se muestran en log UFC/g de muestra.

9.5 Extracción de ADN de las colonias aisladas

Doce colonias con diferentes características morfológicas a partir del agar MRS-VB y 17 colonias a partir de EMB se aislaron, se sembraron en caldo MRS y en caldo Soya Trypticaseína (TSB, por sus siglas en inglés) (DIBICO, Cuautitlán Izcalli, EMX, México), respectivamente y se incubaron durante 24 h a 37°C. Para su conservación, se mezclaron 500 µL de cultivo y 500 µL de glicerol (50%) en un vial, y se almacenaron a -70°C en un ultracongelador VIP Series MDF-U33V (Sanyo, Japón). La reactivación de las cepas se llevó a cabo colocando una alícuota del contenido del vial en un tubo con 9 mL del medio óptimo de crecimiento e incubando 24 h a 37°C.

La extracción del ADN de las colonias aisladas se realizó acorde a las indicaciones del kit de purificación de ADN Wizard® Genomic (PROMEGA, Madison, WI, EUA). La concentración del ADN se determinó utilizando una placa Take3 (Bio Tek, Winooski, VT, EUA) acoplada a el lector de placas Synergy HT, finalmente el ADN. La integridad del ADN obtenido se verificó en un gel de agarosa al 0.8% y se visualizó en el equipo Gel Doc™ XR+ Imagin System (BIO-RAD California, EUA), finalmente se almacenó a -70°C.

Amplificación del gen completo 16S rRNA e identificación de la secuencia obtenida

El ADN obtenido de las colonias aisladas se utilizó para amplificar el gen 16S rRNA utilizando los cebadores universales fD1 y RD1(Sigma-Aldrich), aplicando las condiciones mostradas en la Tabla 2, acorde al método reportado por García-Cano et al., (2014). Los amplicones fueron purificados y concentrados utilizando el kit de purificación de PCR GeneJET (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) y enviados a secuenciar a los laboratorios de Macrogen Inc. (Seoul, South Korea).

Las identidades de las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante un alineamiento utilizando BLAST en la base de datos de NCBI (National Centre for Biotechnology Information, mayo 2018).

Tabla 2. Condiciones de la PCR para amplificar el gen completo 16S rRNA.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. de Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2.0	1
Desnaturalización	95	0.5	35
Alineación	40	0.5	
Extensión	72	1.0	
Extensión final	72	5.0	1

9.6 Selección de cepas con potencial biotecnológico

Para las pruebas realizadas se prepararon cultivos al 1% (24 h a 37°C) de cada una de las BAL (caldo MRS) y de las enterobacterias (caldo TSB) aisladas de la pasta cárnica y del chorizo y tipo español con 10, 20 y 30 días de maduración, e identificadas mediante la secuenciación del gen 16S rRNA completo.

Determinación de actividad antagónica

La actividad antagónica se llevó a cabo conforme al método descrito por (Saha & Santra, 2014), con algunas modificaciones (descritas a continuación). Esta técnica se llevó a cabo en cajas de Petri con el medio de crecimiento Glucosa-Caseína (CGB, por sus siglas en inglés) (Anexo 1), inoculando de forma vertical la cepa de estudio con un hisopo estéril, las placas se incubaron 24 h a 37°C, posteriormente los microorganismos patógenos o alterantes (microorganismos prueba) cultivados previamente en caldo TSB durante 24 h, se inocularon de forma perpendicular a la cepa de estudio con un hisopo estéril, sin tocar el crecimiento vertical (Figura 8). Las cajas de Petri se incubaron 18 h a 37°C. Los microorganismos prueba que se inhibieron en su crecimiento, se consideran sensibles a la cepa de estudio. Este procedimiento se realizó con cada una de las cepas aisladas a partir de los medios MRS y EMB.

Los microorganismos de estudio probados fueron: *Lactobacillus curvatus* ATCC 8042, *Escherichia coli* DH5a, *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, *Salmonella typhimurium* ATCC 140828, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Listeria monocytogenes* CFQ-B-103.

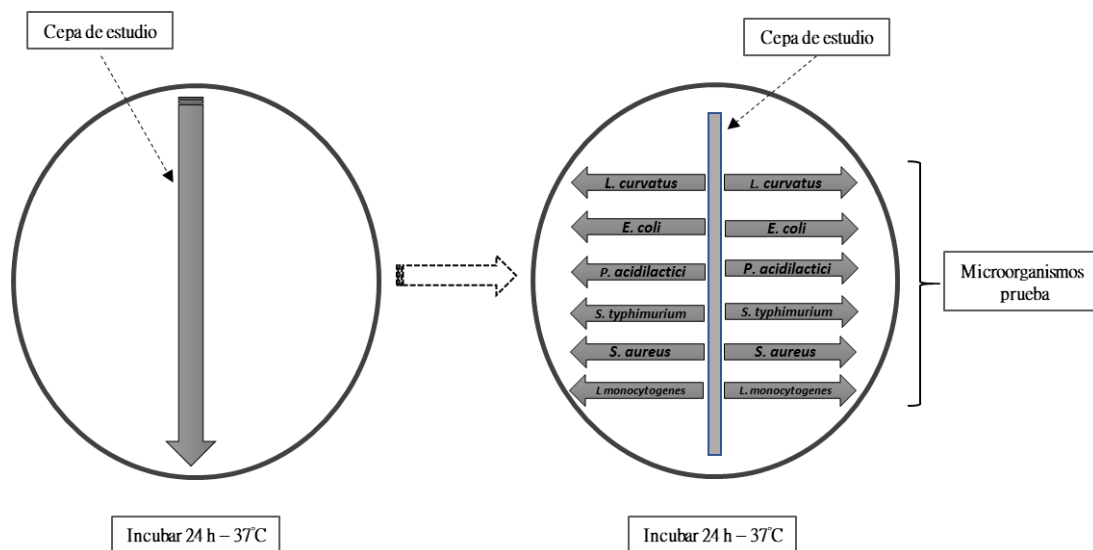


Figura 8. Técnica para evaluar la actividad antagónica.

Determinación de actividad proteolítica

La actividad proteolítica de las BAL y enterobacterias identificadas se determinó en placas con agar caseína (Anexo 1) (Molin & Ternström, 1982). Se formaron pozos con pipetas Pasteur estériles en cada una de las placas, se inocularon 50 µl de cultivo de las cepas de estudio en los pozos y las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. La reacción positiva fue indicada mediante la generación de un halo alrededor del pozo como resultado de la degradación de las proteínas.

Determinación de actividad lipolítica

Para determinar la actividad lipolítica de las cepas identificadas se utilizó una prueba cualitativa de rápida identificación en placas de Petri con agar tributirina (tributirato de glicerol) (Anexo 1). En las placas con agar tributirina se realizaron pozos con una pipeta Pasteur estéril, se inocularon 50 µL de cultivo y se incubaron durante 24 h a 37°C. La presencia de un halo opaco alrededor del pozo indicó una actividad positiva de lipasa (Janda, 2005).

Selección de cepas para determinar la resistencia a pH, NaCl, temperatura y sales biliares

A todas las cepas aisladas se les determinó la resistencia a pH y NaCl, posteriormente se seleccionaron aquellas cepas que mostraron resistencia positiva a estos dos factores y se determinó su capacidad de crecimiento ante diferentes temperaturas y presencia de sales biliares.

Resistencia a pH

La cepa de estudio fue activada al 1% en caldo MRS con una incubación de 24h a 37°C. Al final de la incubación se ajustó la densidad de la cepa a 0.8. Se prepararon siete medios de cultivo MRS y cada uno se ajustó a un valor diferente de pH (valores de pH probados: 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5.). Cada medio fue inoculado al 1% con la cepa de estudio, se tomaron 200 µL del medio (triplicado) y se colocaron en una microplaca para determinar su absorbancia a 595 nm (valor de absorbancia inicial en el medio inoculado). Se incubaron los medios durante 24 h a 37°C. Después de la incubación se determinó nuevamente la absorbancia por triplicado. Se utilizó como blanco el medio MRS sin inocular y con el mismo tratamiento térmico. Se realizó el mismo procedimiento

con cada una de las cepas analizadas y aisladas a partir de las placas con agar MRS-VB. Los resultados se muestran como negativos (-) a aquellas cepas que tuvieron una absorbancia igual a 0, positivos (+) a aquellas muestras que presentaron valores de absorbancia de 0.1 a 0.4, positivos (++) a aquellas muestras que presentaron valores de 0.41 a 0.80 y positivos (+++) a aquellas muestras con valores de absorbancia de 0.81 a 0.93.

Resistencia a NaCl

La cepa de estudio fue activada al 1% en caldo MRS con una incubación de 24h a 37°C. Al final de la incubación se ajustó la densidad de cepa a 0.8. Se prepararon cinco medios de cultivo MRS a cada uno se le agregó un porcentaje diferente de NaCl (porcentajes de NaCl probados: 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0%). Cada medio fue inoculado al 1% con la cepa de estudio, se tomaron 200 µL del medio (triplicado) y se colocaron en una microplaca para determinar su absorbancia a 595 nm (valor de absorbancia inicial en el medio inoculado). Se incubaron los medios durante 24 h a 37°C. posteriormente se determinó nuevamente la absorbancia (triplicado). Se utilizó como blanco el medio MRS sin inocular y con cada una de las diferentes concentraciones de NaCl. Se realizó el mismo procedimiento con cada una de las cepas analizadas y aisladas a partir de las placas con agar MRS-VB. Los resultados se muestran como negativos (-) a aquellos que tuvieron una absorbancia igual a 0, positivos (+) a aquellas muestras que presentaron valores de absorbancia de 0.1 a 0.4, positivos (++) a aquellas muestras que presentaron valores de 0.41 a 0.80 y positivos (+++) a aquellas muestras con valores de absorbancia de 0.81 a 0.93.

Resistencia a temperatura

Para este análisis la cepa de estudio fue activada al 1% en caldo MRS con una incubación de 24 h a 37°C. Al final de la incubación se ajustó la densidad de cepa a 0.8 (595 nm). Posteriormente cuatro matraces con caldo MRS fueron inoculados al 1% con el cultivo cuya densidad óptica fue de 0.8.

Cada uno de los matraces se sometió a tratamiento térmico (baño María) durante una hora a cuatro diferentes temperaturas (50, 60, 70 y 80°C). Seis cajas de Petri con agar MRS fueron inoculadas

con 10 µL de medio, tres al tiempo cero (antes del tratamiento térmico) y tres al final del tratamiento térmico para determinar la resistencia a temperatura mediante la determinación de las UFC, se utilizó la técnica de siembra por extensión con perlas de vidrio estériles. En algunas de las muestras se realizaron diluciones para obtener una cuenta de 30 a 300 UFC. Se realizó el mismo procedimiento para cada una de las cepas en las que se determinó actividad antagónica, lipolítica y proteolítica positivas.

Resistencia a sales biliares

Para este análisis la cepa de estudio fue activada al 1% en caldo MRS con una incubación de 24 h a 37°C. Al final de la incubación se ajustó la densidad de cepa a 0.8 (595 nm). Posteriormente, un matraz con caldo MRS suplementado con sales biliares al 3%, fue inoculado al 1% con el cultivo con densidad óptica al 0.8. Se incubó durante 1, 2, 4 y 6 h a 37°C. Durante cada uno de los tiempos mencionados se tomaron 10 µl del medio y se depositaron en una caja de Petri con medio MRS (triplicado) para determinar las UFC, mediante la técnica de siembra por extensión con perlas de vidrio estériles, incluyendo el tiempo cero (antes de incubar) para determinar la resistencia de la cepa de estudio frente a las sales biliares.

En algunas de las muestras se realizaron diluciones decimales para obtener una cuenta entre 30 y 300 UFC. Se realizó el mismo procedimiento para cada una de las cepas en las que se determinó actividad antagónica, lipolítica y proteolítica positiva.

9.7 Análisis molecular de la población bacteriana

Extracción del ADN total del producto cárnico

La extracción del ADN total se realizó acorde al método reportado por Escobar-Zepeda et al., (2016) con algunas modificaciones. En condiciones estériles se pesaron 15 g de muestra, se depositaron en una bolsa para Stomacher, se adicionaron 50 mL de un amortiguador de citrato de sodio (2%, pH 8.0) estéril, se homogenizó durante 2 min a 300 rpm en el equipo Stomacher® 400 Circulator (SEWARD, California, EUA) para llevar a cabo la ruptura mecánica del producto cárnico. Posteriormente se adicionó 1 mL de solución de Neutrasas HT Proteolytic (ENMEX,

Tlanepantla, EMX, México), se mezcló 1 min dentro del Stomacher a 300 rpm, y se agito durante 1 h a 100 rpm y 45°C en una incubadora INO 650 V9 (Prendo, Puebla, México) con el fin de romper la red proteínica, al finalizar la incubación la mezcla se dividió en dos tubos estériles tipo Falcón de 50 mL y se centrifugó a 3500 rpm durante 7 min a 4°C para separar las fracciones lipídica (superior) y proteínica (inferior) de la acuosa (intermedia) está última conteniendo las células de los microorganismos presentes en la muestra. La fase acuosa se transfirió con una micropipeta de 5 mL a un tubo estéril tipo Falcón de 50 mL y se centrifugó a 8500 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y el pellet se lavó con solución salina estéril (0.85% de NaCl p/v, pH 7.0), se centrifugó (8500 rpm durante 5 min a 4°C) y se desechó el sobrenadante. El pellet obtenido se utilizó para la extracción del ADN total acorde a las instrucciones del kit de purificación de ADN Wizard® Genomic. La integridad del ADN se visualizó en un gel de agarosa al 0.8% (85 V, 45 min). La concentración del ADN se determinó utilizando una placa Take3 acoplada al lector de placas Synergy HT, finalmente el ADN se almacenó a -70°C para su posterior análisis mediante la DGGE y secuenciación masiva.

PCR-DGGE

Para realizar el análisis del ADN total de las muestras de chorizo tipo español, se decidió amplificar la regiones V3 y V6-V8, debido a que son marcadores ampliamente utilizados para analizar comunidades bacterianas en alimentos mediante PCR-DGGE, ya que proporcionan la información suficiente para llevar a cabo la identificación confiable de los microorganismos (Cocolin et al., 2001; Ercolini, 2004; Yu & Morrison, 2004; Yu et al., 2008).

Los cebadores Clamp BAC-968F y 338G-F contienen una secuencia de aproximadamente 40 nucleótidos (G y C) en la posición 5' que mejora la detección de variaciones en las secuencias en los análisis de DGGE (Nübel et al., 1996) y previene la completa disociación de los fragmentos de ADN durante el análisis por DGGE (van Leerdam et al., 2008). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en el termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) con las condiciones mencionadas en las Tablas 3 y 4. Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 3. Condiciones de la PCR para amplificar la región V3 del gen 16S rRNA.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. de Ciclos
Desnaturalización inicial	94	3.0	1
Desnaturalización	94	0.30	30
Alineación	65	0.30	
Extensión	72	2.0	
Extensión final	72	5.0	1

Tabla 4. Condiciones de la PCR para amplificar la región V6-V8 del gen 16S rRNA.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. de Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5.0	1
Desnaturalización	94	1.0	30
Alineación	53	1.0	
Extensión	72	1.0	
Extensión final	72	5.0	1

Tabla 5. Secuencia de los cebadores utilizados en la amplificación del gen completo 16S rRNA y de las regiones V3, V6-V8 y V3-V4.

Método	Cebadores	Secuencia 5' → 3'	Gen 16S rRNA
16S rRNA	Fd1 (Foward)	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Completo
	RD1(Reverse)	CCGACCTAGTGGAGGAATTCGAACCTAGGGCCC	
DGGE	338G-F	CGCCCCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGC CCCACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Región V3
	338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	
	B518R	ATTACCGCGGCTGCTGG	Región V6-V8
	Clamp BAC-968F	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGG GGGGGAACGCGAAGAACCTTAC	
	BAC-968F	GAACGCGAAGAACCTTAC	
	BAC 1401r	CGGTGTGTACAAGACCC	
Illumina MiSeq	SD-Bact-0341-bS-17	CCTACGGGNGGCWGCAG	Región V3-V4
	Bact-0785-a-A-21	GACTACHVGGGTATCTAATCC	

La presencia de los productos de PCR fue verificada en un gel de agarosa al 1% utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb y visualizado en equipo Gel Doc™ XR+ Imagin System, finalmente los productos se concentraron hasta obtener aproximadamente 300 ng/μL en un concentrador Vacufuge plus AG 22331 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

Los productos obtenidos se sometieron a un análisis por DGGE, se empleó el equipo DCode™ Sistema Universal de mutaciones (BIORAD, California, EUA). Una alícuota de 18 μL de la muestra se mezcló con tampón de corrida (relación 1:0.5), fueron cargados en un gel de poliacrilamida (acrilamida-bisacrilamida 37.5:1) con un gradiente desnaturalizante de urea y formamida del 30 al 60%, embebido en buffer TAE 1X (Tris:acetato:EDTA) (Rantsiou, Urso, Dolci, Comi, & Cocolin, 2008; Dolci et al., 2013). En la electroforesis se llevó a cabo una precorrida de 10 min a 200 V, seguida de una corrida de 16 h a 85 V con una temperatura constante de 60°C (Hu et al., 2009). Los geles fueron teñidos con plata acorde a los métodos reportados por Sanguinetti, Dias Neto, & Simpson, 1994; Caetano-AnoIlés & Trigiano, 1996 con algunas modificaciones, y visualizados con fotodocumentador GelDoc™ XR+ Imagin System (BIO-RAD, California, EUA).

Selección y secuenciación de bandas de la DGGE

Las bandas que presentaron diferente nivel de migración fueron seleccionadas y extraídas del gel con un escarpelo estéril, la banda se colocó en tubo eppendorf estéril de 500 μL, se agregaron 50 μL de agua destilada estéril y se mantuvo a 4°C una noche para que el ADN eluyera de la banda (Cocolin et al., 2001), el ADN recuperado se reamplificó con los cebadores BAC-968F y BAC-1401r en un volumen de reacción de 25 μL, conservando las concentraciones y condiciones de la PCR descritas anteriormente. Los productos de la PCR fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega y enviados a secuenciar a los laboratorios de Macrogen.

Las secuencias parciales obtenidas del gen 16S rRNA fueron analizadas mediante un alineamiento utilizando BLAST y comparando los resultados en la base de datos de NCBI (septiembre 2018).

9.8 Diversidad de especies

Las imágenes provenientes de las DGGE con los cebadores V3 y V6-V8 fueron analizadas digitalmente con el programa Image J. Se llevó a cabo una calibración en cuanto a dimensiones (área) y densidad óptica mediante una tableta con 19 tonos de grises. Se obtuvo una curva de calibración (Anexo 2) con la cual se interpolaron los datos de área y densidad óptica (intensidad) obtenidos de cada una de las bandas para obtener los valores de densidad integrada. Se determinó la riqueza de especies (S) representado por el número total de bandas por carril, y se estimó la diversidad estructural o índice de Shannon (H), y la uniformidad o índice de Pielou (J) (Lou & González-Oreja, 2012; Rodríguez-Vicente, 2017). Para calcular los índices antes mencionados se utilizaron las siguientes fórmulas.

Índice H

$$H' = -\sum p_i \ln p_i \dots \dots (xx)$$

Donde:

Pi = Abundancia relativa de la banda individual (densidad integrada)

ln = logaritmo natural

Pi = ni/N

ni = intensidad de la banda en el carril

N = suma de intensidad de las bandas de un carril

Índice J

$$J = H / \ln S \dots \dots (X)$$

Donde:

S = número total de bandas por carril

9.9 Secuenciación masiva con Illumina

Cuatro muestras de ADN total (una por cada tiempo analizado) fueron enviadas a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología (IBt) de la UNAM en Cuernavaca, Morelos para su posterior análisis de secuenciación masiva. En esta unidad se amplificó la región V3-V4 del gen ribosomal 16S, utilizando los cebadores SD-Bact-0341-bS-17 y SD-Bact-0785-a-A-21 (Tabla 5) como adaptadores compatibles con la tecnología Illumina (Klindworth et al., 2013) obteniendo amplicones de ~550 pb. Se construyeron cuatro bibliotecas independientes a partir de cada tiempo analizado con el kit TruSeq (Illumina Inc. San Diego, CA, EUA) acorde a las instrucciones del fabricante. La secuenciación de los amplicones obtenidos se llevó a cabo en el equipo MiSeq de Illumina (Illumina Inc.), La profundidad de secuenciación fue de 1,000 000 de lecturas, 250,000 por cada muestra, con una configuración pareada de 300 ciclos.

9.10 Preparación y análisis bioinformático de secuencias

Las secuencias superpuestas se ensamblaron con sus respectivos pares utilizando el software Flash v1.2.11 (Magoč & Salzberg, 2011). Los fragmentos extendidos se utilizaron para realizar un análisis de diversidad de unidades taxonómicas operativas (OTUs) mediante el agrupamiento de secuencias con una identidad del 97% utilizando el programa CD-HIT v4.6 (Li & Godzik, 2006). Es importante mencionar que los OTUs individuales por muestra con una sola secuencia fueron descartadas del análisis. Los índices de riqueza Chao1 y de diversidad Shannon fueron estimados utilizando la librería Phyloseq para R (McMurdie & Holmes, 2013). La matriz de OTUs fue normalizada usando el método de metagenomeSeq (McMurdie & Holmes, 2014).

La anotación taxonómica de los fragmentos fue realizada utilizando el programa Metaxa2 v2.1 (Bengtsson-Palme et al., 2015). Las tablas de conteo de los diferentes niveles taxonómicos fueron integrados y transformados mediante la abundancia total relativa y se generaron gráficos de barras apiladas utilizando scripts caseros en Perl y R.

9.11 Dendograma

Se construyó un dendograma para determinar la relación filogenética que existe entre los microorganismos aislados en los medios MRS-VB y EMB, e identificados mediante la secuenciación del gen completo 16S rRNA. Se calculó con el método estadístico Neighbor-Joining e inferido por el método Bootstrap de 1000 repeticiones. La distancia de la relación fue calculada usando el método Tamura Nei. Se analizaron 24 de las diferentes secuencias parciales de los microorganismos identificados y mencionados en las Tablas 8 y 9, y se compararon con cuatro secuencias referencia obtenidas de la base de datos NCBI e identificadas como *Bacillus Cereus*, *Lactobacillus sakei*, *Pseudomonas putida* y *Weissella cibaria* con los siguientes números de acceso: NR_074540.1, NR_042443.1, NR_043424.1 y NR_036924.1 (respectivamente). El árbol se construyó utilizando el software de análisis genético molecular evolutivo MEGA-X de acceso libre.

9.12 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar estadísticamente las diferencias en el pH, la AT, a_w y el contenido de MDA entre los diferentes lotes. Se llevó a cabo un diseño experimental con dos factores fijos (tiempo y lote) con cuatro niveles. Se llevó a cabo un ANOVA de dos factores y un análisis de Tukey para determinar las diferencias significativas ($P < 0.05$) durante el proceso de maduración del chorizo tipo español

10.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 Análisis Químico Proximal

En la Tabla 6 se muestra la composición proximal de la pasta cárnica y del chorizo tipo español en sus diferentes tiempos de maduración. Se observó una gran diferencia en el contenido de los diversos componentes mayoritarios evaluados; principalmente entre la pasta cárnica (tiempo cero) y el producto final (30 días). Respecto a la humedad, se registró una disminución total del 42%, con un 23% de humedad en el producto final, por lo que se podría considerar en la categoría de embutidos secos por tener un valor inferior al 40% de contenido de agua, esta disminución se debe al proceso de deshidratación parcial al cual los productos madurados son sometidos, favoreciendo su conservación por un mayor tiempo. Por otra parte, los valores medios de los componentes en el producto terminado fueron $6.44\% \pm 0.06$ para cenizas, $28.55\% \pm 0.10$ para grasa y $24.57\% \pm 0.49$ para proteína. Ambrosiadis, Soultos, Abraham, & Bloukas en el 2004 analizaron 67 muestras de chorizos frescos y reportaron valores de $49.17\% \pm 7.05$ para humedad, 2.99 ± 0.55 para cenizas, 29.74 ± 8.02 para grasa y 17.62 ± 2.67 para proteína. Estos valores y los reportados por Cengiz & Gokoglu, (2005) son similares a los obtenidos en la pasta cárnica en este estudio.

Tabla 6. Análisis químico proximal (base húmeda) de la pasta cárnica y del chorizo tipo español a los 10, 20 y 30 días de maduración.

Tiempo de maduración (días)	Humedad (%)	Cenizas (%)	Grasa (%)	Proteína (%)
0	54.03 ± 0.43	3.34 ± 0.43	18.11 ± 1.32	17.51 ± 0.42
10	33.69 ± 2.57	5.56 ± 0.06	24.88 ± 1.71	26.08 ± 0.59
20	27.96 ± 2.01	5.70 ± 0.27	27.08 ± 1.99	26.84 ± 0.77
30	23.00 ± 1.37	6.44 ± 0.06	28.55 ± 0.10	27.88 ± 0.18

10.2 Análisis fisicoquímico

En la Figura 9 se muestran los resultados de los parámetros fisicoquímicos calculados en el producto cárnico en sus diferentes tiempos de maduración. La pasta cárnica presentó un valor de pH de 6.08 ± 0.05 el cual decreció significativamente ($P < 0.05$) durante el proceso de maduración hasta 5.54 ± 0.04 a los 30 días (Figura 9-A). El cambio en el pH se puede atribuir a un aumento significativo de la AT de $0.60\% \pm 0.016$ a $0.93\% \pm 0.012$ del día 0 al día 30 (Figura 9-B). El efecto de disminución de pH es característico en este tipo de productos como el chorizo fermentado y ha sido observado en otros estudios (Marcos, Aymerich, Dolors Guardia, & Garriga, 2007; Tabanelli et al., 2013; Chen, Kong, Han, Liu, & Xu, 2016).

El aumento en la AT se atribuye a la acumulación de los ácidos orgánicos, incluyendo ácido láctico, acético y ácido propiónico, entre otros, producidos principalmente por las BAL presentes ya que este grupo de bacterias acidificantes juega un papel importante en los procesos de fermentación. El aumento de estas sustancias puede tener un impacto directo con las características sensoriales, proporcionando un sabor ligeramente ácido y dando inicio a la producción de sustancias aromáticas a partir de aminoácidos (Kröckel, 2013), además de llegar a inhibir el desarrollo de la microbiota contaminante y patógena de alimentos cárnicos ya que algunas bacterias son poco tolerantes a la presencia de este compuesto y a valores de pH menores a 5.0 como *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Shigella*, las cuales se encuentran asociadas con el deterioro de la carne y de productos cárnicos aún conservados en refrigeración (Jay, Loessner, & Golden, 2005). En general, valores de pH > 6.0 influyen en el desarrollo de patógenos o bacterias responsables de la descomposición en carne y productos cárnicos y valores de pH < 4.5 pueden producir sabores ácidos desagradables para el consumidor (Lücke, 1994; González-Tenorio et al., 2013).

Otro factor analizado fue la a_w , la cual mostró diferencias significativas durante el proceso de maduración. La pasta cárnica presentó un valor de a_w de 0.96 ± 0.016 el cual decreció gradualmente hasta 0.84 ± 0.012 en el día 30 (Figura 9-C). Otros autores han reportado valores similares de a_w entre 0.84 a 0.87 durante el proceso de maduración (Casaburi et al., 2007; Marcos et al., 2007; Tabanelli et al., 2013).

La reducción de a_w posiblemente ocurrió por las condiciones de humedad relativa controlada en la cámara de maduración, lo que conlleva a una deshidratación constante del producto, conjugado con la disminución de la capacidad de retención de agua de la carne. El valor de pH cercano al punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares (~5.3) favorece a las interacciones entre proteína y proteína lo que promueve la pérdida de agua y la reducción de la a_w . Este efecto se presenta en productos fermentados (Gounadaki et al., 2009).

La disminución de la a_w es ideal para controlar el crecimiento de las bacterias presentes en los alimentos, ya que el desarrollo bacteriano se ve favorecido con valores de a_w mayores a 0.97 (Marcos et al., 2007; Fonseca et al., 2013). El desarrollo de Proteobacterias se puede ver afectado con valores de a_w menores a 0.97, algunos géneros son *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* y *Salmonella*, los cuales pueden provocar la descomposición o alteración en los productos cárnicos además de enfermedades en el consumidor (Kuri, Madden, & Collins, 1996; Jay et al., 2005; González-Tenorio et al., 2013).

Un proceso inadecuado de maduración en los productos cárnicos puede provocar un descenso inapropiado de pH en las primeras 24 h lo que produce, un secado insuficiente, dureza superficial inadecuada del embutido, presencia de microorganismos alterantes que afectan la seguridad microbiológica del producto, lo que puede provocar la descomposición del mismo y la producción de sabores indeseables (Gounadaki et al., 2009).

Otro factor muy importante que afecta la calidad y limita la vida útil de los productos cárnicos es la oxidación lipídica (Wenjiao et al., 2014). En este estudio se utilizó el método de TBARS, para determinar la presencia de MDA y la composición de otros compuestos derivados de la segunda etapa de la oxidación lipídica, como aldehídos y cetonas (Wójciak & Dolatowski, 2016).

La concentración determinada de MDA en la pasta cárnica fue de 0.29 ± 0.007 mg MDA/kg y alcanzó un valor máximo de 0.41 ± 0.004 mg MDA/kg a los 10 días del proceso de maduración, sin presentar diferencia significativa con los valores obtenidos a los 20 y 30 días (Figura 9-D). Al final del proceso de maduración, las muestras de chorizo tipo español mantuvieron valores por

debajo del umbral de oxidación de 0.5 a 1.0 mg MDA/kg en los cuales es posible detectar sabores desagradables en alimentos cárnicos y que no son detectados en el producto cárnico analizado (Hu et al., 2009; Wenjiao et al., 2014; Steele et al., 2016).

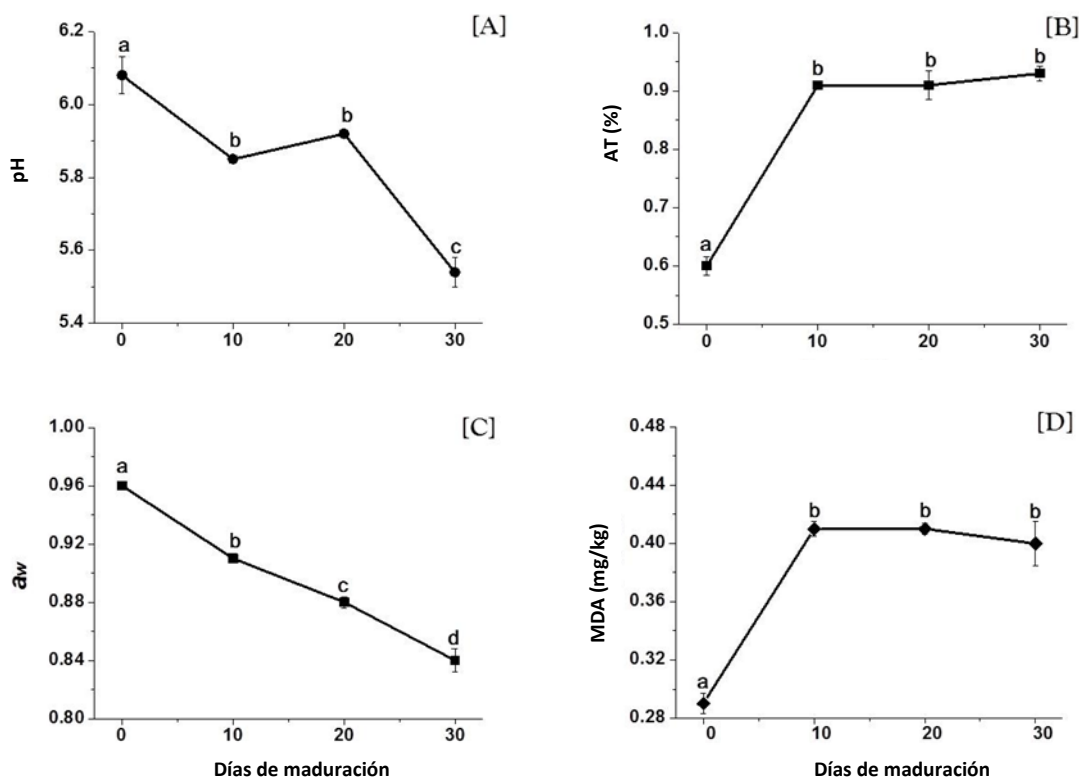


Figura 9. Resultados de los análisis fisicoquímicos (pH, a_w , AT y contenido de MDA), en la pasta cárnica (tiempo cero), y en las muestras obtenidas en los diferentes tiempos de maduración del chorizo tipo español. Las letras diferentes en cada uno de los gráficos representan diferencias significativas ($P \leq 0.5$) acorde a la prueba de Tukey para la comparación de medias.

Durante el mismo período, la cantidad de BAL se incrementó, representadas mayoritariamente por *Lactobacillus*. Chen et al., 2016, analizaron chorizos madurados (hasta 9 días) e inoculados con *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei* y *Staphylococcus xylosus*. Reportaron que los microorganismos inoculados promueven la hidrólisis de las proteínas

de la carne (sarcoplasmicas y miofibrilares) durante el proceso de fermentación, debido a las enzimas endógenas producidas por los mismos (actividad proteolítica), por lo que hay un mayor registro de aminoácidos (ácido glutámico y alanina). También mencionaron que algunas de las bacterias inoculadas tienen un alto potencial antioxidante debido a las enzimas antioxidantes que poseen (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) y algunos compuestos reductores (NADH, NADPH, glutatión, ácido úrico y polisacáridos), sustancias que pueden inhibir la formación de compuestos carbonilo. Los resultados de los chorizos inoculados fueron comparados con un chorizo control (sin inóculo iniciador), en donde se observó un alto contenido de carbonilo (sustancia que indica la oxidación de proteínas) en comparación con el bajo contenido de esta sustancia en los embutidos inoculados.

Por lo tanto, este fenómeno podría explicar por qué la concentración de MDA no continuó aumentando en el producto cárnico a pesar de no ser inoculado, pero sí con aumento en el contenido de BAL a partir de los 10 d de maduración, resultados que se obtuvieron en el análisis microbiológico y que posteriormente fueron confirmados con la secuenciación masiva, los cuales se determinaron como población dominante a partir de los 10 d.

Sin embargo, es importante mencionar que en productos cárnicos embutidos y fermentados es deseable una ligera oxidación debido a que se generan compuestos volátiles que contribuyen al desarrollo de las características propias de aroma y sabor, pero también es uno de los principales mecanismos de deterioro de la calidad si la concentración es mayor al límite anteriormente mencionado (Hu et al., 2009; Wenjiao et al., 2014; Steele et al., 2016).

10.3 Análisis microbiológico

La pasta cárnica y las muestras de chorizo tipo español a diferentes tiempos de maduración fueron sometidas a un análisis microbiológico para conocer la dinámica bacteriana durante el proceso de maduración, mediante técnicas tradicionales de microbiología. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Análisis microbiológico de la pasta cárnica y del chorizo tipo español a diferentes tiempos de maduración. Los valores por columna que muestran diferentes letras (^a, ^b o ^c) son significativamente diferentes ($P \leq 0.5$) acorde a la prueba de Tukey para la comparación de medias.

Población microbiana (log UFC/g)				
Tiempo de maduración (días)	Mesófilos totales	BAL	Enterobacterias	<i>Staphylococcus</i>
0	5.20 ± 0.22 ^a	4.38 ± 0.17 ^a	1.77 ± 0.04 ^b	3.0 ± 0.02 ^c
10	6.22 ± 0.2 ^b	6.48 ± 0.27 ^c	1.37 ± 0.01 ^a	1.94 ± 0.03 ^a
20	5.63 ± 0.49 ^{ab}	5.93 ± 0.38 ^b	1.42 ± 0.03 ^a	1.99 ± 0.04 ^a
30	5.50 ± 0.61 ^{ab}	6.31 ± 0.22 ^{bc}	1.31 ± 0.02 ^a	2.36 ± 0.05 ^b

El número de mesófilos aerobios totales se incrementó de 5.20 ± 0.22 (tiempo cero) a 5.50 ± 0.61 log UFC/g al día 30. Estos resultados son similares a los obtenidos en el estudio realizado en chorizo Galicia fermentado durante 30 días (Fonseca et al., 2013). La población de BAL se incrementó de 4.38 ± 0.17 log UFC/g (tiempo 0) a 6.48 ± 0.27 log UFC/g (10 d), lo que representa un aumento total de 2.5 órdenes de magnitud. Este valor fue estable durante el resto del proceso de maduración hasta el día 30 (6.31±0.22 log UFC/g). El número inicial de enterobacterias en la pasta cárnica fue 1.77 ± log UFC/g, decreció a 1.31 ± 0.02 log UFC/g a los 30 días sin presentar diferencias significativas durante el proceso de maduración. Estos microorganismos son asociados al deterioro de la carne y pueden estar relacionados con enfermedades transmitidas por alimentos (Gounadaki et al., 2009). La disminución del pH en combinación con el incremento de las BAL puede ayudar a inhibir el desarrollo de los microorganismos que alteran la carne como las enterobacterias ya que algunas no toleran la presencia de ácidos orgánicos y valores de pH inferiores a 5.0, como *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Shigella*. Finalmente, el recuento de *Staphylococcus sp.* decreció de un valor de 3.0 ± 0.02 log UFC/g presentes en la pasta cárnica a 2.36 ± 0.05 log UFC/g presente a los 30 días de maduración, estos valores se encuentran dentro de los límites indicados en la NOM-145-SSA1-1995 para productos cárnicos madurados en México.

Por otra parte, se aislaron 12 colonias crecidas en placas con agar MRS-VB que presentaron diferencias morfológicas, al ser inoculadas y crecidas en el agar mencionado, se presentó un vire en el medio, de color verde a amarillo, esto por el aumento de acidez en el medio. Las colonias mostraron diferentes características fenotípicas como se aprecia en la Figura 10.

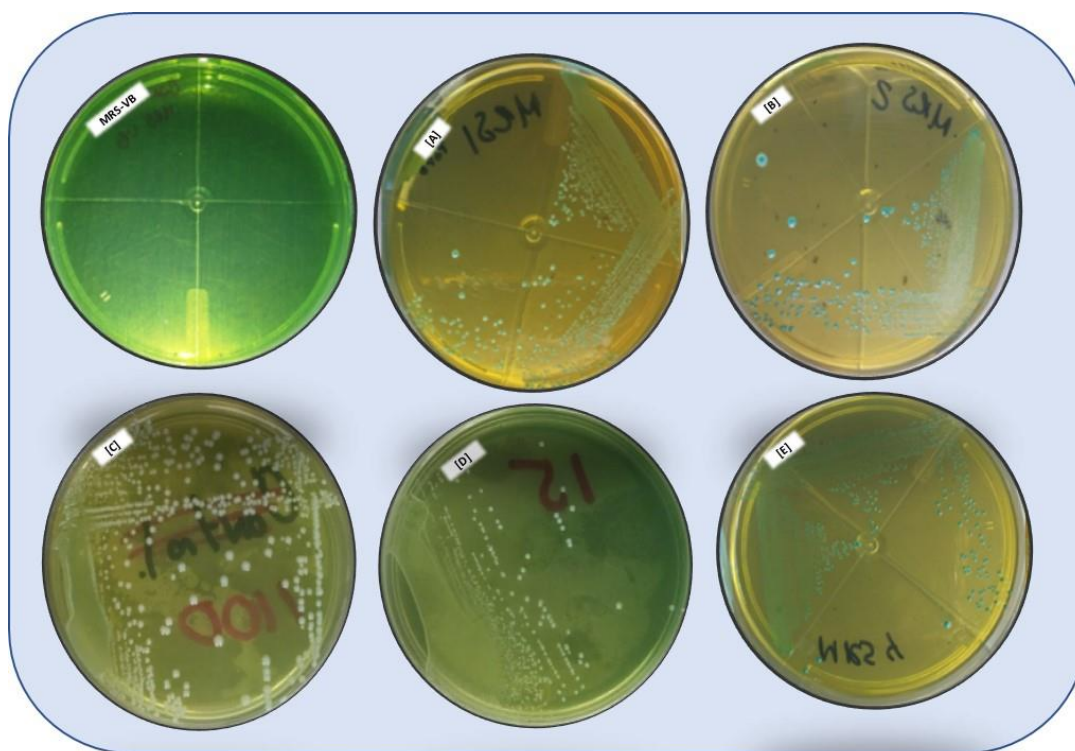


Figura 10. Ejemplo de las diferentes morfologías de las colonias obtenidas del chorizo tipo español, crecidas en medio MRS-VB. **[MRS-VB]** medio control, **[A]** circulares, convexas de color verde claro con el centro verde oscuro, **[B]** circulares, convexas, grandes y blancas con el centro verde, **[C]** circulares, convexas, grandes y blancas, **[D]** circulares, convexas, pequeñas y de color blanco, **[E]** circulares, convexas, pequeñas y de color verde oscuro.

A cada una de las colonias se le realizó la extracción del ADN y se amplificó el gen completo 16S rRNA, se realizó la purificación de los fragmentos obtenidos y la secuenciación de los mismos. Se obtuvieron valores de identidad mayores al 97%. Ocho de las cepas identificadas correspondieron al grupo de las BAL, donde *Lactobacillus* y *Pediococcus* fueron los géneros que predominaron durante el proceso de maduración (Tabla 8). El incremento en las BAL se

correlaciona con los resultados del análisis fisicoquímico como la disminución del pH y el aumento en el contenido de AT registrado a los 10 días de maduración.

Tabla 8. Identidad obtenida mediante el análisis del gen completo 16S rRNA de las cepas aisladas en agar MRS-VB, a partir de la pasta cárnica y el chorizo tipo español a los 10, 20 y 30 días de maduración.

	Cepa #	Identidad	Similitud (%)	E-Value	Número de acceso
M E D I O	1100	<i>Weissella thailandensis</i>	99	4e ⁻⁵¹	HE575179.1
	1101	<i>Pediococcus acidilactici</i>	98	2e ⁻²⁶	KP728239
	1102	<i>Lactobacillus sakei</i>	99	8e ⁻¹¹⁶	MG835614.1
	1106	<i>Lactobacillus sakei</i>	99	5e ⁻¹⁸	MG835614.1
	1107	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	3e ⁻⁵⁴¹	JX402122.1
	1108	<i>Weissella confusa</i>	100	2e ⁻²⁶	MG669321.1
	1109	<i>Weissella viridenses</i>	99	3e ⁻⁴¹	MK680135.1
	1112	<i>Weissella viridenses</i>	97	3e ⁻⁶⁴	JQ805715.1
	1113	<i>Lactobacillus sakei</i>	99	4e ⁻⁴⁶	FJ040202.1
V B	1115	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	100	4e ⁻¹²⁴	KF562066.1
	1118	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	3e ⁻⁴¹	CP025206.1
	1119	<i>Lactobacillus sakei</i>	99	5e ⁻¹⁷	CP025206.1

De igual manera, pero a partir del medio EMB se lograron aislar por diferencias morfológicas e identificar mediante la secuenciación del gen completo 16S rRNA a 17 colonias provenientes de la pasta cárnica y del chorizo tipo español durante su proceso de maduración. Algunas de las diferencias observadas en las colonias se muestran en la Figura 11.

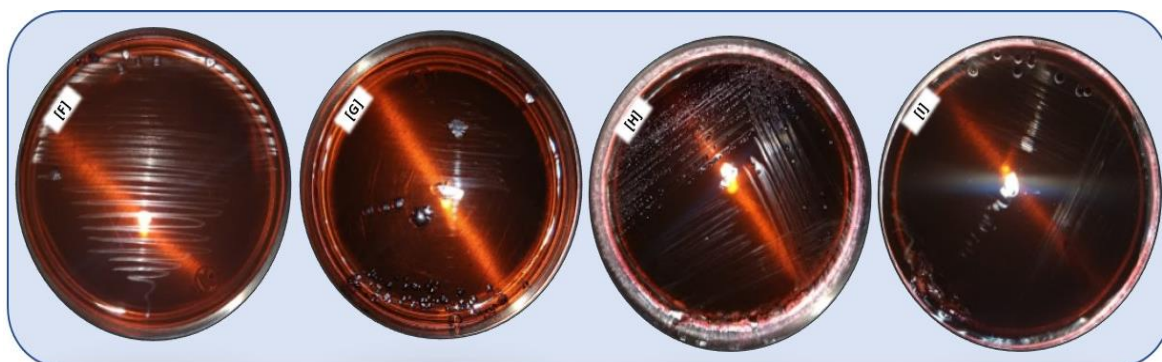


Figura 11. Ejemplo de las diferentes morfologías en las colonias obtenidas del chorizo tipo español, crecidas en medio EMB. **[F]** circulares, convexas, café obscuro y aspecto céreo, **[G]** grandes, convexas e irregulares, centro líquido, café obscuro, **[H]** puntiformes, café obscuro, **[I]** circulares, planas, aspecto céreo y color café obscuro.

Los resultados obtenidos de la identificación de las colonias crecidas en medio EMB se muestran en la Tabla 9. Se logró identificar a diferentes especies de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, los cuales representaron el 35.29 y 29.41% (respectivamente) del total de la abundancia relativa. Las *Pseudomonas* tienen una temperatura óptima de crecimiento de 30 a 35°C, sin embargo, existen especies que pueden crecer de -20 a 10°C (Ercolini et al., 2010; Wang et al., 2016). Este género se caracteriza por ser responsable del deterioro de pescado, vegetales, productos cárnicos y alimentos de origen animal (Ercolini et al., 2007), debido a que algunas cepas como *P. fragi*, son capaces de producir diferentes tipos de enzimas, incluyendo lipasas y proteasas (Ercolini et al., 2010; Wang et al., 2016). En particular, se tiene el registro de que las *Pseudomonas* dominan la microbiota de la carne almacenada de forma aerobia. Mediante caracterización fenotípica y molecular se han identificado a tres especies principales de *Pseudomonas* presentes en la carne, identificadas como *P. fragi*, *P. fluorescens* y *P. lundensis* (Doulgeraki & Nychas, 2013; Petruzzi, Corbo, Sinigaglia, & Bevilacqua, 2017) especies que también fueron identificadas en este estudio, presentes en la pasta cárnica, que se encuentra conformada por carne fresca y especias. Doulgeraki & Nychas (2013), reportaron que dentro de las especies más importantes en el deterioro de la carne se encuentran a: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas viridiflava* y *Pseudomonas syringae*. Ercolini et al., (2010), encontraron que *Pseudomonas fragi* produce algunas proteasas que han sido utilizadas en la producción biotecnológica de aromas frutales para el desarrollo del sabor en una amplia variedad de productos alimenticios (Comi, 2017).

Por parte del género *Bacillus*, se sabe que comúnmente se encuentran en agua, plantas y suelo, además de que pueden estar presentes en algunos alimentos, sin provocar procesos de descomposición en los mismos, o enfermedad en el ser humano.

Diversos estudios moleculares sobre la secuencia del gen 16S rRNA han mostrado que diversas miembros del grupo *Bacillus velezensis*, pueden asignarse a la agrupación de *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, basándose en el hecho de que comparten el 99% de similitud filogenética de su ADN (Adeniji, Loots, & Babalola, 2019). Estas especies fueron identificadas dentro de las cepas aisladas en agar EMB provenientes del chorizo tipo español (Tabla 9).

Tabla 9. Identidad de las colonias aisladas en agar EMB; provenientes de la pasta cárnica y del chorizo tipo español a diferentes tiempos de maduración. Identificadas mediante el análisis del gen completo 16S rRNA.

	Aislada (16S)	Identidad	Similitud (%)	E-Value	Número de acceso	
M E D I O	1124	<i>Bacillus velezensis</i>	99	0.0	KY072765.1	
	1126	<i>Pseudomonas lundensis</i>	100	0.0	KX186962.1	
	1128	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100	0.0	MH793436.1	
	1130	<i>Bacillus sp.</i>	100	0.0	MH790144.1	
	1131	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	100	0.0	MH206165.1	
	1132	<i>Bacillus sp.</i>	100	0.0	MH790144.1	
	1133	<i>Pseudomas fluorescens</i>	100	0.0	AB204715.1	
	1134	<i>Pseudomonas sp.</i>	100	0.0	MG846108.1	
	1136	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	0.0	KM191359.1	
	1138	<i>Bacillus subtilis</i>	99	0.0	MH794233.1	
	E M B	1139	<i>Pseudomonas fragi</i>	100	0.0	MG517435.1
		1140	<i>Lactobacillus sakei</i>	99	0.0	LC129536.1
		1141	<i>Carnobacterium divergens</i>	100	0.0	LC279606.1
		1146	<i>Enterococcus faecalis</i>	99	0.0	MF370052.1
1147		<i>Lactobacillus sakei</i>	100	0.0	MF541037.1	
1148		<i>Bacillus subtilis</i>	90	0.0	HQ222303.1	
	1149	<i>Hafnia alvei</i>	99	0.0	CP009706.1	

Dentro de las especies identificadas se encontró a *Carnobacterium divergens*, especie que frecuentemente está presente en la microbiota de carnes y mariscos envasados al vacío (Groth Laursen et al., 2005).

En la Figura 12 se muestra el dendograma sin raíz, basado en secuencias parciales, construido con el método de Neighbor-Joining, a partir de las 24 secuencias diferentes obtenidas de la secuenciación del gen 16S rRNA que se muestran en las Tablas 8 y 9. Este árbol consenso inferido de 1000 repeticiones muestra la relación entre las secuencias analizadas. La distancia de la relación fue calculada usando el método Tamura Nei.

El análisis filogenético permitió corroborar la identificación taxonómica de las colonias aisladas, de tal forma que estos se distribuyen en grupos que corresponden con la identificación presuntiva basada en las características morfológicas. En la topología del árbol se puede observar la diferenciación en clados (conjunto de especies emparentadas) de cada una de las especies analizadas, la distribución de los aislados se muestra en dos principales phyla, Firmicutes y Proteobacteria. Los Firmicutes presentaron siete géneros diferentes siendo *Lactobacillus*, *Weisella* y *Bacillus* los géneros más representativos. El phylum Proteobacteria presentó dos géneros, siendo *Pseudomonas* el género más representativo con cinco de las seis diferentes subespecies encontradas.

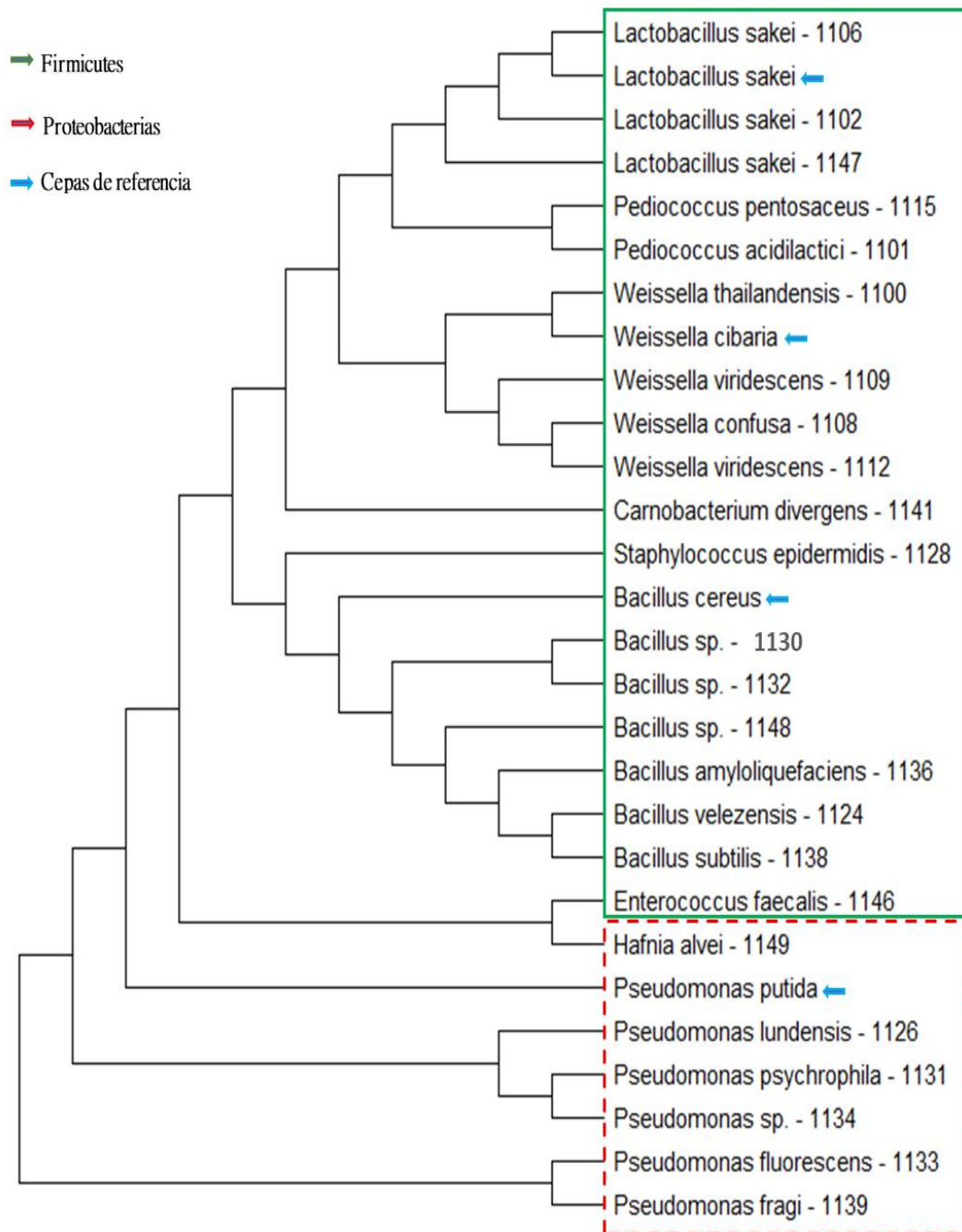


Figura 12. Dendrograma creado a partir del perfil de las secuencias de las BAL y enterobacterias aisladas en medio MRS-VB y EMB (respectivamente) e identificadas mediante la secuenciación del gen completo 16S rRNA. Se calculó con el método estadístico de Neighbor-Joining. El árbol consenso inferido por el método Bootstrap de 1000 repeticiones, muestra la relación entre las 24 diferentes secuencias parciales analizadas y comparadas con cuatro secuencias referencia obtenidas de la base de datos NCBI. La distancia de la relación fue calculada usando el método Tamura Nei. Se empleó el programa Mega-X.

10.4 Determinación del potencial biotecnológico de las BAL aisladas

Se realizó la tinción de Gram y se evaluó la producción de gas y la actividad catalasa de las 12 BAL aisladas (medio MRS-VB) a partir de la pasta cárnica y del chorizo tipo español a diferentes tiempos de maduración.

Por otra parte, se evaluó el potencial biotecnológico en las BAL ya que se sabe que algunas pueden producir compuestos de bajo peso molecular incluyendo ácidos, alcoholes, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno y otros metabolitos que pueden llegar a inhibir a algunos microorganismos (Helander, von Wright, & Mattila-Sandholm, 1997).

En la Tabla 10 se muestran los resultados de la tinción de Gram. Todas fueron Gram positivo, característica principal en las BAL. Como prueba presuntiva, se determinó producción de gas por su acumulación en las campanas de Durham para determinar la capacidad de fermentativa de cada cepa analizada. Así mismo, se realizó la prueba de catalasa para determinar su capacidad de degradar el peróxido de hidrógeno mediante la enzima catalasa.

Tabla 10. Tinción de Gram, evaluación de la actividad catalasa y producción de las BAL identificadas durante el proceso de maduración del producto cárnico.

Clave	Identidad	Tinción de Gram	Producción de gas	Actividad catalasa
1100	<i>Weissella thailandensis</i>	Bacilos +	+	-
1101	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Cocos +	-	-
1102	<i>Lactobacillus sakei</i>	Bacilos +	-	-
1106	<i>Lactobacillus sakei</i>	Bacilos +	-	-
1107	<i>Lactobacillus sakei</i>	Bacilos +	-	-
1108	<i>Weissella confusa</i>	Bacilos +	+	-
1109	<i>Weissella viridenses</i>	Bacilos +	-	-
1112	<i>Weissella viridenses</i>	Bacilos +	+	-
1113	<i>Lactobacillus sakei</i>	Bacilos +	+	-
1115	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Cocos +	+	-
1118	<i>Lactobacillus sakei</i>	Bacilos +	-	-
1119	<i>Lactobacillus sakei</i>	Bacilos +	-	-

Se evaluó la capacidad antagónica de las 12 bacterias (microorganismos de estudio) aisladas frente al crecimiento in vitro de las siguientes cepas: *Lactobacillus curvatus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas acidilactici*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, así como su actividad lipolítica y proteolítica en agar tributirina y agar suplementado con leche descremada, respectivamente. La actividad positiva se evidenció por la formación de un halo de contraste con el resto del agar de cultivo a las 24 h de incubación.

La cepa 1101 (*Pediococcus acidilactici*) demostró actividad antagónica contra *L. curvatus*, *S. typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, mientras que las cepas 1102, 1106 y 1112 presentaron actividad antagónica solamente contra *Pediococcus acidilactici* (Tabla 11). En la Figura 13, se muestra un ejemplo de actividad antagónica negativa con la cepa 1100 y la actividad antagónica positiva con la cepa 1101 contra casi todos los microorganismos alterantes probados. La actividad antagónica puede ser causada por la acidez provocada por la producción de los ácidos orgánicos que produce la cepa 1101 debido a que es una BAL. Se sabe que a valores de pH menores a 4 se puede llegar a inhibir el desarrollo de varios de microorganismos alterantes como *Escherichia coli*. Sin embargo, cabe mencionar que *Pediococcus acidilactici* es productora de péptidos antimicrobianos conocidos como bacteriocinas, específicamente de las bacteriocinas Pediocina PA-1 y Pediocina JD, por lo que la actividad antimicrobiana puede estar dada por estos metabolitos debido a que son péptidos antimicrobianos de amplio espectro (Helander et al., 1997; Montville & Chen, 1998).

La actividad lipolítica y proteolítica fue determinada en todas las cepas aisladas, utilizando los medios de tributirina y caseína (respectivamente), la actividad positiva para ambas pruebas se puede observar en la Figura 14, con la formación de halos alrededor del inoculo, indicando la presencia de proteasas y lipasas.

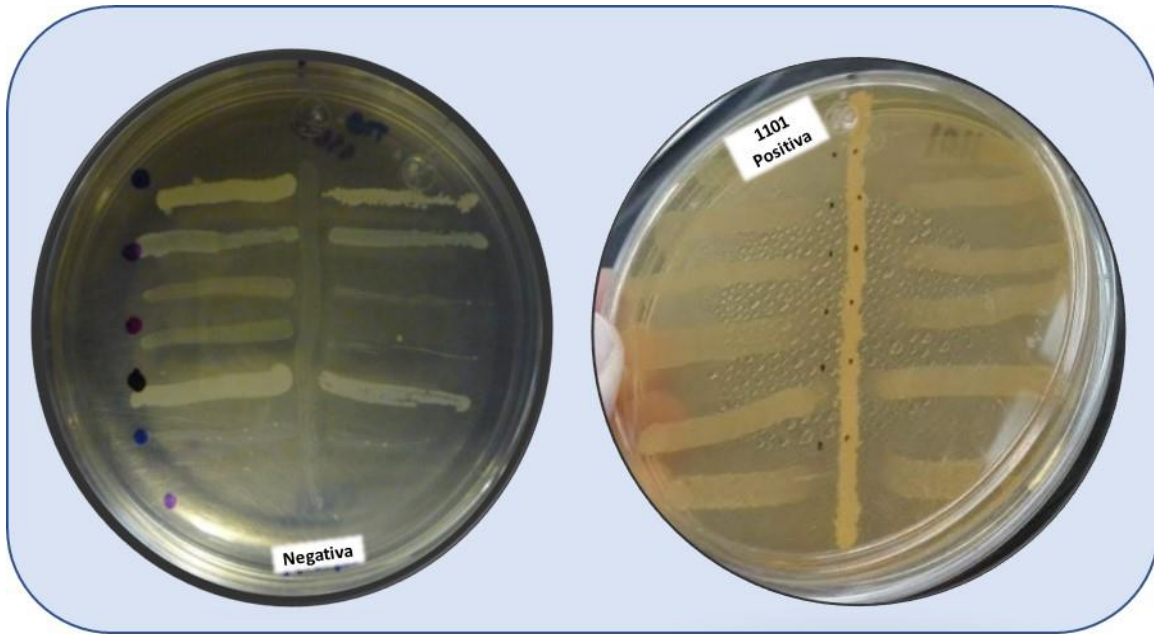


Figura 13. [Negativa] Actividad antagónica negativa de la cepa 1100, [Positiva] Actividad antagónica positiva derivada de la cepa 1101.

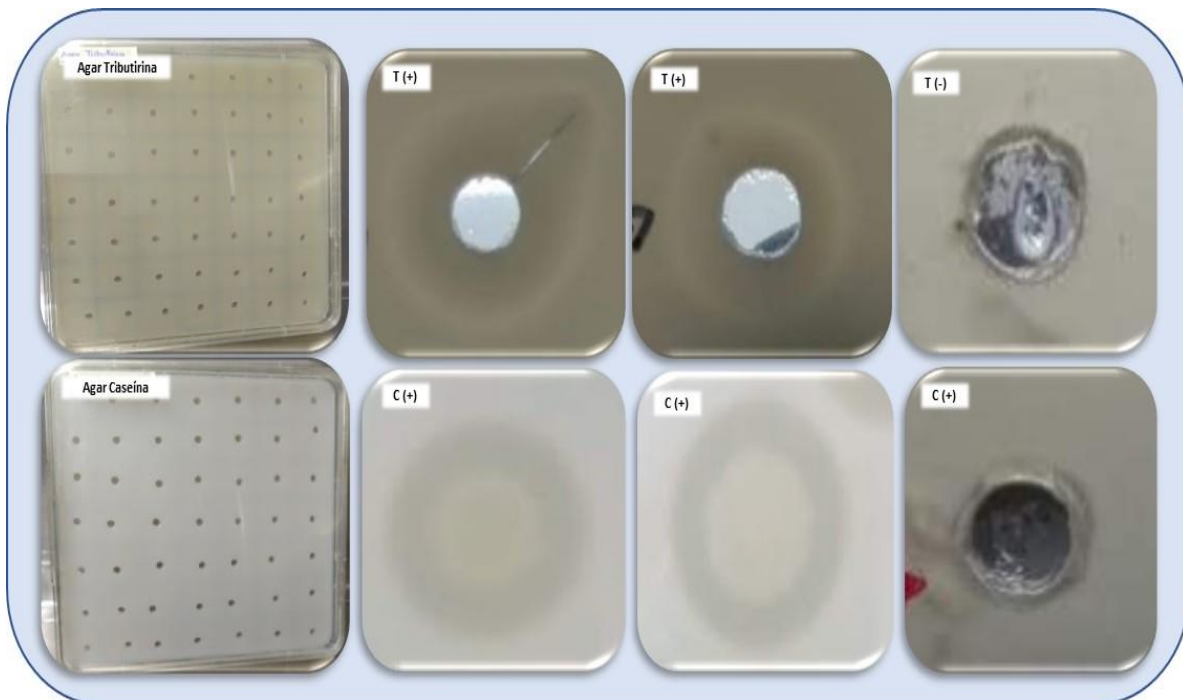


Figura 14. Ejemplo de la actividad lipolítica y proteolítica presentada con cepas aisladas del chorizo tipo español en medios suplementados con tributirina y caseína (respectivamente). [T+] Formación de halo por actividad positiva de enzimas lipolíticas, [C+] Formación de halo por actividad positiva de enzimas proteolíticas, y [T-] Actividad negativa en medio tributirina.

Todas las cepas presentaron actividad lipolítica a excepción de la cepa 1118, sin embargo, las cepas 1101 y 1112 presentaron una mayor actividad lipolítica y fueron las únicas que presentaron actividad proteolítica (Tabla 11).

La actividad lipolítica es conferida por un conjunto de enzimas dentro de las cuales se encuentran lipasas y esterases. Las lipasas tienen la capacidad de hidrolizar acilglicérols de cadena larga, mientras que las esterases hidrolizan ésteres de cadena corta como la tributirina, estas enzimas han sido utilizadas en aplicaciones biotecnológicas, en la industria de alimentos, en la producción de agentes tensoactivos, en la degradación de aceites y en la preparación de productos farmacéuticos, entre otros (Janda, 2005). Estas enzimas son obtenidas de diferentes fuentes, sin embargo, las de mayor interés comercial son las aisladas de fuentes microbianas (Houde, Kademi, & Leblanc, 2004; Daniele, Amaíz, Medina, & Valbuena, 2011; Lopes, Fraga, Fleuri, & Macedo, 2011). Las enzimas que presentan mayor actividad lipolítica proceden de los géneros *Pseudomonas*, *Lactobacillus* y *Bacillus*. Se sabe que la actividad lipolítica y proteolítica pueden llegar a intervenir en la formación de sabores y aromas (Parra-Huertas, 2010).

Finalmente, la cepa 1101 identificada como *Pediococcus acidilactici* fue la que mostró actividad antagonica contra casi todas las cepas probadas, y mayor actividad proteolítica y lipolítica. Llorente-Bousquets, Pérez-Munguía, & Farrés, (2008) reportaron que la cepa *Pediococcus acidilactici* posee actividad proteolítica extracelular, con dos proteasas que degradan caseína, gelatina y elastina.

Tabla 11. Evaluación de las actividades antagónica, lipolítica y proteolítica de las cepas aisladas en medio MRS-VB a partir de la pasta cármica y durante el proceso de maduración del chorizo tipo español.

Microorganismo de estudio	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Actividad lipolítica	Actividad proteolítica
1100 <i>Weissella thailandensis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
1101 <i>Pediococcus acidilactici</i>	+	-	-	+	+	+	+++	++
1102 <i>Lactobacillus sakei</i>	-	-	+	-	-	-	+	-
1106 <i>Lactobacillus sakei</i>	-	-	+	-	-	-	+	-
1107 <i>Lactobacillus sakei</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
1108 <i>Weissella confusa</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
1109 <i>Weissella viridenses</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
1112 <i>Weissella viridenses</i>	-	-	+	-	-	-	++	+
1113 <i>Lactobacillus sakei</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
1115 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
1118 <i>Lactobacillus sakei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
1119 <i>Lactobacillus sakei</i>	-	-	-	-	-	-	+	-

(+) halos de 1 a 2 mm; (++) halos > 2.1 a 4mm, (+++) halos > 4.1 mm

Posteriormente, se determinó la resistencia a diferentes valores de pH y concentraciones de NaCl. En la Tabla 12 se muestran las cepas que presentaron resistencia o no a pH y NaCl, aquellas con valores de absorbancia positivos fueron resistentes. Después de una hora de incubación a los diferentes valores y concentraciones de pH y NaCl se tomó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

Las cepas mostraron resistencia a valores de $\text{pH} \geq 4.5$ a excepción de la 1101 y 1115 no resistentes. La cepa 1102 identificada como *Lactobacillus sakei* mostró el valor más alto de absorbancia (0.9) a pH de 4.5. Todas las cepas mostraron resistencia a las diferentes concentraciones de NaCl probadas. Ramírez-Ramírez, Ulloa, Velázquez, Ulloa, & Romero, (2011) y Carr et al., (2002) reportaron que las BAL pueden crecer a valores de $\text{pH} \geq 3.2$ y con concentración máximas de NaCl del 8%.

La cepa 1101 presentó la mayor actividad antagónica, motivo por el cual fue seleccionada y sometida a una concentración del 3% de sales biliares durante dos, cuatro y seis horas a 37°C para comprobar su resistencia, por el mismo motivo se verificó su crecimiento a diversas temperaturas ($50, 60, 70$ y 80°C) durante una hora de incubación, determinando el número de UFC al inicio y término de cada prueba.

La cepa probada no mostró resistencia a sales biliares y fue resistente a las cuatro temperaturas evaluadas. La cuenta inicial de UFC fue de 4×10^4 UFC/mL a 37°C (al tiempo cero experimental) después de incubarse una hora presentó una cuenta de 16×10^5 UFC/mL a 50°C , 10×10^5 UFC/mL a 60°C , 30×10^3 a 70°C y finalmente a los 80°C presentó una cuenta de 80×10^2 UFC/mL. El número de UFC disminuyó conforme aumentó la temperatura de calentamiento, mostrando resistencia a este intervalo de temperatura.

Con los resultados obtenidos de las actividades y resistencias evaluadas en las BAL, se concluyó que la cepa con mayor potencial biotecnológico fue la 1101 identificada como *Pediococcus acidilactici*, debido a la actividad antagónica que mostró ante los microorganismos patógenos o alterantes de alimentos.

Tabla 12. Evaluación de la resistencia a diferentes valores de pH y concentraciones de NaCl de las BAL identificadas. Determinación espectrofotométrica.

Clave Identidad	Resistencia a pH							Resistencia a NaCl (%)				
	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
1100 <i>Weissella thailandensis</i>	-	-	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	++	++
1101 <i>Pediococcus acidilactici</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
1102 <i>Lactobacillus sakei</i>	-	-	+++	+	+	+	+	+++	+++	+++	++	+++
1107 <i>Lactobacillus sakei</i>	-	-	-	-	+	+	+	+++	++	++	++	++
1108 <i>Weissella confusa</i>	-	-	-	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	++
1109 <i>Weissella viridenses</i>	-	-	+	+	+	+	+	+++	+++	++	++	++
1113 <i>Lactobacillus sakei</i>	-	-	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
1115 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
1118 <i>Lactobacillus sakei</i>	-	-	+	+	++	+	+	+++	+++	+++	++	++
1119 <i>Lactobacillus sakei</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

(-) absorbancia de 0; (+) valores de absorbancia entre 0.1 a 0.4; (++) valores de absorbancia entre 0.41 a 0.80; (+++) valores de absorbancia entre 0.81 a 0.93; (ND) No determina

Por otra parte, se evaluó la capacidad antagónica de las 17 bacterias aisladas a partir del medio EMB. En la Tabla 13, se muestran los resultados obtenidos de la determinación de la capacidad antagónica contra las cepas de *Lactobacillus curvatus*, *Escherichia coli*, *Pediococcus acidilactici*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, así como su actividad lipolítica (agar tributirina) y proteolítica (agar suplementado con leche descremada). La actividad positiva se evidencio por la formación de un halo de contraste con el resto del agar de cultivo a las 24 h de incubación.

Las cepas 1130, 1132, 1134, 1136, 1138, 1140, 1141, 1147, 1148 y 1149, presentaron capacidad antagónica contra la mayoría de las cepas alterantes o BAL probadas. Sin embargo, la cepa 1138, identificada como *Bacillus subtilis* fue la que presentó la mayor actividad antagónica contra todos los microorganismos probados, formando halos de inhibición de 2.1 a 4 mm.

Las cepas 1130, 1134 y 1138, mostraron actividad lipolítica y proteolítica positiva, formando halos de inhibición con diámetros de 1 a 2 mm. Dentro de las cuales la cepa 1138 fue la formó los halos de mayor diámetro dentro de los valores ya mencionados.

Tabla 13. Evaluación de la actividad antagónica, lipolítica y proteolítica de las cepas aisladas en medio EMB a partir de la pasta cárnica y del proceso de maduración del chorizo tipo español.

Microorganismo de estudio	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Actividad lipolítica	Actividad proteolítica
1124 <i>Bacillus velezensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
1126 <i>Pseudomonas lundensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
1128 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
1130 <i>Bacillus sp.</i>	-	+	-	-	-	+	+	+
1131 <i>Pseudomonas psychrophila</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
1132 <i>Bacillus sp.</i>	++	-	++	-	-	-	-	+
1133 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
1134 <i>Pseudomonas sp.</i>	-	+	-	-	-	-	+	+
1136 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	-	+	+	+	-	-	+
1138 <i>Bacillus subtilis</i>	++	++	++	++	++	++	+	+
1139 <i>Pseudomonas fragi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
1140 <i>Lactobacillus sakei</i>	+	-	-	+	+	+	-	-
1141 <i>Carnobacterium divergens</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
1146 <i>Eenterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
1147 <i>Lactobacillus sakei</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
1148 <i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+
1149 <i>Hafina alvei</i>	+	+	+	+	+	+	-	-

(+) halos de 1 a 2 mm; (++) halos >2.1 a 4 mm; (+++) halos >4.1 mm

10.5 Análisis molecular de la población bacteriana

Extracción del ADN total

El análisis de la diversidad y dinámica microbiana de la pasta cárnica (tiempo cero) y de los diferentes tiempos de maduración del chorizo tipo español, se llevó a cabo mediante la extracción del ADN total y amplificación de las regiones V3 y V6-V8 mediante PCR para su análisis por DGGE. Por otra parte, se realizó una comparación de la huella genética con ambas regiones y se estimaron diversos índices de diversidad mediante un análisis digital de los geles obtenidos a partir de la DGGE, utilizando el programa Image J, calculando el número de bandas y la intensidad de estas (densidad óptica) detectadas en el gel.

La electroforesis en gel del ADN genómico y de los productos obtenidos de la PCR se muestran en la Figura 15. Los fragmentos de ADN total se observaron por encima de las 10 000 pb, los fragmentos obtenidos con los cebadores para la región V3 presentan un peso aproximado de 200 pb y de 400 pb para la región V6-V8.

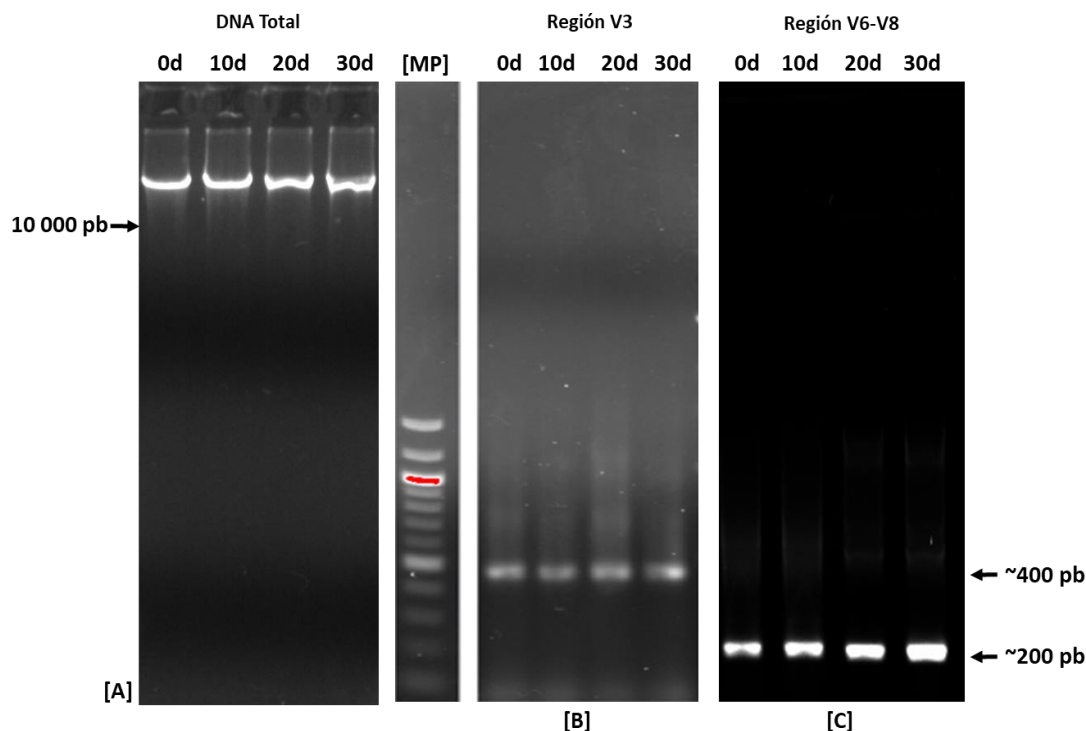


Figura 15. Visualización del ADN total y fragmentos obtenidos para las regiones V3 y V6-V8. [A] ADN total, visualizado en gel de agarosa al 0.8%. [B] Amplificación de la región V3 (~200 pb) y [C] Amplificación de la región V6-V8 (~400 pb). Visualizados en gel de agarosa al 0.1%. Muestras de pasta cárnica (0d), 10, 20 y 30 días de maduración del chorizo tipo español.

Evaluación de la población bacteriana mediante PCR-DGGE

Análisis del perfil de bandeo obtenido de las cepas aisladas en medio MRS-VB y EMB

Los fragmentos obtenidos de la amplificación de la región V6-V8 a partir de las colonias aisladas en medio MRS-VB se analizaron mediante DGGE.

El uso de alguna o algunas de las regiones del gen 16S en combinación con la técnica de DGGE permite visualizar el perfil de bandeo de una cepa aislada y/o de una comunidad bacteriana.

En la Figura 16 se muestran los perfiles obtenidos, cada uno de los carriles representan a cada una de las cepas analizadas y en la Tabla 14 se encuentra la identificación molecular de cada una de las bandas. El perfil de bandeo (cada carril) muestra que microorganismos aislados pueden estar representados por una o más bandas como se visualiza para los carriles B (una banda) y D (tres bandas).

Los carriles C, D, y E presentan un perfil de bandeo diferente, sin embargo, la banda C1, D1 y diversas bandas del carril E son identificadas como *Lactobacillus sakei*.

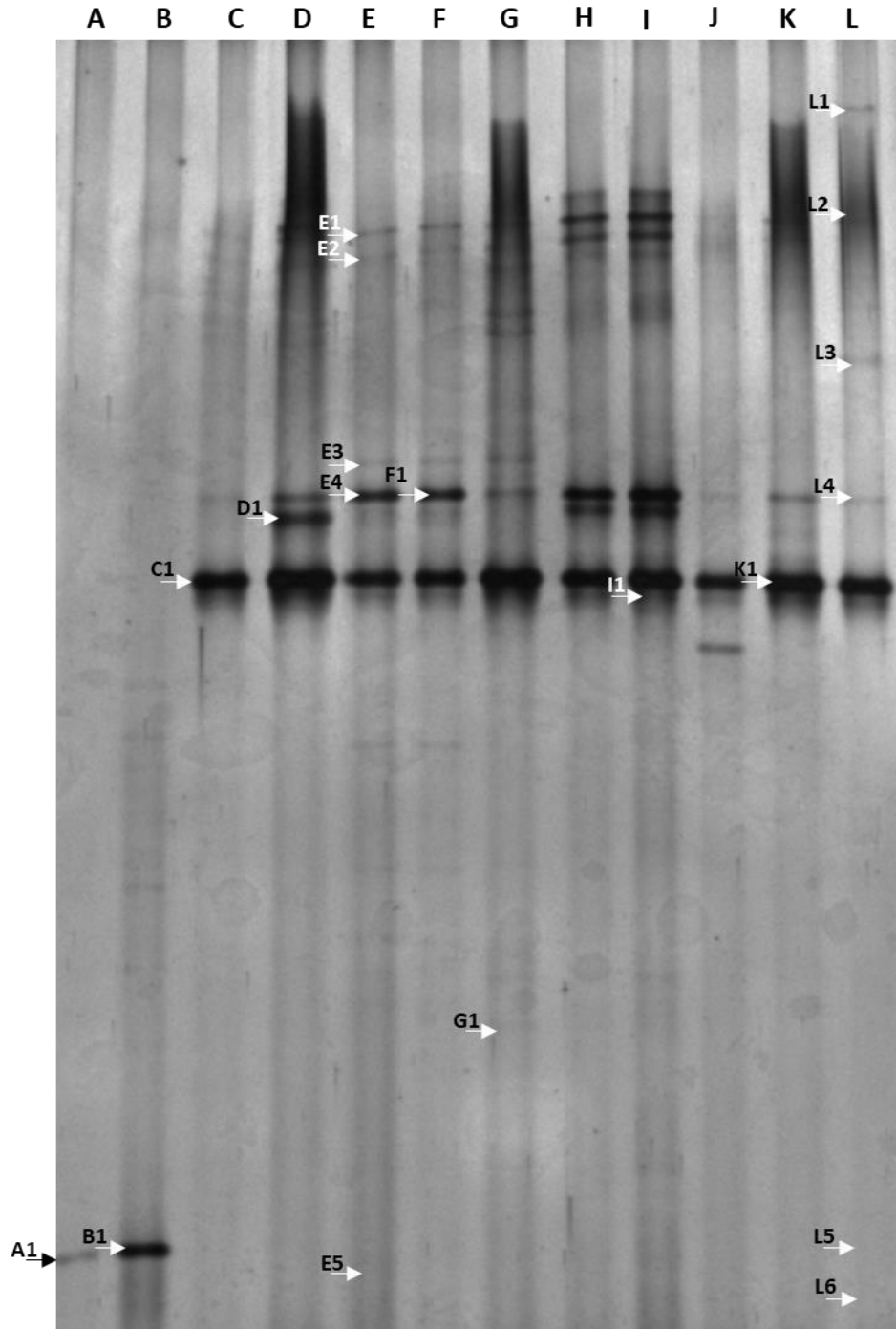


Figura 16. Perfil de bandas de la DGGE (gradiente desnaturalizante del 30 - 60%) de las BAL utilizando los cebadores correspondientes a la región V6-V8. Cada carril corresponde a cada una de las colonias aisladas.

Tabla 14. Identidad de las bandas seleccionadas correspondientes a las BAL aisladas en medio MRS-VB. Identificadas mediante el análisis de la región V6-V8 del gen 16S rRNA.

	Columna	Identidad	Similitud (%)	E-Value	Número de acceso
	Banda				
B A C T E R I A S A C I D O L Á C T I C A S	A1	<i>Bacillus subtilis</i>	95	2e ⁻¹⁴³	MG255306.1
	B1	<i>Unculture bacterium</i>	100	0.0	KC887986.1
	C1	<i>Lactobacillus sakei</i>	98	4e ⁻⁸²	MG835614.1
	D1	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	0.0	MG835614.1
	E1	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	9e ⁻¹⁷⁷	MG835614.1
	E2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	100	2e ⁻⁴³	CP031003.1
	E3	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	0.0	MG835614.1
	E4	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	0.0	MG835614.1
	E5	<i>Lactobacillus sakei</i>	99	0.0	MF541037.1
	F1	<i>Lactobacillus sakei</i>	99	0.0	MG835614.1
	G1	<i>Lactobacillus sakei</i>	99	0.0	EU465501.1
	I1	<i>Lactobacillus sakei</i>	99	0.0	DQ405252.1
	K1	<i>Lactobacillus sakei</i>	99	0.0	DQ405252.1
	L1	<i>Lactobacillus curvatus</i>	100	0.0	DP405252.1
	L2	<i>Lactobacillus sakei</i>	98	1e ⁻¹⁵⁹	MG835614.1
	L3	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	0.0	MG835614.1
L4	<i>Lactobacillus sp.</i>	99	0.0	KC887993.1	
L5	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	0.0	MG835614.1	
L6	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	2e ⁻¹⁵	MG515286.1	

Los resultados obtenidos de la identificación de cada una de las bandas de los microorganismos aislados concuerdan con los obtenidos en la secuenciación del gen 16S rRNA completo (Tabla 8), principalmente con *Lactobacillus sakei*.

Es posible que un mismo microorganismo pueda mostrar un patrón de bandas diferente, debido a que el 16S es un gen con múltiples copias heterogéneas dentro de un genoma, factor conocido como microheterogeneidad. Por lo que cualquier mutación de un par de bases en el gen, puede mostrar que dos o más microorganismos diferentes tengan dos o más bandas iguales, incluso que un mismo microorganismo tenga diferentes perfiles de bandeo (Nikolausz, Sipos, Révész, Székely, & Márialigeti, 2005; Case et al., 2007).

Case y col. (2007) reportaron que los órdenes de *Bacillales* y *Lactobacillales* pertenecientes al phylum Firmicutes pueden llegar a tener de 5 a 13 y de 4 a 6 copias del gen 16S rRNA dentro de su genoma, respectivamente. De igual manera, dentro del grupo taxonómico de Proteobacterias las *Pseudomonas* pueden llegar a presentar de 1 a 11 copias del gen 16S rRNA dentro de su genoma. En la Figura 17 se muestra el perfil de bandeo (DGGE, región V6-V8) obtenido de las colonias crecidas y aisladas en medio EMB. Su identificación por medio del análisis del gen 16S se muestra en la Tabla 9. Las cepas 1126, 1131, 1133, 1134 y 1139 fueron identificadas como *Pseudomonas* y su huella genética muestra dos o más bandas con lo que es posible afirmar el contenido de multicopias dentro de su genoma como se mencionó anteriormente.

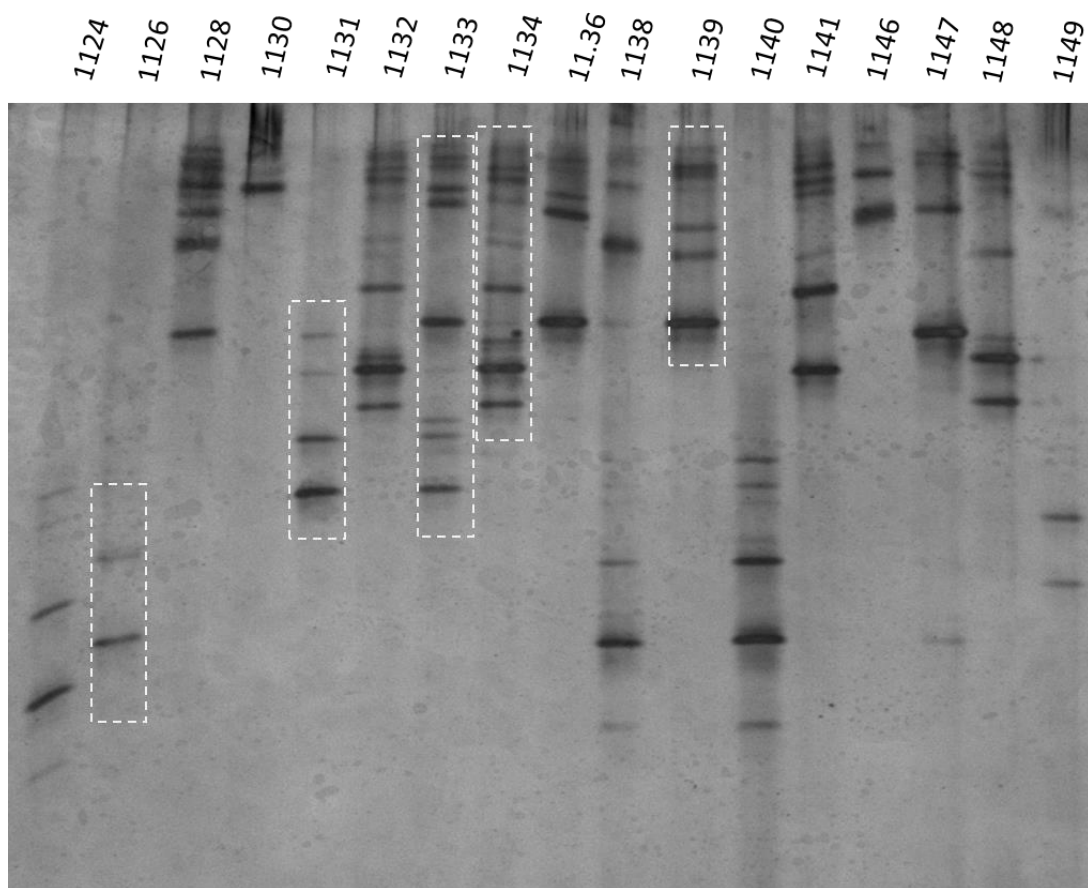


Figura 17. Perfil de bandas de la DGGE (gradiente desnaturalizante del 30 al 60%) de las enterobacterias utilizando los cebadores correspondientes a la región V6-V8. Cada carril corresponde a cada una de las colonias aisladas.

Huella genética obtenida con los cebadores V3 y V6-V8 de la pasta cárnica y de las muestras obtenidas a los 10, 20 y 30 días de maduración del chorizo tipo español

Se inyectaron concentraciones cercanas a 300 ng/ μ L de cada uno de los productos de PCR amplificados (regiones V3 y V6-V8) obtenidos de los cuatro tiempos de maduración, para ser analizados por el método de DGGE con un gradiente desnaturizante del 30 al 60%. Los perfiles de bandeo obtenidos se muestran en las Figuras 18 y 19.

La pasta cárnica (tiempo cero) presentó un mayor número de bandas (9 bandas), el cual disminuyó en los siguientes tiempos de maduración, a 6, 8 y 7 bandas (Figura 18). Además de presentar una mayor diversidad bacteriana, que se evidencia por la identificación de dos géneros y seis subespecies diferentes (Tabla 15), la mayoría correspondientes a bacterias Gram negativas.

Durante el proceso de maduración las bandas 1, 2, 3, 5 y 7, desaparecieron o no fueron evidenciadas, a los 10 días las bandas 10, 11, 13 y 14 se visualizaron y algunas otras fueron constantes durante el resto del proceso como las 15, 18, 19 y 20. Se logra observar un perfil de bandeo similar principalmente en la parte central del gel de electroforesis.

Después de analizar el perfil de bandeo, se llevó a cabo la extracción de bandas y de ADN para su reamplificación e identificación mediante la secuenciación de la región V6-V8 del gen 16S rRNA. Es importante mencionar que no todas las bandas visualizadas en el gel fueron analizadas, debido a que en algunas de ellas no se logró eluir el ADN de las mismas.

La identificación por secuenciación se presenta en la Tabla 15. En el tiempo cero identificaron dos géneros, *Bacillus* y *Pseudomonas*, siendo esta última la más predominante con cuatro especies diferentes, dentro de las cuales *Pseudomonas fragi* y *Pseudomonas fluorescens* también fueron identificadas mediante el análisis del gen 16S completo como se menciona en la primera etapa de este trabajo. A partir de los 10 días de maduración el microorganismo que se identificó un mayor número de veces fue *Lactobacillus sakei* la presencia del género *Pseudomonas* disminuyó, lo que

indica que durante el proceso de maduración los cambios en las condiciones fisicoquímicas como el pH y el porcentaje de acidez influyen en las condiciones de crecimiento de dicho género. Cabe señalar que el perfil de bandas entre los tiempos 10, 20 y 30 días es similar.

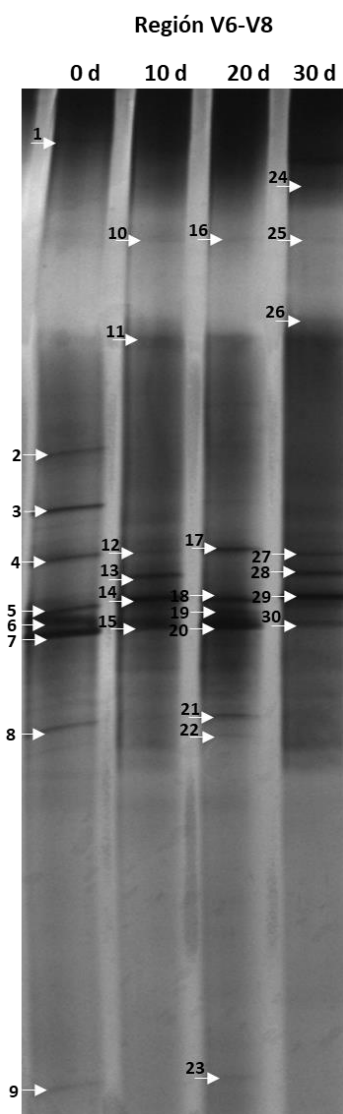


Figura 18. Perfil de bandeo obtenido de la DGGE (30-60%) de los fragmentos de ADN correspondientes a la región V6-V8. Carriles correspondientes a 0 d (pasta cármica), 10, 20 y 30 días de maduración del chorizo tipo español.

Tabla 15. Identidad de las bandas seleccionadas de la DGGE correspondiente al proceso de maduración del chorizo tipo español. Identificadas mediante el análisis de la región V6-V8 del gen 16S rRNA.

Muestra	Banda	Identidad	Similitud (%)	E-Value	Número de acceso
P A S T A C Á R N I C A	1	<i>Pseudomonas fragi</i>	99	2e ⁻⁶⁹	CP021986.1
	2	<i>Pseudomonas fragi</i>	100	1e ⁻⁸²	CP021986.1
	3	<i>Pseudomonas helleri</i>	99	4e ⁻¹⁸⁰	MH119664.1
	4	<i>Pseudomonas helleri</i>	99	0.0	MH119664.1
	5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99	6e ⁻¹⁷³	KP635387.1
	6	<i>Bowmanella dokdonensis</i>	99	3e ⁻⁴¹	NR_146684.1
	7	<i>Pseudomonas sp.</i>	99	9e ⁻⁶³	KY940337.1
	8	<i>Pseudomonas fragi</i>	98	2e ⁻⁸⁶	CP021986.1
	9	<i>Pseudomonas fragi</i>	98	1e ⁻⁹⁷	CP021986.1
1 0 D I A S	10	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	0.0	MG835614.1
	11	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	0.0	MG835614.1
	12	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	0.0	MF541037.1
	13	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	0.0	MF541032.1
	14	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	3e ⁻¹⁷¹	MG835614.1
	15	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	0.0	MG835614.1
2 0 D I A S	16	<i>Clostridium sp.</i>	98	3e ⁻⁴⁰	KT630605.1
	17	<i>Bacillus sp.</i>	100	1e ⁻²⁷	MH712425.1
	18	<i>Unculture bacterium</i>	97	2e ⁻³²	KU636997.1
	19	<i>Bacillus sp.</i>	98	3e ⁻⁴⁰	KX454100.1
	20	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	4e ⁻¹⁵⁴	MG835614.1
	21	<i>Unculture bacterium</i>	98	4e ⁻⁵⁰	KU636997.1
	22	<i>Clostridium sp.</i>	98	3e ⁻⁴⁰	KT630605.1
	23	<i>Pseudomonas fragi</i>	97	2e ⁻⁵³	CP021986.1
3 0 D I A S	24	<i>Lactobacillus sakei</i>	99	1e ⁻¹³⁴	MG835614.1
	25	<i>Lactobacillus curvatus</i>	100	4e ⁻⁷¹	CP031003.1
	26	<i>Lactobacillus curvatus</i>	100	1e ⁻⁷⁶	CP031003.1
	27	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	0.0	MG835614.1
	28	<i>Lactobacillus curvatus</i>	100	1e ⁻⁷⁶	CP031003.1
	29	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	0.0	MG835614.1
	30	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	2e ⁻¹²⁶	MG835614.1

Cocolin et al., (2001), identificaron *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus curvatus*, entre otros microorganismos presentes en chorizo. Algunos de los microorganismos que a menudo predominan en el proceso de fermentación de chorizo son *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus curvatus*, y usualmente pero en menor proporción a otros lactobacillus como *Lactobacillus versmoldensis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus alimentarius*, y algunas especies correspondientes a los géneros *Weissella*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Kröckel, 2013).

Como se mencionó anteriormente, se notaron algunas diferencias en la posición, intensidad y número de bandas por efecto de la microheterogeneidad del gel 16S y co-migración de bandas (Nikolausz et al., 2005; Deng et al., 2012). Así mismo, ciertas bandas permanecieron constantes y algunas otras desaparecieron a lo largo del proceso.

Análisis digital de diversidad de especies entre las regiones V3 y V6-V8

Se llevó a cabo el análisis y comparación de los cambios en la estructura de la población mediante la visualización de los perfiles de bandeo de los DGGE obtenidos con las regiones V3 y V6-V8 del gen 16S rRNA (Figura 19).

Se estimaron los índices S, H y J, debido a que reflejan una visión general del predominio de especies dentro de las comunidades microbianas. El valor numérico del índice J (índice Pielou) adopta valores entre 0 y 1, el número 1 indica que todas las especies son igualmente abundantes y el 0 señala ausencia de uniformidad.

El valor de S muestra la riqueza de especies y el índice H muestra si las especies que se encuentran en una comunidad están representadas por un mismo número en la muestra (diversidad de especies), además de ser utilizados para calcular el índice J (Martínez-Hernández, Olguín, Gómez, & Cuervo-López, 2009). Los valores estimados se muestran en la Tabla 16.

La evaluación de la riqueza de especies (S) muestra que con los cebadores correspondientes a la región V3 se obtiene un número mayor de secuencias amplificadas que se ve reflejado en un número mayor de bandas visualizadas en comparación con el cebador V6-V8. Por lo tanto, la riqueza de especies es mayor amplificando la región V3. Respecto al índice H los valores

obtenidos con los diferentes cebadores muestran que no todas las especies que conforman la comunidad bacteriana tienen el mismo número de unidades taxonómicas, y que algunas predominan más que otras. Estos resultados son similares a los mostrados por Yu, Garcia-Gonzalez, Schanbacher, & Morrison, (2008), donde realizaron un análisis de los perfiles de bandeo obtenidos de las diferentes regiones que conforman el gen 16S rRNA en donde las regiones más recomendadas para analizar comunidades bacterianas fueron V3, seguidas de V3 - V5 y V6 - V8. Al igual que el índice S, el índice J analiza si todas las especies se encuentran representadas en la muestra, sin embargo, en el índice no es importante las especies que dominan ni el número de especies que hay, si no la uniformidad con que están distribuidos los individuos dentro de las especies (equitatividad). Con los dos pares de cebadores los valores son muy cercanos a 1 lo que demuestra que los individuos presentes se encuentran distribuidos de una manera casi uniforme entre las especies presentes lo que nos lleva a mencionar que sí existe diversidad en las muestras.

Tabla 16. Evaluación digital de los índices de la comunidad microbiana. S (riqueza de especies), H (diversidad estructural), y J (uniformidad de Pielou).

Tiempo de maduración	V3			V6-V8		
	S	H	J	S	H	J
0 d	35	3.48	0.98	14	2.52	0.96
10 d	22	3.0	0.97	12	2.46	0.99
20 d	20	2.97	0.99	12	2.44	0.98
30 d	28	3.23	0.97	7	1.92	0.98

La estimación de estos índices está basada en los perfiles del DGGE mostrados en la Figura 19, obtenidos con las regiones V3 y V6-V8.

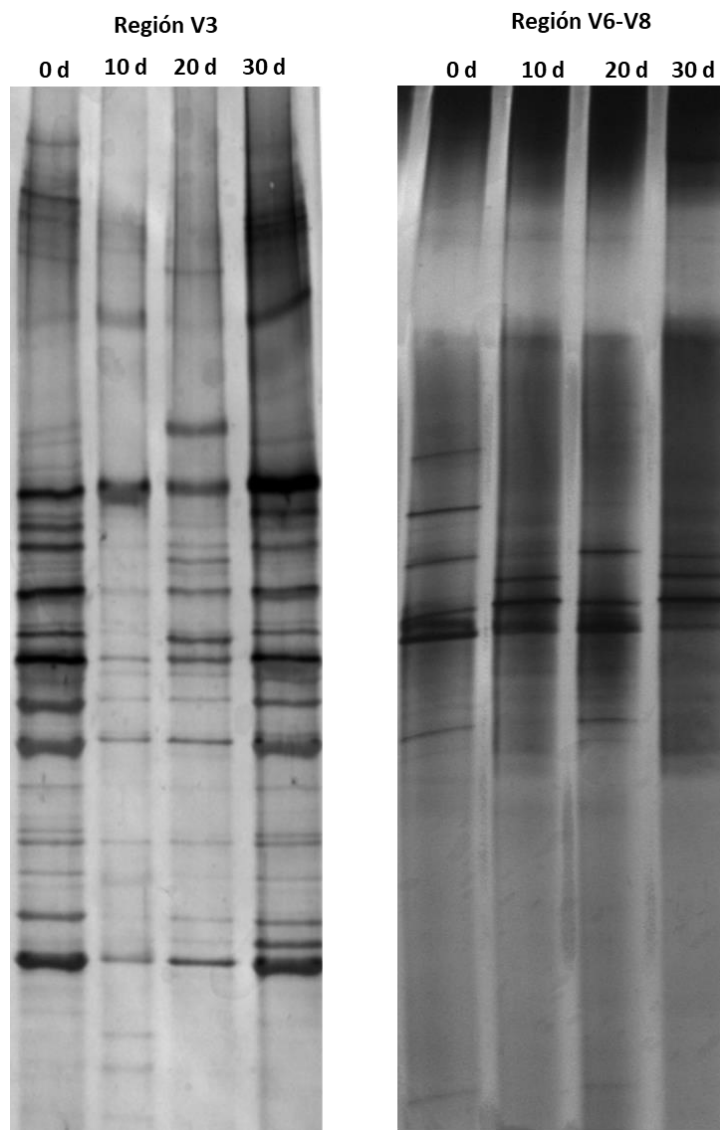


Figura 19. Perfil de bandeo obtenido de la DGGE (30-60%) de los fragmentos de ADN correspondientes a la región V3 y V6-V8. Carriles correspondientes a 0 d (pasta cárnica), 10, 20 y 30 días de maduración del chorizo tipo español.

Evaluación de la población bacteriana mediante secuenciación masiva

Debido al bajo número de microorganismos identificados por la técnica PCR-DGGE se realizó un análisis de secuenciación masiva de la pasta cárnica y de los diferentes tiempos de maduración del chorizo tipo español, con el fin de evaluar en su totalidad la diversidad y dinámica bacteriana de este producto cárnico.

El ADN total obtenido de cada uno de los tiempos analizados se envió al Instituto de Biotecnología de la UNAM, se amplificó la región V3-V4 del gen 16S rRNA y se obtuvieron productos de ~550 pb (Klindworth et al., 2013) los cuales fueron secuenciados con la tecnología de Illumina MiSeq (Illumina Inc.) en forma pareada con 300 ciclos. Se construyeron cuatro librerías independientes, cada una para cada tiempo de maduración evaluado.

Los datos de las secuencias de las muestras del chorizo tipo español se encuentran disponibles en el sitio SRA de la NCBI con los bioproyectos identificados como SAMN05785554, SAMN05785555, SAMN05785556, y SAMN05785557.

Diversidad de OTUs y análisis taxonómico.

Como resultado de la secuenciación se obtuvieron entre ~679,000 y ~868,000 secuencias pareadas para cada tiempo de maduración del chorizo tipo español. En todos los casos fue posible reconstruir fragmentos extendidos, para al menos el 90% del total de las secuencias, con una cobertura de 0.99. En la Tabla 17 se muestra el número total de los OTUs (422, 398, 390 y 428 géneros, para los cuatro diferentes tiempos) y el número de OTUs aplicando un filtro de abundancia > 0.1% (22, 18, 16 y 19 géneros, para los cuatro diferentes tiempos). En orden de magnitud estos resultados son similares a los citados por Połka, Rebecchi, Pisacane, Morelli, & Puglisi, (2015), ellos realizaron un análisis de secuenciación masiva en salami típico italiano madurado hasta por 63 días, utilizaron la tecnología de Illumina y aplicaron un filtro de abundancia del 0.1%, obteniendo 1015 cepas pertenecientes a 25 géneros, entre los cuales se encuentran a *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Pseudomonas*, etc.

Cabe mencionar que empleando el filtro de abundancia (> 0.1%), se eliminan a los géneros presentes es un 0.1% o menos, lo que representa aproximadamente el 95% de todos los géneros encontrados. Lo que conlleva a dejar fuera de los análisis al 95% del total de los géneros reportados. Motivo por el cual se decidió realizar el análisis taxonómico con la totalidad de los géneros. Se observaron entre 390 y 442 OTUs totales (sin aplicar el filtro de abundancia), estos valores se deben principalmente al alto rendimiento del método de secuenciación aplicado.

Para evaluar la diversidad de OTUs encontrados en la pasta cárnica y en los diferentes tiempos de maduración del chorizo tipo español, se llevó a cabo un análisis de diversidad de especies utilizando los índices alfa de Chao1 y Shannon. La secuenciación de alto rendimiento permitió analizar entre el 64 y el 71% de la diversidad total en las muestras de chorizo tipo español. El índice de Chao1 indica la riqueza de especies que se encuentra en cada una de las muestras. De acuerdo con este índice, la riqueza de las especies se incrementó a partir del día 10 (Tabla 17, Índice de Chao1) y fue mayor en el día 30 con un valor de 11,792.73. Por otra parte, el índice de Shannon representa la diversidad microbiana. Al determinar el índice de Shannon se observó que en el tiempo cero la equitatividad fue mayor teniendo varios géneros dominantes, a partir del día 10 el índice disminuyó de 4.4 a 3.47 y se mantuvo constante durante el tiempo restante del proceso (Tabla 17, Índice de Shannon), esto refleja que un mayor número de microorganismos pertenecen a un menor número de géneros. Dicho comportamiento tiene relación directa con los cambios fisicoquímicos que ocurrieron en la pasta, ya que los valores de pH y a_w no fueron los óptimos para favorecer el crecimiento de todas las especies presentes inicialmente en la pasta como se mostró en la Figura 9.

Tabla 17. Índices de diversidad alfa, estimados a partir de la secuenciación masiva de los diferentes tiempos de maduración del chorizo tipo español.

Atributo	Tiempo de maduración			
	0 d	10 d	20 d	30 d
Número de lecturas	679,704	868,088	857,756	817,106
OTUs observados	5174	6697	6420	7398
Chao1	6977.53	10,460.62	10,470.48	11,792.73
Shannon	4.40	3.47	3.35	3.6
Cobertura	0.9937	0.9921	0.9919	0.9901
Géneros totales ^(*)	442	398	390	428
Géneros ^(**) con abundancia > 0.1	22	18	16	19

(*) Géneros de bacterias totales detectados. (**) Géneros de bacterias detectados aplicando un filtro de abundancia del 0.1%.

Por otra parte, se realizó un análisis de diversidad beta mediante la exploración de las comunidades de especies encontradas en cada muestra, aplicando un análisis de ordenación no métrica (NDMS) para evaluar la agrupación en función del total de microorganismos encontrados en conjunto con el índice de Bray Curtis, que minimiza el efecto de los dobles ceros. El objetivo principal de los gráficos NDMS es representar la posición original de las comunidades en el espacio multidimensional con la mayor posición posible, utilizando un número reducido de dimensiones, lo que permite determinar el patrón de diferenciación entre las muestras de estudio y poder ser visualizadas fácilmente. Para graficar los NDMNS no se utilizan las abundancias absolutas de las especies es las comunidades, sino sus órdenes de rango, lo que evita problemas asociados con la distancia absoluta (también es de dónde proviene la parte no métrica mencionado en el nombre). Es un método de ordenación adecuado para los datos que no son normales o que están en una escala discontinua o arbitraria. NMDS, requiere de una matriz de distancias o de diferencias, cabe mencionar que para los estudios de ecología se utiliza el cálculo de similitud de Bray-Curtis (matriz de sitios por especies).

Este análisis nos muestra la relación de especies que hay entre las cuatro muestras analizadas, resultando en tres grupos, dos con una relación de especies diferente (0d y 20d) y un tercero conformado por dos tiempos (30d y 10d). La dispersión de la diversidad entre en el tiempo cero y los tres tiempos de maduración es mayor, la diversidad entre las muestras correspondientes a los 10 y 30 días fue menor (Figura 20).

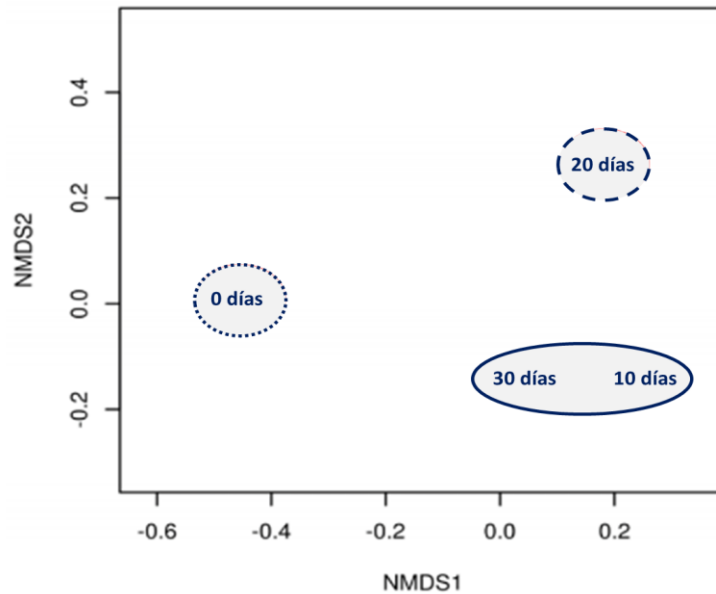


Figura 20. Distribución de la diversidad mediante un Análisis de Escala Multidimensional No Métrico (NMDS) de beta diversidad (Bray Curtis) de los OTUs al 97%, entre las muestras de chorizo tipo español.

En la Figura 21 se muestran las curvas de acumulación, conocidas como curvas de rarefacción, en las cuales se calcula el número esperado de OTUs en las muestras, permite comparar muestras biológicas de diferentes tamaños y determinar si la fuerza de muestreo fue la necesaria para identificar el número total de individuos las muestras. En este tipo de curvas se adiciona el número de especies comunes, nuevas o raras inventariadas y se relaciona con el esfuerzo de muestreo. Cabe señalar que para este estudio el número solicitado de lecturas fue de 250,000 por muestra (fuerza de muestreo). Cuanto mayor sea este esfuerzo, mayor será el número de familias, géneros o especies (OTUs) identificados y por lo tanto inventariados. Al principio de este tipo de curvas se puede observar a las especies comunes o en abundancia, por lo que la línea en el gráfico comienza en forma creciente (exponencial), a medida que sigue el muestreo se incorporan los OTUs nuevos, raros o en baja proporción, por lo que aumenta el número de especies identificadas y la pendiente sigue creciendo (a una velocidad menor) y se torna horizontal. Existen casos en donde la curva desciende a cero, teóricamente, este comportamiento determina que la fuerza de muestreo fue la necesaria para identificar en su totalidad a todos los OTUs presentes en la muestra estudiada y analizada con los métodos utilizados (Jiménez-Valverde & Hortal, 2003).

Las curvas de rarefacción obtenidas en este trabajo se muestran en la Figura 21. El eje Y está representado por el número acumulativo total de OTUs diferentes observados en las cuatro muestras (OTUs totales ~25,698) y en el eje X el número de individuos (especies) esperadas en cada uno de los tiempos. Se puede concluir que el número de lecturas realizado para cada tiempo de muestreo (250,000 lecturas) no fue suficiente para determinar el número total de OTUs debido a que la pendiente no decae, sin embargo, con el esfuerzo de muestreo realizado se logró contabilizar los OTUs más comunes y una gran mayoría de las especies nuevas o raras con un porcentaje total aproximado al 71%.

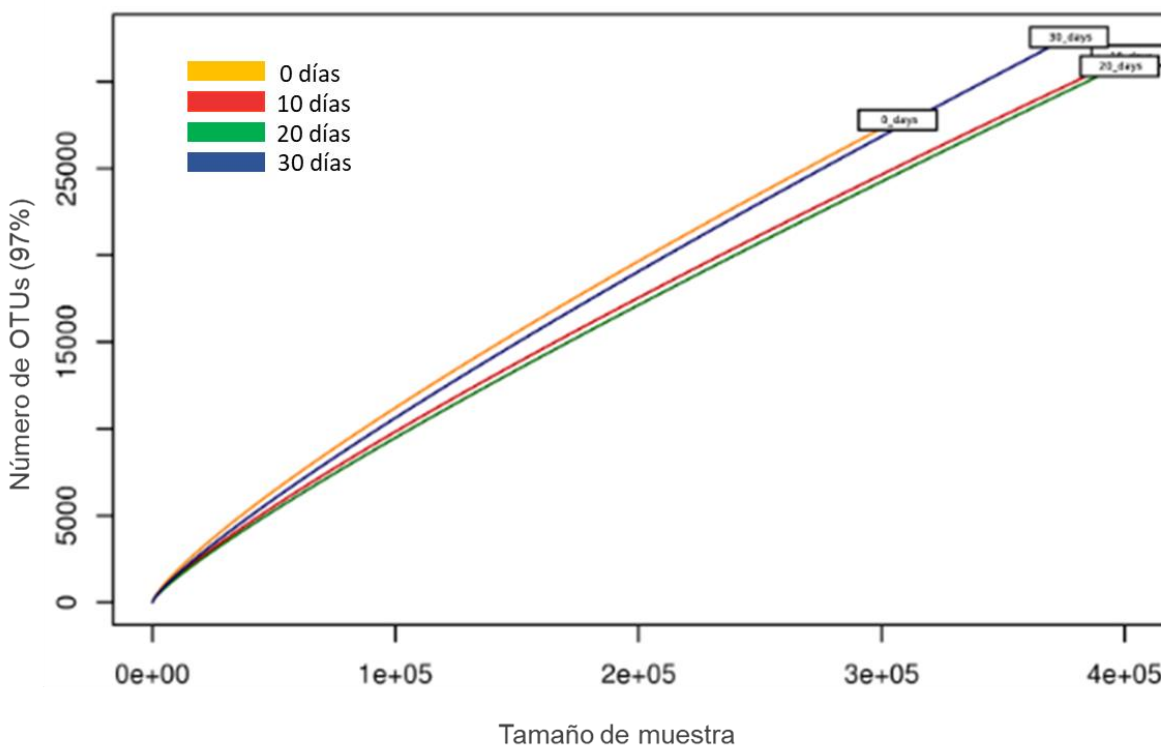


Figura 21. Curva de acumulación de especies (rarefacción).

Efecto del tiempo de maduración sobre la composición bacteriana de chorizo tipo español

Se determinaron marcadas diferencias taxonómicas entre los diferentes tiempos de maduración analizados. Los principales phyla determinados en el tiempo cero fueron Firmicutes y Proteobacterias cada uno representado en un 54.86 y 43.96%, respectivamente, conformando el 98.82% del total de la abundancia relativa (Anexo 6, Tabla de anotación taxonómica).

Después del tiempo cero, los Firmicutes aumentaron y las Proteobacterias disminuyeron; a los 10 días de maduración se observó la más alta frecuencia representada por los Firmicutes (~89%) (Figura 22A) representando a la microbiota dominante a partir de los 10 días de maduración hasta el final del proceso. En el tiempo cero la anotación taxonómica a nivel orden se caracterizó por *Enterobacteriales* y *Pseudomonadales* pertenecientes al phylum Proteobacteria (Figura 22B); y por *Bacillales* y *Lactobacillales* correspondientes al phylo Firmicutes (Figura 22C). Después de los 10 días de maduración, los *Lactobacillales* se incrementaron hasta un 90% y los *Bacillales* decrecieron un 9% de la abundancia total relativa de Firmicutes. Algunas otras órdenes observadas en menor porcentaje fueron *Alteromonadales*, *Burkholderiales*, *Enterobacteriales*, *Flavobacteriales*, *Oceanospirillales*, *Rhizobiales* y *Xanthomonadales*, entre otros, los cuales se pueden visualizar en el Grafico interactivo tipo Krona (<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0309174018304704-mmcl.zip>, Anexo 5).

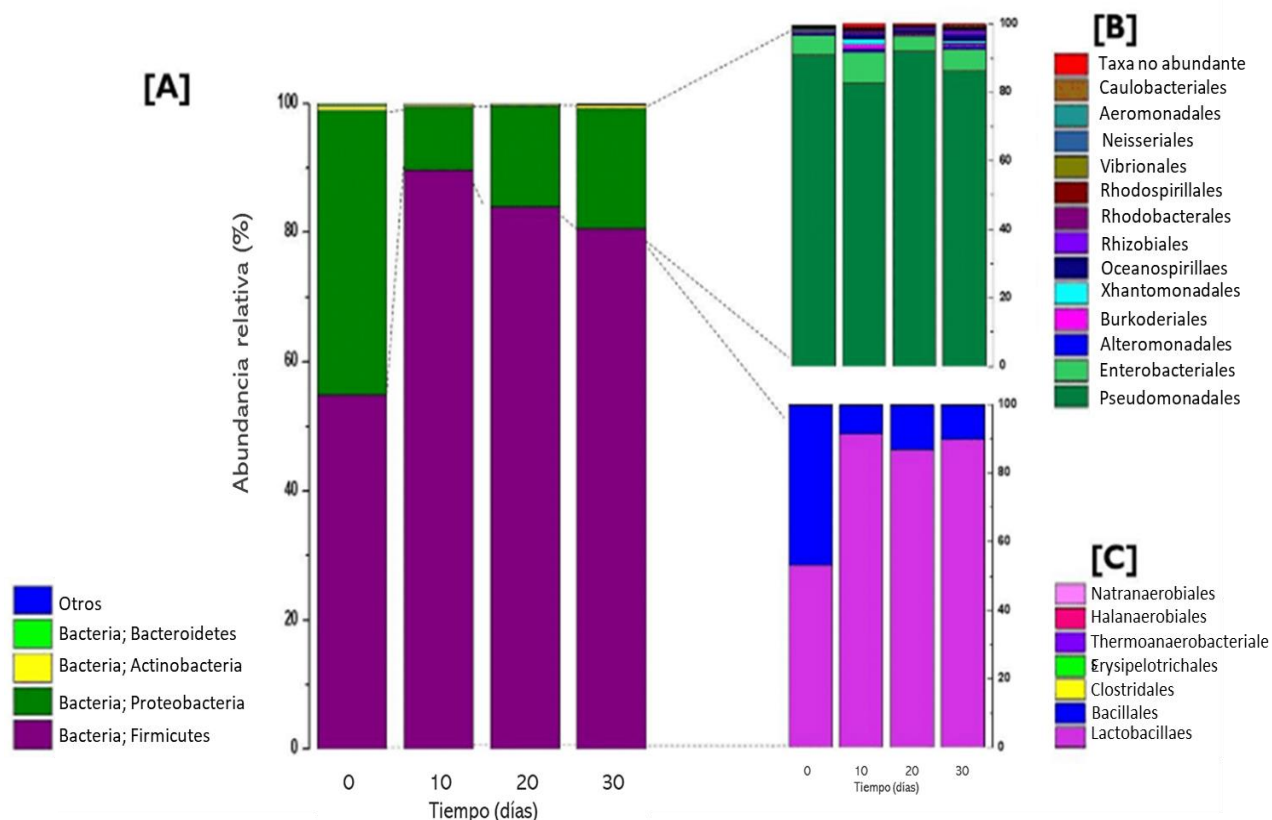


Figura 22. Abundancia relativa de la población en la pasta cárnica (0 días) y en los diferentes tiempos de maduración del chorizo tipo español (10, 20 y 30 días). **[A]** Anotación a nivel phylum. **[B]** Proteobacterias a nivel orden. **[C]** Firmicutes a nivel orden.

Dentro de los dos phyla más representativos (Firmicutes y Proteobacteria) se determinaron 538 géneros bacterianos durante el proceso de maduración, de los cuales 168 corresponden a Firmicutes y 370 a Proteobacteria. Los géneros que presentaron mayor frecuencia en el tiempo cero (Figura 23) fueron: *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Brochothrix*, géneros que frecuentemente se encuentran en productos cárnicos procesados (Jay et al., 2005; Gounadaki et al., 2009; Yang, Zhu, Zhang, Liang, & Luo, 2018). La cantidad y el tipo de microorganismos presentes en la pasta cárnica depende de diversos factores, como la higiene y manipulación de las materias primas utilizadas durante su elaboración, así como del pH, a_w , humedad y temperatura de maduración. Los géneros identificados en este trabajo son similares a los reportados por Połka et al., (2015) y por Quijada et al., (2018), encontrados en salami típico

italiano y chorizo de Castilla y León madurados hasta 65 y 30 días (respectivamente) en condiciones controladas de humedad y temperatura, algunos de los géneros de mayor abundancia encontrados en ambos estudios fueron: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Staphylococcus*. En particular la temperatura durante el proceso de maduración influye en el crecimiento de las BAL y en la velocidad de la disminución del pH. En productos cárnicos donde se utilizan temperaturas altas ($> 30^{\circ}\text{C}$) se ha observado una rápida disminución de pH, favoreciendo al crecimiento de *Pediococcus*.

Milicevic et al., (2014), reportaron una alta presencia de *L. sakei* y otros *Lactobacillus* dominantes en carnes fermentadas elaboradas en Europa y América debido a su capacidad de proliferar a bajas temperaturas y en presencia de altas concentraciones de NaCl. Sin embargo, valores de pH entre 4.8 y 5.2 y bajas temperaturas de maduración son óptimas para la actividad de algunas enzimas como las proteasas, que tienen un papel importante durante el proceso de maduración de la carne (Ockerman & Basu, 2014). Por otra parte, existen reportes en donde se menciona que los microorganismos que causan alteraciones en productos cárnicos se encuentran los géneros *Brochothrix*, *Moraxella*, y *Pseudomonas* (Cervený, Meyer, & Hall, 2009), géneros que fueron encontrados en este estudio en la pasta cárnica (tiempo cero). Al día 10 de maduración se presentó una inhibición en el crecimiento de las *Pseudomonas*, este género requiere valores de a_w y pH cercanos a 0.97 y 5.0, respectivamente (Lebert, Begot, & Lebert, 1998) y los valores de a_w y pH al día 10 fueron cercanos a 5.8 y 0.91, respectivamente.

Después del día 10, la diversidad microbiana decreció por efecto de la disminución del pH y de la a_w este cambio se presentó durante todo el proceso de maduración, esto indica una selección de la microbiota dominante, favoreciendo a los géneros más resistentes a las variaciones de los factores fisicoquímicos mencionados. Durante el proceso de maduración el género dominante fue *Lactobacillus* debido a que la disminución del pH favoreció su crecimiento alcanzando hasta un 61.9%, en cambio algunos otros géneros disminuyeron como *Acinetobacter* (4%), *Bacillus* (3%), *Brochothrix* (1%), *Pseudomonas* (3%), y *Streptococcus* (12%) (Figura 23). Cervený et al., (2009),

mencionaron que los géneros descritos anteriormente se encuentran presentes en la carne cruda como microbiota nativa, y la microbiota inicial puede ser reducida al realizar procesos adecuados de evisceración, un lavado eficaz de la piel de los animales y una rápida conservación en frío y así extender la vida útil de la carne y/o de los productos cárnicos. Por otra parte Fontana et al., (2016) reportaron que las *Pseudomonas* podrían ser parte de la microbiota de los alimentos procesados en plantas, debido a que estas bacterias tienen la habilidad de adherirse a las superficies y equipo de trabajo (Stellato, De Filippis, La Stora, & Ercolini, 2015; Stellato et al., 2017). Algunos estudios de productos cárnicos relacionados con *Pseudomonas fragi*, han revelado que su capacidad de adhesión se lleva a cabo a valores de a_w (1.0-0.97), pH (7.0-5.8) y temperatura (7-25°C), diferentes a los óptimos para su crecimiento. Esta bacteria presenta su mayor crecimiento a los 7.0°C aproximadamente (Lebert et al., 1998), lo que puede explicar la presencia de *Pseudomonas* en las muestras del tiempo cero.

Adicionalmente, el género *Leuconostoc* también fue encontrado entre la microbiota identificada como género subdominante. Existen estudios que demuestran que cepas de esta bacteria, como *Leuconostoc carnosum*, han sido aisladas de productos cárnicos fermentados y se han utilizado para la biopreservación sin causar deterioro, además pueden ayudar a mejorar la estabilidad y sabor del producto alimenticio (Jacobsen, Budde, & Koch, 2003).

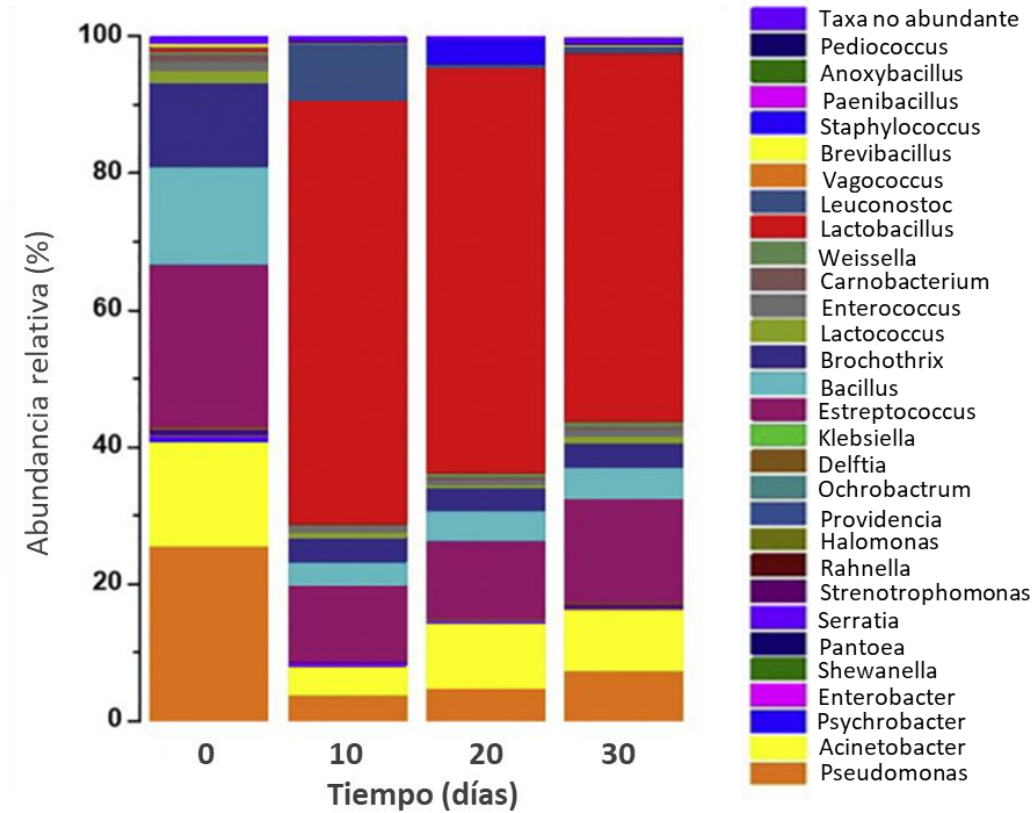


Figura 23. Abundancia relativa de la población a nivel de género en la pasta cásmica (0 días) y en los diferentes tiempos de maduración (10, 20 y 30 días).

Por otra parte, el análisis taxonómico realizado arroja 654 posibles especies dentro de las órdenes de Firmicutes y Proteobacterias, en los cuatro tiempos analizados. En el tiempo cero se observaron 365 posibles especies, número que disminuyó durante el proceso de maduración (Anexo 6, Tabla de anotación taxonómica).

El análisis de la comunidad bacteriana a nivel de especie mostró que en el tiempo cero la especie más cercana o estrechamente relacionada y en mayor abundancia fue *Streptococcus salivarius* seguida de *Acinetobacter sp.*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fragi* (Tabla 18). Se ha reportado que la población microbiana inicial depende de los parámetros que suelen permitir la contaminación, tales como los microorganismos o esporas bacterianas contenidas en la grasa y carne cruda, y por la manipulación del producto durante y después de su elaboración (Jay et al.,

2005; Iacumin, Manzano, Stella, & Comi, 2017). En particular, *Streptococcus salivarius* es esencial en la industria de productos lácteos fermentados, principalmente en la fabricación de yogurt y algunas clases de quesos, ya que forma parte del grupo de las bacterias lácticas que metabolizan la lactosa, es microorganismos es homofermentativo y produce ácido láctico, las condiciones de cultivo óptimas para *Streptococcus* son 40°C y pH de 4.5, sin embargo su presencia en el chorizo tipo español posiblemente se deba por una contaminación indirecta a pesar de esto su presencia no generó daños en el producto.

Tabla 18. Posibles cepas relacionadas con la población dominante y subdominante a nivel de especie en la pasta cárnica y en los tres tiempos del proceso de maduración del chorizo tipo español obtenidas del análisis de secuenciación masiva.

Tiempo (días)	Población dominante (> 50%)		Población subdominante (1 al 30%)	
0	<i>Streptococcus salivarius</i>	75.87	<i>Acinetobacter sp.</i>	6.41
			<i>Bacillus subtilis</i>	4.73
			<i>Pseudomona fragi</i>	4.14
			<i>Bacillus pumilus</i>	2.15
			<i>Lactococcus lactis</i>	1.36
10	<i>Lactobacillus sakei</i>	72.98	<i>Streptococcus salivarius</i>	13.39
			<i>Lactobacillus curvatus</i>	7.79
			<i>Leuconostoc carnosum</i>	2.85
20	<i>Lactobacillus sakei</i>	67.97	<i>Streptococcus salivarius</i>	21.21
			<i>Lactobacillus curvatus</i>	4.29
			<i>Acinetobacter sp.</i>	2.65
30	<i>Lactobacillus sakei</i>	57.59	<i>Streptococcus salivarius</i>	27.54
			<i>Lactobacillus curvatus</i>	6.54
			<i>Acinetobacter sp.</i>	2.12

En cuanto a la población presente durante el proceso de maduración, el género *Lactobacillus* se hizo evidente, siendo *Lactobacillus sakei* la especie que predominó a partir de los 10 días presentando un aumento significativo. Alcanzó el 72.98% de la abundancia relativa total en el tiempo 20. Esta BAL fue dominante en el proceso de maduración del chorizo tipo español y posiblemente juegue un papel importante en la fase de maduración. Estudios sobre la composición microbiana de varios tipos de chorizos fermentados revelaron la participación de las BAL, en su

mayoría *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus plantarum* y en menor medida los géneros *Pediococcus* y *Enterococcus* (Fontana et al., 2005; Cocolin et al., 2009).

La población no dominante refiere a las especies presentes en un porcentaje menor a 1% y la subdominante a aquellas especies prevalecían entre un 1 y 30%, entre las cuales se identificó a *Acinetobacter sp.* y *Pseudomonas fragi* (Tabla 18), microorganismos Gram negativos pertenecientes a las Proteobacterias, relacionadas con el deterioro de productos cárnicos conocidas como bacterias alterantes.

Cabe resaltar que la secuenciación masiva produce una gran cantidad de secuencias parciales, por lo que la certeza taxonómica se reduce y en algunos casos el resultado puede ser una sobreestimación de la diversidad (Valenzuela-González, 2015). Por tal motivo para tener una asignación taxonómica certera se amplificó e identificó el gen 16S rRNA completo, contando con una mayor precisión y reproducibilidad de las diferentes asignaciones taxonómicas anotadas.

Estudios recientes mostraron que en chorizos fermentados con cepas bacterianas (*Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus curvatus*) pueden promover la hidrólisis de lípidos además de inhibir la autooxidación, encontrando valores máximos de TBARS (~0.5 mg MDA/kg) en productos que contienen estas cepas, gracias a que presentan potencial antioxidante, además de que muestran una mejora en el desarrollo del sabor (Chen et al., 2016). Razón por la que posiblemente las concentraciones máximas de TBARS (0.41 mgMDA/kg) determinadas en este trabajo son estables a partir de los 10 días, tiempo en que aumenta la presencia de las BAL específicamente de *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus sakei*.

En general, las BAL pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos deteriorantes y patógenos pertenecientes a los géneros de *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Bacillus*, entre otros, debido a la acidificación y la producción de antimicrobianos; también ayudan a reducir las reacciones de oxidación y a proteger el color de la carne. También contribuyen en el sabor y textura de productos fermentados como resultado de las reacciones de lipólisis, proteólisis y la conversión de lactosa a citrato y productos intermedios del piruvato que se pueden convertir en

compuestos aromáticos, tales como diacetilo, acetoína, acetaldehído y ácido acético. Además, los péptidos pequeños y los aminoácidos libres pueden ser transformados en alcoholes, aldehídos, ácidos y ésteres, todos ellos responsables del perfil de sabor de carnes fermentadas (Cocconcelli, 2007). Por lo tanto, las BAL podrían ser empleadas como cultivos iniciadores para mejorar la calidad en diferentes productos cárnicos fermentados (Urso et al., 2006; Cocolin et al., 2009). importante mencionar que las BAL identificadas en este estudio juegan un papel importante durante el procesamiento del chorizo tipo español; debido a que varios estudios incluyendo el presente trabajo han demostrado el efecto que tienen las propiedades fisicoquímicas sobre el crecimiento de las BAL y la estabilidad microbiana de productos cárnicos fermentados.

11.- CONCLUSIONES

La disminución de la humedad y los cambios en los parámetros fisicoquímicos evaluados durante el proceso de maduración del chorizo tipo español fueron los esperados para garantizar la estabilidad microbiológica del producto cárnico a temperatura ambiente. Los principales cambios fisicoquímicos y microbiológicos tuvieron lugar durante los primeros 10 días de maduración, influyendo en la inhibición de bacterias alterantes de la carne.

Con la microbiología tradicional se logró cultivar y aislar por diferencias fenotípicas a las cepas de mayor abundancia y posibles responsables del proceso de maduración del chorizo tipo español. Se identificaron 12 cepas aisladas de medio MRS-VB, mediante la secuenciación completa del gen 16S rRNA, pertenecientes a los géneros *Weissella*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*, de las cuales la cepa 1101 identificada como *Pediococcus acidilactici* presentó el más alto potencial biotecnológico debido a una mayor capacidad antagónica, actividad proteolítica y lipolítica.

La diversidad obtenida mediante la técnica de DGGE, muestra a *Pseudomonas* y *Lactobacillus* como los géneros más abundantes al inicio y término del proceso de maduración, respectivamente, y se identificó a las cepas *Pseudomonas fragi*, *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus curvatus* como los más predominantes con este análisis.

Con la secuenciación masiva se logró identificar el 71% de la población total bacteriana, y los porcentajes de cada uno de los géneros presentes. Se detectaron dos principales phyla al tiempo cero, Proteobacteria (44%) y Firmicutes (55%) y después de los 10 días de maduración el phylum Firmicutes aumentó hasta en un 89% como phylum dominante, siendo *Lactobacillus* el género más representativo a partir de este tiempo, con hasta un 62% de abundancia total.

La presencia de las especies *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus acidilactici* y *Weissella thailandensis* fue confirmada con el análisis completo del gen 16S rRNA. Estas bacterias son probablemente las responsables de las características sensoriales del producto madurado. Los resultados obtenidos demostraron que las condiciones de humedad relativa (85%) y temperatura (9-11°C) controladas en el proceso de maduración, y los cambios fisicoquímicos y bioquímicos generados en los primeros 10 días, son de gran importancia para establecer la microbiota dominante durante el proceso de maduración.

12.- PERSPECTIVAS

Dentro de los experimentos derivados de este análisis que quedaron fuera del alcance de este trabajo pero que resultan de interés para conocer en su totalidad la población y el papel que hacen en el chorizo tipo español se encuentran:

Analizar la población de hongos y levaduras que tiene el chorizo tipo español mediante técnicas de secuenciación masiva, con el fin de conocer la diversidad total de bacterias, hongos y levaduras, y la abundancia de cada uno de ellos.

Llevar a cabo el análisis metabolómico de la cepa 1101 identificada como *Pediococcus acidilactici*, debido a que presentó el mayor potencial biotecnológico debido a la capacidad antagónica y actividad lipolítica y proteolítica positivas.

13. REFERENCIAS

- Adeniji, A. A., Loots, D. T., & Babalola, O. O. (2019). *Bacillus velezensis*: phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(9), 3669-3682. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09710-5>
- Aldudo, J., Bullido, M. J., & Valdivieso, F. (1999). DGGE method for the mutational analysis of the coding and proximal promoter regions of the Alzheimer's disease presenilin-1 gene: two novel mutations. *Human Mutation*, *14*(5), 433-439. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(199911\)14:5<433::AID-HUMU10>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(199911)14:5<433::AID-HUMU10>3.0.CO;2-K)
- Ambrosiadis, J., Soutos, N., Abraham, A., & Bloukas, J. G. (2004). Physicochemical, microbiological and sensory attributes for the characterization of Greek traditional sausages. *Meat Science*, *66*(2), 279-287. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(03\)00100-1](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00100-1)
- Anson, W. J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*, *25*(4), 195-203. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2008.12.009>
- AOAC. (1995). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (16th ed., Vol. 2; P. Cunniff, Ed.). Gaithersburg, Maryland, USA: AOAC International.
- AOAC. (2001). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (17th ed.; W. Horwitz, Ed.). Gaithersburg, Maryland, USA: AOAC International.
- Aquilanti, L., Santarelli, S., Silvestri, G., Osimani, A., Petruzzelli, A., & Clementi, F. (2007). The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *120*(1-2), 136-145. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.010>
- Bañón Arias, S., Martínez, A., & López, A. M. (2011). Maduración de chorizo y salchichón de Chato Murciano con diferentes cultivos iniciadores (bacterias ácido-lácticas y estafilococos). *Anales de Veterinaria de Murcia*, *27*(0), 101-118. <https://doi.org/10.6018/j/160191>
- Bengtsson-Palme, J., Hartmann, M., Eriksson, K. M., Pal, C., Thorell, K., Larsson, D. G. J., & Nilsson, R. H. (2015). METAXA2: improved identification and taxonomic classification of small and large subunit rRNA in metagenomic data. *Molecular Ecology Resources*, *15*(6), 1403-1414. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12399>
- Caetano-Anollés, G., & Triguano, R. N. (1996). Recovery of DNA Amplification Products from Silver-Stained Polyacrylamide Gels Applications in Nucleic Acid Fingerprinting and Genetic Mapping. In B. A. White, *PCR Cloning Protocols* (Vol. 67, pp. 111-128). <https://doi.org/10.1385/0-89603-483-6:111>
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, *28*(4), 281-370. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>
- Casaburi, A., Aristoy, M.-C., Cavella, S., Di Monaco, R., Ercolini, D., Toldrá, F., & Villani, F. (2007). Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. *Meat Science*, *76*(2), 295-307. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.11.011>
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, L., Holmström, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(1), 278-288. <https://doi.org/10.1128/AEM.01177-06>
- Cengiz, E., & Gokoglu, N. (2005). Changes in energy and cholesterol contents of frankfurter-type sausages with fat reduction and fat replacer addition. *Food Chemistry*, *91*(3), 443-447. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.025>
- Cervený, J., Meyer, J. D., & Hall, P. A. (2009). Microbiological Spoilage of Meat and Poultry Products. In W. H. Sperber & M. P. Doyle (Eds.), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages* (pp. 69-86). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1_3
- Chen, Q., Kong, B., Han, Q., Liu, Q., & Xu, L. (2016). The role of bacterial fermentation in the hydrolysis and oxidation of sarcoplasmic and myofibrillar proteins in Harbin dry sausages. *Meat Science*, *121*, 196-206. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.06.012>
- Cira, L. A., Huerta, S., Hall, G. M., & Shirai, K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*, *37*(12), 1359-1366. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00008-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00008-0)
- Cobos Velasco, J. E., Soto Simental, S., Alafaro Rodríguez, R., Aguirre Álvarez, G., Rodríguez Pastrana, B., & González Tenorio, R. (2014). *Evaluación de parámetros de calidad de chorizos elaborados con carne de conejo, cordero y cerdo, adicionados con fibra de trigo*. 8, 50-64.
- Cocconcelli, P. S. (2007). Chapter 13 Starter Cultures: Bacteria. In Fidel Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 137-146). Garsington Road, Oxford UK.: Blackwell Publishing.

- Cocolin, Diez, A., Urso, R., Rantsiou, K., Comi, G., Bergmaier, I., & Beimfohr, C. (2007). Optimization of conditions for profiling bacterial populations in food by culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, *120*(1-2), 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.015>
- Cocolin, Dolci, P., Rantsiou, K., Urso, R., Cantoni, C., & Comi, G. (2009). Lactic acid bacteria ecology of three traditional fermented sausages produced in the North of Italy as determined by molecular methods. *Meat Science*, *82*(1), 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.01.004>
- Cocolin, L., Dolci, P., & Rantsiou, K. (2011). Biodiversity and dynamics of meat fermentations: the contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. *Meat Science*, *89*(3), 296 - 302. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.011>
- Cocolin, Luca., Manzano, M., Cantoni, C., & Comi, G. (2001). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(11), 5113-5121. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5113-5121.2001>
- Comi, G. (2017). Spoilage of Meat and Fish. In *The Microbiological Quality of Food* (pp. 179-210). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00011-X>
- Consejo Mexicano de la Carne. Compendio estadístico 2018. (n.d.). Retrieved July 10, 2019, from <https://comecarne.org/estadisticas/>
- Daniele, A., Amaíz, L., Medina, L., & Valbuena, O. (2011). *Actividad lipolítica de Geobacillus stearothermophilus, cepa LN, aislada de las aguas termales de Las Trincheras, estado Carabobo, Venezuela*. *19*(3), 173-180.
- Deng, B., Shen, C., Shan, X., Ao, Z., Zhao, J., Shen, X., & Huang, Z. (2012). PCR-DGGE analysis on microbial communities in pit mud of cellars used for different periods of time: PCR-DGGE analysis on microbial communities in pit mud of cellars used for different periods of time. *Journal of the Institute of Brewing*, *118*(1), 120 - 126. <https://doi.org/10.1002/jib.2>
- Díaz Ruíz, G., & Wachter Rodarte, C. (2003). *Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados*. *45*, 30-40.
- Díez, B., Pedrós-Alió, C., Marsh, T. L., & Massana, R. (2001). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(7), 2942-2951. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2942-2951.2001>
- Dolci, P., Zenato, S., Pramotton, R., Barmaz, A., Alessandria, V., Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2013). Cheese surface microbiota complexity: RT-PCR-DGGE, a tool for a detailed picture? *International Journal of Food Microbiology*, *162*(1), 8-12. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.009>
- Doulgeraki, A. I., & Nychas, G.-J. E. (2013). Monitoring the succession of the biota grown on a selective medium for pseudomonads during storage of minced beef with molecular-based methods. *Food Microbiology*, *34*(1), 62 - 69. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.11.017>
- Durán-Vila, A., Zhurbenko, R., & Viera-Oramas, D. (2004). *Propuesta de una modificación en la formulación del medio agar manitol salado utilizado en el aislamiento de estafilococos de importancia clínica*. *56*(3), 172-177.
- Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, *56*(3), 297-314. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.006>
- Ercolini, D., Ferrrocino, I., La Stora, A., Mauriello, G., Gigli, S., Masi, P., & Villani, F. (2010). Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. *Food Microbiology*, *27*(1), 137 - 143. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.09.006>
- Ercolini, D., Russo, F., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., & Villani, F. (2007). Simultaneous Detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, and *P. putida* from Meat by Use of a Multiplex PCR Assay Targeting the *carA* Gene. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(7), 2354-2359. <https://doi.org/10.1128/AEM.02603-06>
- Escobar-Zepeda, A. (2016). *Análisis taxonómico y del potencial metabólico del metagenoma de queso cotija (Tesis de doctorado)*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, CDMX, México.
- Escobar-Zepeda, A., Sanchez-Flores, A., & Quirasco Baruch, M. (2016). Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology*, *57*, 116-127. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.02.004>
- Estevan-Fernández. (2013). *Estudios de mercado. El mercado del jamón y el embutido curado en México*. Retrieved from http://www.ivace.es/Internacional_Informes-Publicaciones/Pa%C3%ADses/M%C3%A9xico/M%C3%89XICOJAMONEMBUTIDOICEX2013_.pdf
- Fischer, S. G., & Lerman, L. S. (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *80*(6), 1579-1583. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.6.1579>

- Fonseca, S., Cachaldora, A., Gómez, M., Franco, I., & Carballo, J. (2013). Monitoring the bacterial population dynamics during the ripening of Galician chorizo, a traditional dry fermented Spanish sausage. *Food Microbiology*, *33*(1), 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.08.015>
- Fontana, C., Bassi, D., López, C., Pisacane, V., Otero, M. C., Puglisi, E., ... Vignolo, G. (2016). Microbial ecology involved in the ripening of naturally fermented llama meat sausages. A focus on lactobacilli diversity. *International Journal of Food Microbiology*, *236*, 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.002>
- Fontana, C., Vignolo, G., & Cocconcelli, P. S. (2005). PCR-DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages. *Journal of Microbiological Methods*, *63*(3), 254 - 263. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.010>
- García-Cano, I., Serrano-Maldonado, C. E., Olvera-García, M., Delgado-Arciniega, E., Peña-Montes, C., Mendoza-Hernández, G., & Quirasco, M. (2014). Antibacterial activity produced by Enterococcus spp. isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese. *LWT - Food Science and Technology*, *59*(1), 26 - 34. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.059>
- Gilbert, J. A., & Dupont, C. L. (2011). Microbial Metagenomics: Beyond the Genome. *Annual Review of Marine Science*, *3*(1), 347-371. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142811>
- Giraffa, G., & Neviani, E. (2001). DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, *67*(1-2), 19-34.
- Glenn, T. C. (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, *11*(5), 759 - 769. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x>
- González-Oreja, J. A., De la Fuente-Díaz-Ordaz, A. A., Hernández-Satín, L., Buzo-Franco, D., & Bonache-Regidor, C. (2010). *Evaluación de estimadores no paramétricos de la riqueza de especies. Un ejemplo con aves en áreas verdes de la ciudad de Puebla, México*. *33.1*, 31-45.
- González-Tenorio, R., Fonseca, B., Caro, I., Fernández-Diez, A., Kuri, V., Soto, S., & Mateo, J. (2013). Changes in biogenic amine levels during storage of Mexican-style soft and Spanish-style dry-ripened sausages with different aw values under modified atmosphere. *Meat Science*, *94*(3), 369-375. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.03.017>
- Gounadaki, A., Skandamis, P., & Nychas, G.-J. (2009). Fermented meats. In F. Rhea (Ed.), *Microbiology Handbook Meat Products* (Rhea Fernandes, pp. 129-146). United Kingdom: Leatherhead Food Research.
- Groth Laursen, B., Bay, L., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Swings, J., Dalgaard, P., & Leisner, J. J. (2005). Carnobacterium divergens and Carnobacterium maltaromaticum as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, *28*(2), 151 - 164. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.12.001>
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *68*(4), 669-685. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004>
- Helander, I. M., von Wright, A., & Mattila-Sandholm, T.-M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, *8*(5), 146-150. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01030-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01030-3)
- Hernández Vidal, G., Ramírez Romero, R., Rodríguez Tovar, L. E., Mora Valdez, F. A., Vidales Contreras, J. A., & Hernández Escareño, J. J. (2010). *Localización de Serratia marcescens en perfil bacteriológico y fúngico de la conjuntiva de caballos clínicamente sanos en Monterrey, Nuevo León, México*. *41*(4), 239-249.
- Houde, A., Kademi, A., & Leblanc, D. (2004). Lipases and Their Industrial Applications: An Overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *118*(1-3), 155-170. <https://doi.org/10.1385/ABAB:118:1-3:155>
- Hu, P., Zhou, G., Xu, X., Li, C., & Han, Y. (2009). Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham based on 16S rDNA-DGGE. *Food Control*, *20*(2), 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.02.007>
- Huang, X. C., Quesada, M. A., & Mathies, R. A. (1992). DNA sequencing using capillary array electrophoresis. *Analytical Chemistry*, *64*(18), 2149-2154. <https://doi.org/10.1021/ac00042a021>
- Iacumin, L., Comi, G., Cantoni, C., & Coccolin, L. (2006). Molecular and technological characterization of Staphylococcus xylosus isolated from naturally fermented Italian sausages by RAPD, Rep-PCR and Sau-PCR analysis. *Meat Science*, *74*(2), 281-288. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.03.020>
- Iacumin, L., Manzano, M., Stella, S., & Comi, G. (2017). Fate of the microbial population and the physico-chemical parameters of “Sanganel” a typical blood sausages of the Friuli, a north-east region of Italy. *Food Microbiology*, *63*, 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.034>
- Jacobsen, T., Budde, B. B., & Koch, A. G. (2003). Application of Leuconostoc carnosum for biopreservation of cooked meat products. *Journal of Applied Microbiology*, *95*(2), 242-249. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01970.x>
- James, C. S. (1995). *Analytical Chemistry of Foods*. Springer-Science+Business Media, B.V.

- Janda, K. (2005). The lipolytic activity of *Thermomyces lanuginosus* strains isolated from different natural sources. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *55*(2), 149-152. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.09.003>
- Jay, J., Loessner, M., & Golden, D. A. (2005). *Modern Food Microbiology* (7th ed.). New York: Springer.
- Jiménez-Valverde, A., & Hortal, J. (2003). *Las curvas de acumulación de especies y la necesidad de evaluar la calidad de los inventarios biológicos*. *8*, 151-161.
- Kergourlay, G., Taminiou, B., Daube, G., & Champomier Vergès, M.-C. (2015). Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. *International Journal of Food Microbiology*, *213*, 31 - 39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.010>
- 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-e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Koo, O.-K., Baker, C. A., Kim, H.-J., Park, S. H., & Ricke, S. C. (2016). Metagenomic assessment of the microbial diversity in ground pork products from markets in the North Central Region of South Korea. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, *51*(9), 622 - 627. <https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1181910>
- Kröckel, L. (2013). The Role of Lactic Acid Bacteria in Safety and Flavour Development of Meat and Meat Products. In J. M. Kongo (Ed.), *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. <https://doi.org/10.5772/51117>
- Kuri, V., Madden, R. H., & Collins, M. A. (1996). Hygienic Quality of Raw Pork and Chorizo (Raw Pork Sausage) on Retail Sale in Mexico City. *Journal of Food Protection*, *59*(2), 141-145. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.2.141>
- Lebert, I., Begot, C., & Lebert, A. (1998). Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8-7.0), water activity (0.97-1.00) and temperature (7-25 °C). *International Journal of Food Microbiology*, *39*(1-2), 53-60. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00116-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00116-5)
- Li, W., & Godzik, A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, *22*(13), 1658-1659. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>
- Liu, Q., Guo, Y., Li, J., Long, J., Zhang, B., & Shyr, Y. (2012). Steps to ensure accuracy in genotype and SNP calling from Illumina sequencing data. *BMC Genomics*, *13 Suppl 8*, S8. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-S8-S8>
- Llorente-Bousquets, A., Pérez-Munguía, S., & Farrés, A. (2008). Novel extracellular proteolytic activity in *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Canadian Journal of Microbiology*, *54*(8), 694-699. <https://doi.org/10.1139/W08-055>
- Lopes, D. B., Fraga, L. P., Fleuri, L. F., & Macedo, G. A. (2011). Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately? *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, *31*(3), 603 - 613. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000300009>
- Lou, J., & González-Oreja, J. A. (2012). *Midiendo la diversidad biológica: más allá del índice de Shannon*. *56*(1-2), 3-14.
- Lücke, F.-K. (1994). Fermented meat products. *Food Research International*, *27*(3), 299-307. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(94\)90098-1](https://doi.org/10.1016/0963-9969(94)90098-1)
- Magoč, T., & Salzberg, S. L. (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, *27*(21), 2957-2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- Marcos, B., Aymerich, T., Dolores Guardia, M., & Garriga, M. (2007). Assessment of high hydrostatic pressure and starter culture on the quality properties of low-acid fermented sausages. *Meat Science*, *76*(1), 46 - 53. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.09.020>
- Mardis, E. R. (2008). *The impact of next-generation sequencing technology on genetics*. *24*(3), 133 - 141. <https://doi.org/doi:10.1016/tlg.2007.12.007>
- Martínez-Hernández, S., Olguín, E. J., Gómez, J., & Cuervo-López, F. de M. (2009). Acetate Enhances the Specific Consumption Rate of Toluene Under Denitrifying Conditions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *57*(4), 679-687. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9321-z>
- Martín-Juárez, B. (2005). *Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares. Estandarización, seguridad y mejora tecnológica*. Universidad de Girona, Girona, España.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, *8*(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2014). Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLoS Computational Biology*, *10*(4), e1003531. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003531>
- Mendoza-Revilla, J. (2012). *Aportes de la filogenética a la investigación médica*. *23*(2), 119-127.
- Merle Farinos, H., & Ferriol Molina, M. (2008). *Aportación al conocimiento de los melojares relictos de Quercus pyrenaica de la Sierra de Espadán (Castellón, España)*. *29*, 125-128.
- Michu, E. (2007). *A short guide to phylogeny reconstruction*. *53*(10), 442-446.

- Milicevic, B., Danilovic, B., Zdolec, N., Kozachinski, Dobranic, & Savic, D. (2014). Microbiota of the fermented sausages: influence on product quality and safety. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, *20*, 1061-1078.
- Molin, G., & Ternström, A. (1982). Numerical Taxonomy of Psychrotrophic Pseudomonads. *Microbiology*, *128*(6), 1249-1264. <https://doi.org/10.1099/00221287-128-6-1249>
- Montville, T. J., & Chen, Y. (1998). Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *50*(5), 511-519. <https://doi.org/10.1007/s002530051328>
- Moreno, C. E. (2001). *Métodos para medir la biodiversidad. Manuales y Tesis. SEA*. (Vol. 1). Retrieved from <http://entomologia.rediris.es/sea/manytes/metodos.pdf>
- Muyzer, G., de Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, *59*(3), 695-700.
- Myers, R. M., Fischer, S. G., Lerman, L. S., & Maniatis, T. (1985). Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, *13*(9), 3131-3145. <https://doi.org/10.1093/nar/13.9.3131>
- Najjari, A., Ouzari, H., Boudabous, A., & Zagorec, M. (2008). *Method for reliable isolation of Lactobacillus sakei strains originating from Tunisian seafood and meat products*. *121*, 342 - 351. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.045>
- Nikolausz, M., Sipos, R., Révész, S., Székely, A., & Márialigeti, K. (2005). Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. *FEMS Microbiology Letters*, *244*(2), 385 - 390. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.013>
- Norma Oficial Mexicana NOM-145-SAA1-1995, Productos cárnicos troceados y curados. Productos cárnicos curados y madurados. Disposiciones y especificaciones sanitarias. (n.d.). Retrieved July 5, 2019, from <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/145ssa15.html>
- Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. (n.d.). Retrieved July 10, 2019, from <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/213ssa102.html>
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaird, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., ... Backhaus, H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, *178*(19), 5636-5643. <https://doi.org/10.1128/jb.178.19.5636-5643.1996>
- Ockerman, H. W., & Basu, L. (2014). Production and Consumption of Fermented Meat Products. In Fidel Toldrá, Y. H. Hui, I. Astiasarán, J. G. Sebranek, & R. Talon (Eds.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 7 - 11). <https://doi.org/10.1002/9781118522653.ch2>
- Ordóñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M., & Hoz, L. de la. (1999). Changes in the Components of Dry-Fermented Sausages during Ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *39*(4), 329 - 367. <https://doi.org/10.1080/10408699991279204>
- Ortiz-Estrada, Á. M., Martínez-Porchas, M., & Vargas-Albore, F. (2017). La secuencia completa del gen arn ribosomal 16s, una promesa para mejorar la precisión en la asignación taxonómica microbiana. In M. L. Arena Ortíz & X. Chiappa Carrara (Eds.), *Microbiología Ambiental en México. Diagnóstico, tendencias en investigación y áreas de oportunidad*. (Primera, pp. 50-62). Mérida, Yucatán, México: UNAM-CONACYT.
- Osborn, A. M., Moore, E. R., & Timmis, K. N. (2000). An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, *2*(1), 39-50.
- Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., & Olsen, G. J. (1986). The Analysis of Natural Microbial Populations by Ribosomal RNA Sequences. In K. C. Marshall (Ed.), *Advances in Microbial Ecology* (Vol. 9, pp. 1-55). https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0611-6_1
- Parra-Huertas, R. A. (2010). *Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos*. *8*(1), 93-105.
- Petruzzi, L., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2017). Microbial Spoilage of Foods. In *The Microbiological Quality of Food* (pp. 1-21). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00002-9>
- Pořka, J., Rebecchi, A., Pisacane, V., Morelli, L., & Puglisi, E. (2015). Bacterial diversity in typical Italian salami at different ripening stages as revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons. *Food Microbiology*, *46*, 342-356. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.023>
- Quijada, N. M., De Filippis, F., Sanz, J. J., García-Fernández, M. del C., Rodríguez-Lázaro, D., Ercolini, D., & Hernández, M. (2018). Different *Lactobacillus* populations dominate in "Chorizo de León" manufacturing performed in different production plants. *Food Microbiology*, *70*, 94-102. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.009>

- Ramírez-Ramírez, J. C. R., Ulloa, P. R., Velázquez, M. Y., Ulloa, J. A., & Romero, F. A. (2011). *Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud*. (7), 16.
- Rantsiou, K., Urso, R., Dolci, P., Comi, G., & Cocolin, L. (2008). Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. *International Journal of Food Microbiology*, *126*(1-2), 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.031>
- Rantsiou, K., Urso, R., Iacumin, L., Cantoni, C., Cattaneo, P., Comi, G., & Cocolin, L. (2005). Culture-Dependent and -Independent Methods To Investigate the Microbial Ecology of Italian Fermented Sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(4), 1977-1986. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1977-1986.2005>
- Rodríguez-Santiago, B., & Armengol, L. (2012). Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnóstico Prenatal*, *23*(2), 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.diapre.2012.02.001>
- Rodríguez-Vicente, A. K. (2017). *Análisis de la microbiota bacteriana presente en la nariz y la faringe de una población de adultos jóvenes sanos del sur de la Ciudad de México*. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, CDMX, México.
- Rojano, B. A., Gaviria, C. A., & Sáez, J. A. (2018). *Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el isoespintanol*. *15*(2), 2012-2018.
- Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., ... Bustillo, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, *475*(7356), 348-352. <https://doi.org/10.1038/nature10242>
- Saha, A., & Santra, S. C. (2014). *Isolation and characterization of bacteria isolated from municipal solid waste for production of industrial enzymes and waste degradation*. *1*(1), 9-12. <https://doi.org/10.15406/jmen.2014.01.00003>
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, *94*(3), 441-448. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(12), 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sanger, Frederick. (1988). Sequences, Sequences, and Sequences. *Annual Review of Biochemistry*, *57*(1), 1 - 29. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.000245>
- Sanguinetti, C. J., Dias Neto, E., & Simpson, A. J. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques*, *17*(5), 914-921.
- Shihata, A., & Shah, N. P. (2000). Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, *10*(5-6), 401-408. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00072-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00072-8)
- Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., ... Hood, L. E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, *321*(6071), 674-679. <https://doi.org/10.1038/321674a0>
- Sonco-Suri, R. (2013). *Estudio de la diversidad alfa (α) y beta (β) en tres localidades de un bosque montano en la región de Madidi, La Paz-Bolivia* (Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía). Retrieved from http://www.mobot.org/PDFs/research/madidi/Sonco_2013_Thesis.pdf
- Steele, K. S., Weber, M. J., Boyle, E. A. E., Hunt, M. C., Lobaton-Sulabo, A. S., Cundith, C., ... Roenbaugh, T. L. (2016). Shelf life of fresh meat products under LED or fluorescent lighting. *Meat Science*, *117*, 75 - 84. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.02.032>
- Stellato, G., De Filippis, F., La Stora, A., & Ercolini, D. (2015). Coexistence of Lactic Acid Bacteria and Potential Spoilage Microbiota in a Dairy Processing Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(22), 7893 - 7904. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-15>
- 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>
- Tabanelli, G., Montanari, C., Grazia, L., Lanciotti, R., & Gardini, F. (2013). Effects of a(w) packaging time and atmosphere composition on aroma profile, biogenic amine content and microbiological features of dry fermented sausages. *Meat Science*, *94*(2), 177-186. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.01.018>
- Temmerman, R., Huys, G., & Swings, J. (2004). Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science & Technology*, *15*(7-8), 348-359. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.12.007>
- Toldrá, Fidel. (2017). Chapter 9 The Storage and Preservation of Meat: III-Meat Processing. In F. Rhea (Ed.), *Microbiology Handbook Meat Products* (pp. 265-296). Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100694-8.00009-1>
- Toldrá, & Hui, Y. H. (2014). Dry-Fermented Sausages and Ripened Meats: An Overview. In F. Toldrá, Y. H. Hui, I. Astiasarán, J. G. Sebranek, & R. Talon (Eds.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 1 - 6). <https://doi.org/10.1002/9781118522653.ch1>

- Urso, R., Comi, G., & Cocolin, L. (2006). Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: isolation, identification and molecular characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(8), 671 - 680. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2006.01.012>
- Valenzuela-González, F. (2015). The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297-313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
- van Leerdam, R. C., Bonilla-Salinas, M., de Bok, F. A. M., Bruning, H., Lens, P. N. L., Stams, A. J. M., & Janssen, A. J. H. (2008). Anaerobic methanethiol degradation and methanogenic community analysis in an alkaline (pH 10) biological process for liquefied petroleum gas desulfurization. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(4), 691 - 701. <https://doi.org/10.1002/bit.21933>
- Vázquez M, S. M., Suárez M, H., & Zapata B, S. (2009). *Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido-lácticas en la conservación de la carne*. 36(1), 64-71.
- Vázquez-Euán, R., Vargas-Albores, F., Martínez-Córdoba, L. R., & Martínez-Porchas, M. (2016). Metagenómica como herramienta para el estudio de comunidades microbianas en diversas disciplinas agropecuarias. In M. Arena Ortíz & X. Chiapa Carrara (Eds.), *Microbiología Ambiental en México* (pp. 186-199). UNAM-CONACYT.
- Wang, T., Zhao, L., Sun, Y., Ren, F., Chen, S., Zhang, H., & Guo, H. (2016). Changes in the microbiota of lamb packaged in a vacuum and in modified atmospheres during chilled storage analysed by high-throughput sequencing. *Meat Science*, 121, 253-260. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.06.021>
- Wenjiao, F., Yongkui, Z., Yunchuan, C., Junxiu, S., & Yuwen, Y. (2014). TBARS predictive models of pork sausages stored at different temperatures. *Meat Science*, 96(1), 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.06.025>
- Wójciak, K. M., & Dolatowski, Z. J. (2016). Evaluation of natural preservatives in combination with acid whey for use in fermented sausage. *Scientia Agricola*, 73(2), 125-133. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0087>
- Wooley, J. C., Godzik, A., & Friedberg, I. (2010). A Primer on Metagenomics. *PLoS Computational Biology*, 6(2), e1000667. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000667>
- Yang, X., Zhu, L., Zhang, Y., Liang, R., & Luo, X. (2018). Microbial community dynamics analysis by high-throughput sequencing in chilled beef longissimus steaks packaged under modified atmospheres. *Meat Science*, 141, 94 - 102. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.03.010>
- Yarza, P., Ludwig, W., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K.-H., Glöckner, F. O., & Rosselló-Móra, R. (2010). Update of the All-Species Living Tree Project based on 16S and 23S rRNA sequence analyses. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(6), 291-299. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.08.001>
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., ··· Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 635-645. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>
- Yu, Z., García-González, R., Schanbacher, F. L., & Morrison, M. (2008). Evaluations of Different Hypervariable Regions of Archaeal 16S rRNA Genes in Profiling of Methanogens by Archaea-Specific PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3), 889-893. <https://doi.org/10.1128/AEM.00684-07>
- Yu, Z., & Morrison, M. (2004). Comparisons of Different Hypervariable Regions of rrs Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4800-4806. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4800-4806.2004>

14.- ANEXOS

Anexo 1.- Preparación de medios

Agar caseína

Reactivo	g/L
Agar bacteriológico	15
Leche descremada (skin milk)	15

- 1.- Disolver el agar en 500 mL de agua.
- 2.- Disolver la leche descremada en 500 mL de agua destilada.
- 3.- Esterilizar el agar (121°C, 15 min) y la leche (121°C, 5 min) por separado.
- 4.- Atemperar durante algunos minutos y mezclar las dos soluciones en condiciones asépticas.
- 5.- Adicionar el medio en las cajas de Petri en condiciones asépticas y dejar gelificar.

Agar tributirina

Reactivo	(g/L)
Bactotripton	10
Extracto de levadura	5
Cloruro de sodio	10
Agar bacteriológico	

Reactivo	(mL/L)
Tributirina	10
Solución de glucosa al 20%	15

- 1.- Disolver en agua destilada y estéril la cantidad necesaria de glucosa para preparar una solución al 20%.
- 2.- En 900 mL de agua destilada adicionar y disolver la bactotripton, el extracto de levadura, el cloruro de sodio y la tributirina, ajustar el pH a 7.5.
- 3.- Emulsificar de 2 a 3 min la solución con un ultraturrax a velocidad baja.

- 4.- Adicionar el agar bacteriológico y disolver.
- 5.- Esterilizar en autoclave (121°C - 15 min).
- 6.- Atemperar y adicionar la glucosa previamente esterilizada por filtración.
- 7.- Plaquear y dejar gelificar.

Agar CGB (Caseína-Glucosa-Broth)

Reactivo	(g/L)
Peptona biotriptasa	20
Glucosa	10
Extracto de levadura	5
Citrato de amonio	2
Fosfato disódico	2
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Agar	20
Reactivo	(mL/L)
Tween 80	1

- 1.- Disolver las sales en 500 mL de agua destilada.
- 2.- Agregar y disolver el agar.
- 3.- Ajustar pH 7.0
- 4.- Esterilizar durante 15 minutos a 121°C.
- 5.- Vaciar en placas de Petri y dejar gelificar durante 20 minutos aproximadamente.

Anexo 2.- Análisis digital de geles

Curva de calibración de escala de grises

El análisis digitalizado de las imágenes de DGGE se llevó a cabo utilizando el programa Image J, calibrando distancia y la escala de grises con una tableta con 19 tonos.

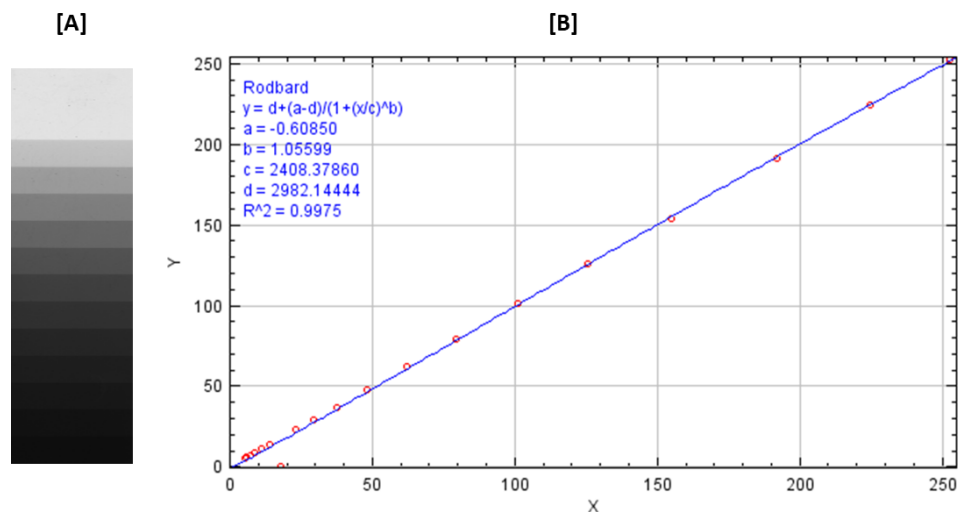


Figura 24. [A] Tableta de tonalidades de grises. [B] Curva de calibración.

Anexo 3.- Procedimiento para la secuenciación con tecnología Illumina.

1. Extracción de ADN genómico total de la muestra.
2. Fragmentación del ADN genómico.
 - a. Sonicación
 - b. Nebulización
 - c. Enzimática
3. Obtención de fragmentos de ~300 pb con extremos romos.
4. Complementación con adeninas para hacer extremos cohesivos.
5. Preparación de los fragmentos de ADN cohesivos, colocando adaptadores en los extremos de los fragmentos de ADN.
6. En un soporte sólido con adaptadores complementarios, se unen los fragmentos por complementariedad.

7. El adaptador superior se une a otro adaptador mediante la formación de un puente.
8. Adición de nucleótidos y de nucleótidos marcados con un fluoróforo y de la enzima polimerasa.
9. Síntesis de la cadena complementaria mediante la PCR puente.
10. Al incorporarse un nucleótido marcado a la cadena complementaria, PCR se detiene.
11. Ciclo de desnaturalización.
12. Toma de microfotografía para captar la señal fluorescente del nucleótido marcado.
13. Liberación de la hebra que se desnaturalizó (hebra vertical).
14. Liberación del fluoróforo.
15. Con las hebras de ADN que quedan ligadas al soporte, se vuelve a llevar a cabo la PCR puente con otro adaptador.
16. Se repite el proceso de la PCR puente hasta formar una agrupación de secuencias adaptadas a la placa (cluster).
17. Ensamble.

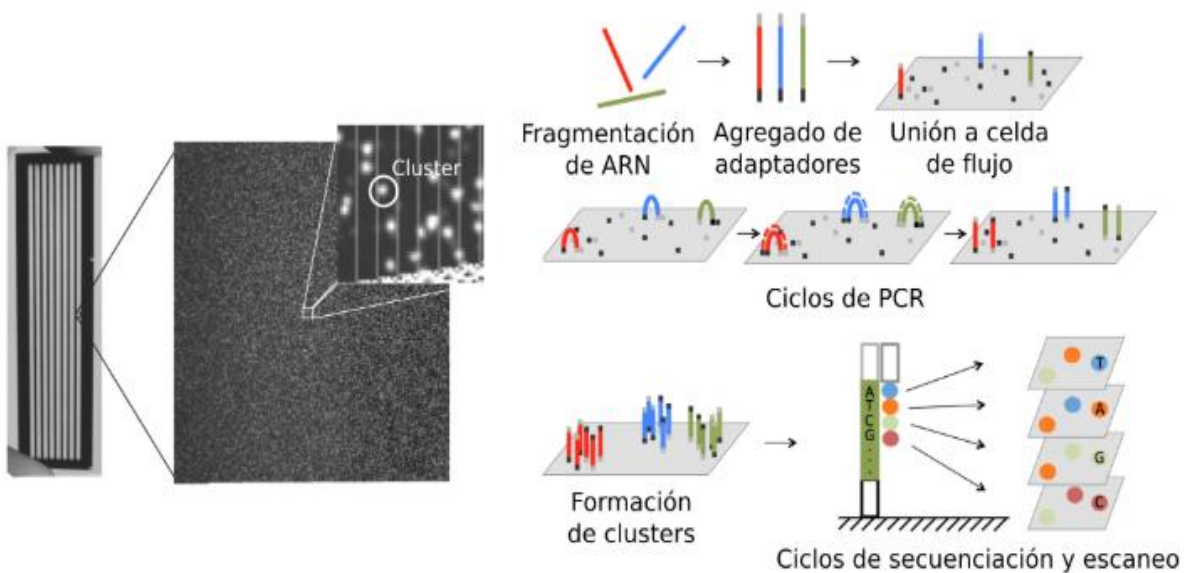


Figura 25. Representación de la técnica de secuenciación utilizando la tecnología de Illumina (imagen tomada de <https://leandroroser.github.io>).

Anexo 4.- Reporte de calidad de la secuenciación masiva

El reporte de calidad de secuenciación (Phred quality score), correspondiente a las lecturas RNA-Seq secuenciadas con tecnología Illumina, es un conjunto de análisis que muestra diversos aspectos de calidad de las secuencias totales de cada muestra.

En la Figura 26 [A, B, C y D], se muestran los diagramas Per base Sequence Quality para cada uno de los tiempos analizados. Los diagramas muestran una descripción general del rango de valores de calidad de cada uno de los nucleótidos que forman la secuencia en cada una de sus posiciones. La línea central roja es el valor de la mediana, la caja amarilla representa el rango de inter-cuartiles comprendidos entre el 25 y 75%, las líneas superiores e inferiores muestran el 10 y el 90% de los puntos y la línea azul representa la calidad media. En el eje Y se muestra el valor de calidad (valor Q), este eje se divide en tres zonas, en función de la calidad, buena calidad (verde), calidad razonable (naranja) y baja calidad (rojo), y en el eje X la posición de la lectura.

Para los cuatro diferentes tiempos se observó que la mayoría de las bases cae en la zona de mayor calidad con un valor de Q mayor a 28. A partir de la posición 200 - 250 algunas de las secuencias tienen un valor de Q menor a 26 lo que indica que la secuenciación en esas posiciones es poco confiable. En las últimas posiciones de cada gráfico (280 - 290) el decaimiento de calidad es aún más visible ya que algunas de las secuencias tienen una Q cercana a seis con una baja calidad, en particular en los diagramas en sentido 3 la calidad se ve más afectada. La disminución de la calidad al final de cada diagrama es un fenómeno común que se presenta conforme avanza la secuenciación debido a que los cebadores se van separando y al daño que sufre el ADN por la exposición al laser, principalmente cuando se analizan secuencias muy largas, como es el caso.

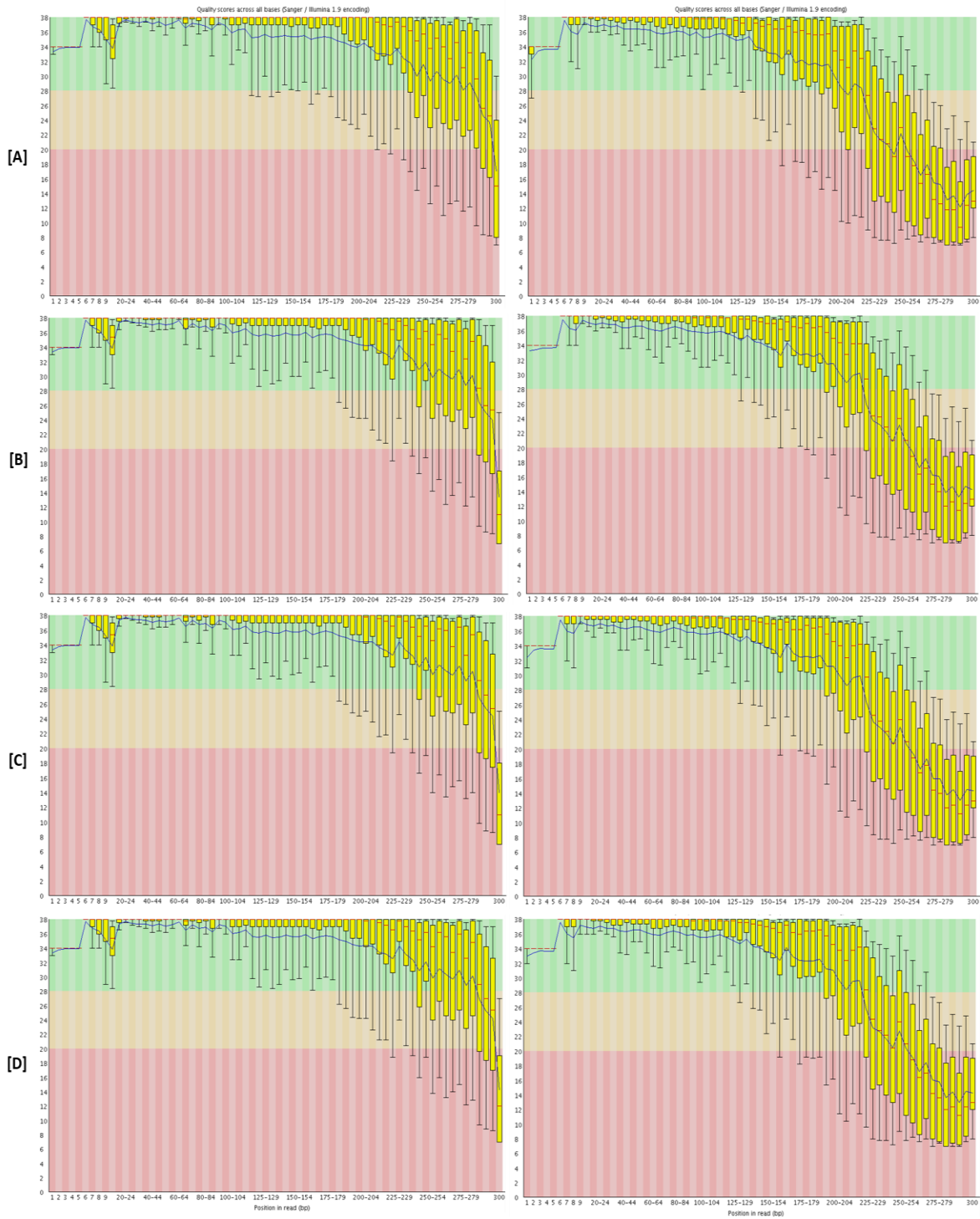


Figura 26. Diagramas Per Base Sequence Quality para las secuencias obtenidas de los diferentes tiempos de maduración del chorizo tipo español. **[A]** Pasta cárnica (tiempo cero). **[B]** 10 días. **[C]** 20 días. **[D]** 30 días de maduración.

En cuanto a la frecuencia y distribución de los nucleótidos en las secuencias, la cantidad relativa de cada base refleja su proporción en el metagenoma. En términos generales se observan múltiples picos, por lo tanto, no se puede estimar el porcentaje que existe de cada uno de los nucleótidos (Figura 27), debido a que se están estudiando pocas secuencias, se necesitarían aproximadamente 25,000 para observar la separación de las líneas horizontales: T (roja), C (azul), A (verde) y G (negra).

Por otra parte, a distribución del contenido de GC en la población total de las lecturas para cada una de las muestras analizadas, se muestra en la Figura 28. La curva azul muestra la distribución teórica en el contenido de GC de todas las lecturas de cada muestra, las cuales deben de formar una distribución normal con el pico de la curva en el contenido medio de GC para el organismo secuenciado. Para los cuatro tiempos se observó que no se ajustan al 100% a la distribución normal idealizada, debido a que el estudio se realizó sobre un conjunto de microorganismos heterogéneo, por lo que no se tiene un contenido idéntico de GC para cada integrante. Sin embargo, de forma general, el contenido de CG se encuentra dentro de un rango del 50 al 60% con un valor medio del 52%. Conforme avanza el tiempo de maduración, la distribución de GC se ajusta más a la teórica esto comparado con la pasta cárnica en donde se tiene una mayor diversidad de microorganismos. El contenido de GC de algunas especies de diversos géneros son: género *Lactobacillus* del 31 - 49%, *Pediococcus* alrededor del 37%, *Leuconostoc* 34.5%, *Streptococcus* 35.7 - 39.7%, *Enterococcus* 37.5% y *Pseudomonas* 50.5 - 66.6% (Klaenhammer y col., 2005; Kwan y col., 2006; Pfeiler y Klaenhammer, 2007; Silby y col., 2011).

Finalmente, en la Figura 29 se encuentran los gráficos de Sequence Length Distribution, muestran la distribución del tamaño de los fragmentos analizados. Para los cuatro tiempos todas las secuencias muestran una sola longitud correspondiente a 300 pb por lo que no se tiene ninguna señal de advertencia, o de error dado que es diferente a cero.

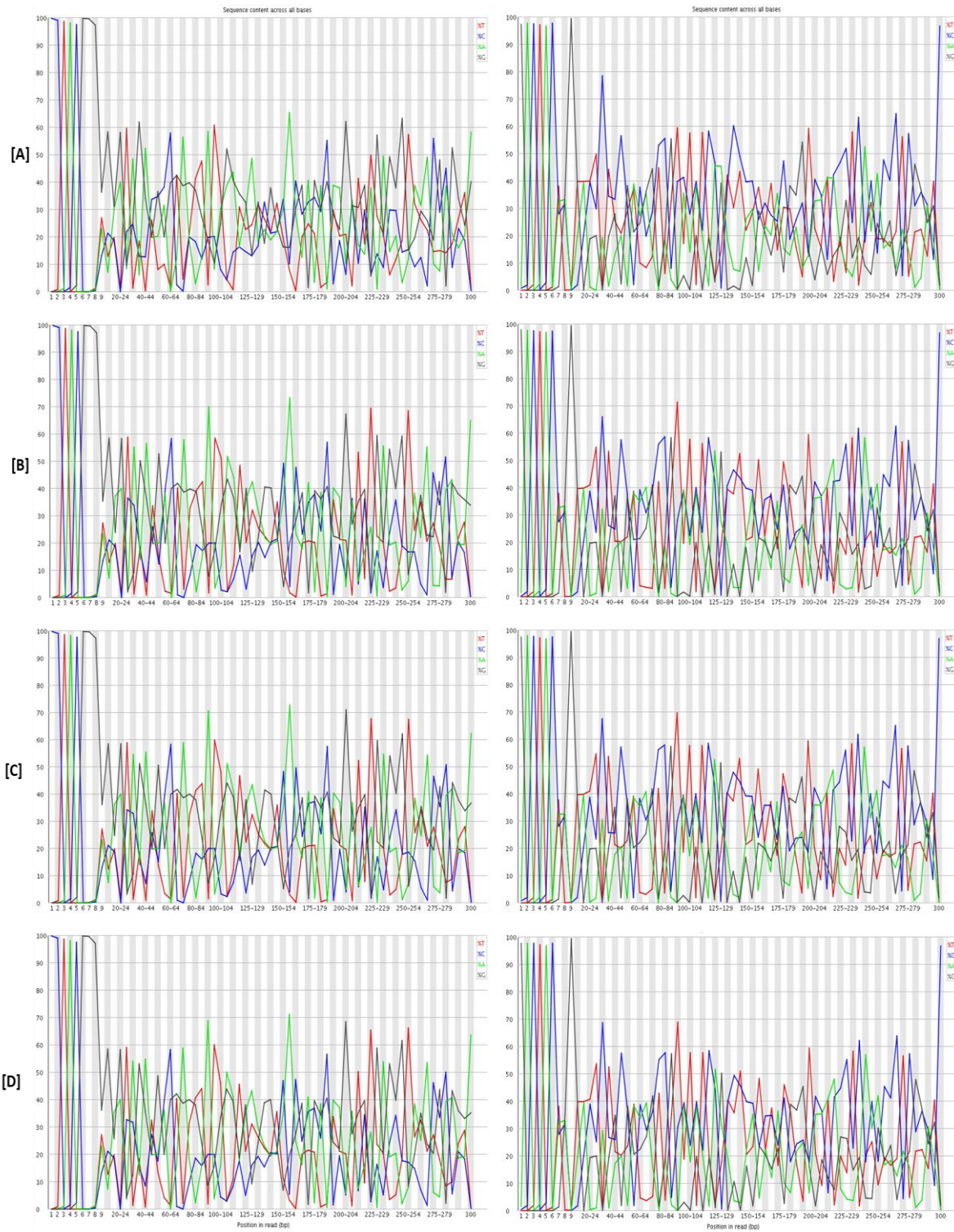


Figura 27. Diagramas Per Base Sequence Content para las secuencias obtenidas de los diferentes tiempos de maduraci3n del chorizo tipo español. **[A]** Pasta cárnica (tiempo cero). **[B]** 10 días. **[C]** 20 días. **[D]** 30 días de maduraci3n.

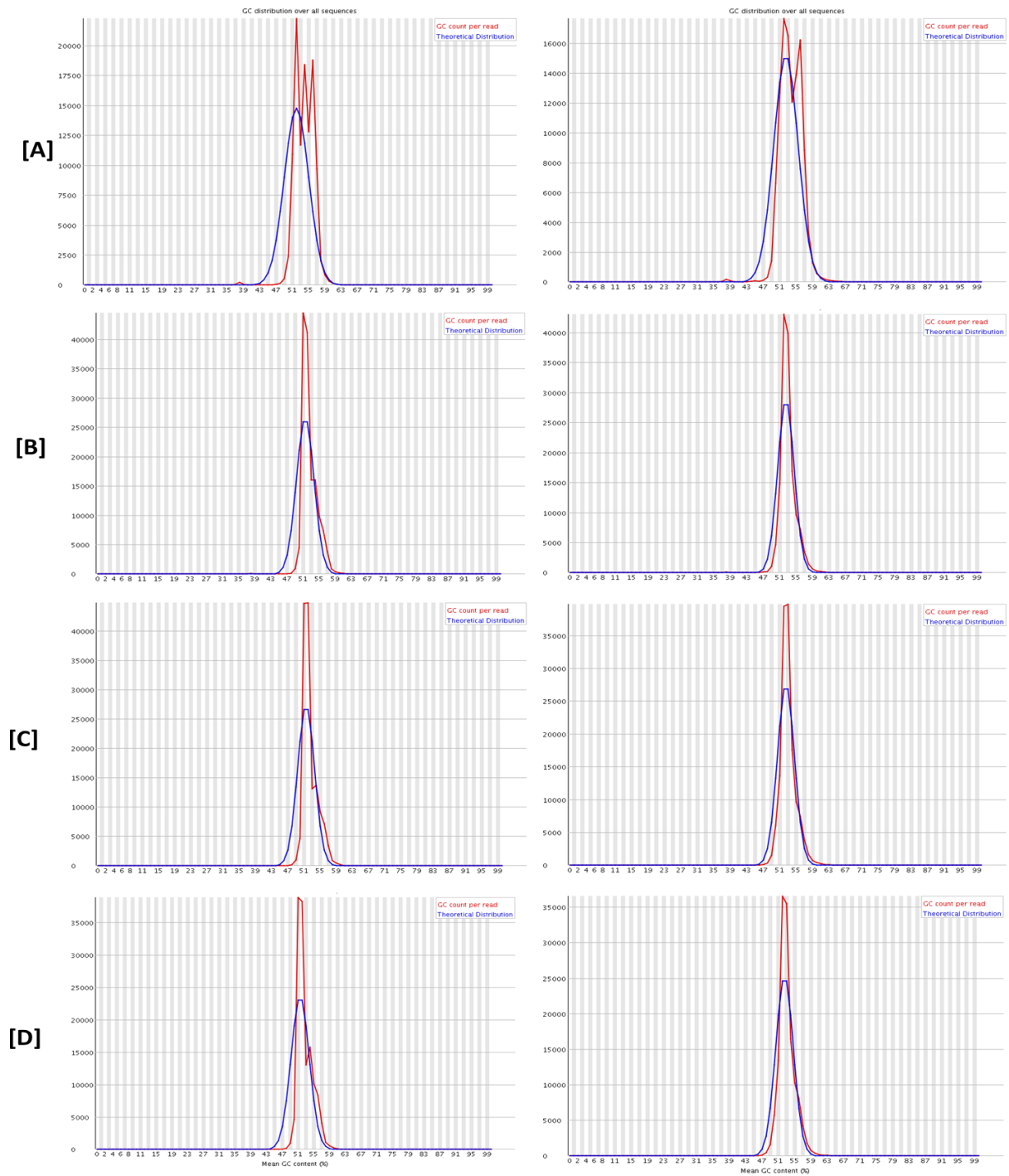


Figura 28. Diagramas Per Sequence GC Content para las secuencias obtenidas de los diferentes tiempos de maduración del chorizo tipo español. **[A]** Pasta cármica (tiempo cero). **[B]** 10 días. **[C]** 20 días. **[D]** 30 días de maduración.

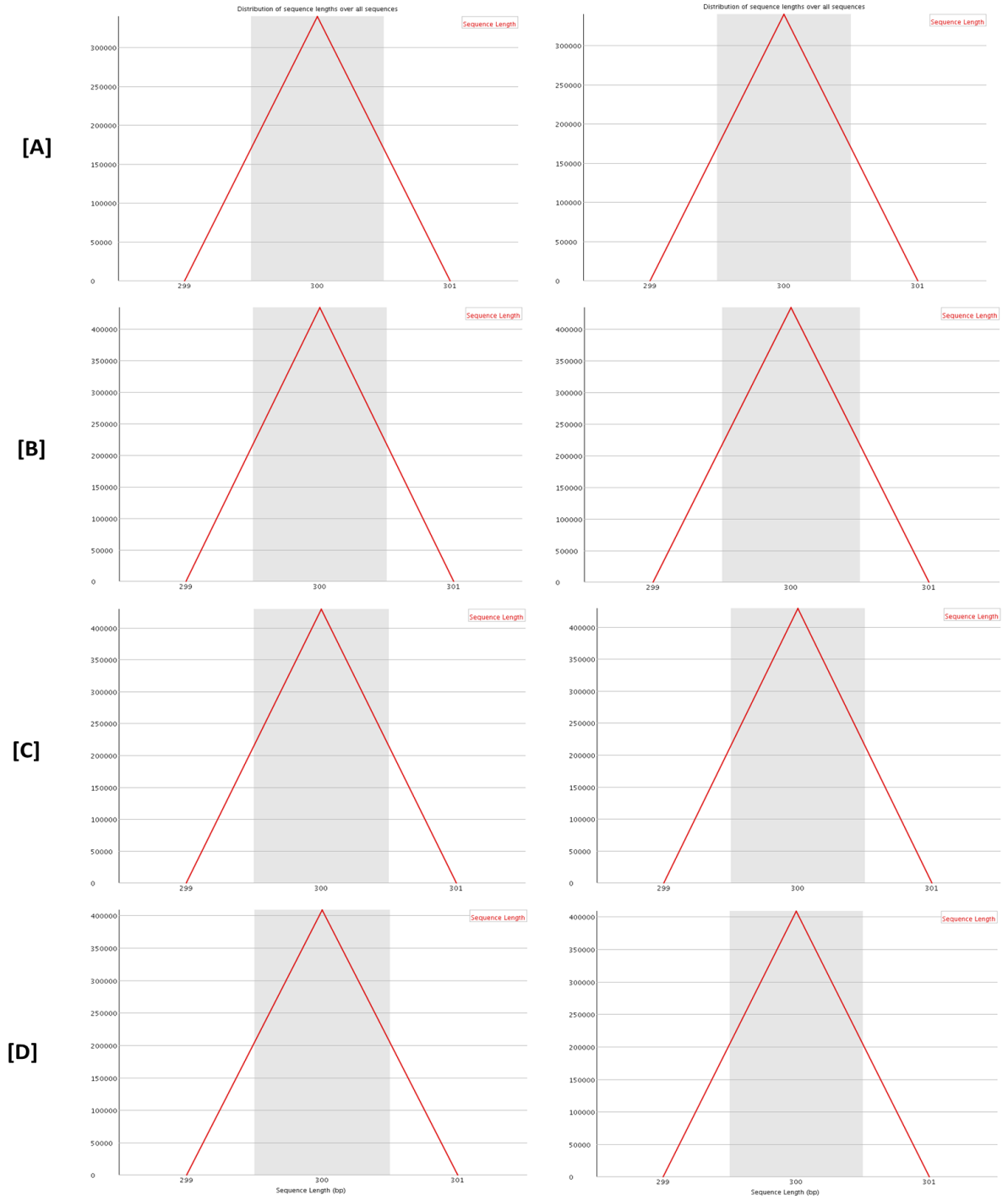


Figura 29. Diagramas Sequence Length Distribution para las secuencias obtenidas de los diferentes tiempos de maduración del chorizo tipo español. **[A]** Pasta cárnica (tiempo cero). **[B]** 10 días. **[C]** 20 días. **[D]** 30 días de maduración.

Anexo 5.- Gráfico interactivo tipo Krona

Los gráficos interactivos se generaron con el programa Metaxa2 a partir de las tablas de anotación taxonómica a nivel de phylum, orden, género y especie (Anexo 6), obtenidos de las muestras del chorizo tipo español (0, 10, 20 y 30 días). Este tipo de gráficos circulares de múltiples capas y acercamientos permite explorar cada uno de los grupos seleccionados con su abundancia relativa, pasando de dominio a género y especie, con su porcentaje correspondiente. La visualización completa de los gráficos interactivos Krona se encuentra en la siguiente liga: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0309174018304704-mmc1.zip>

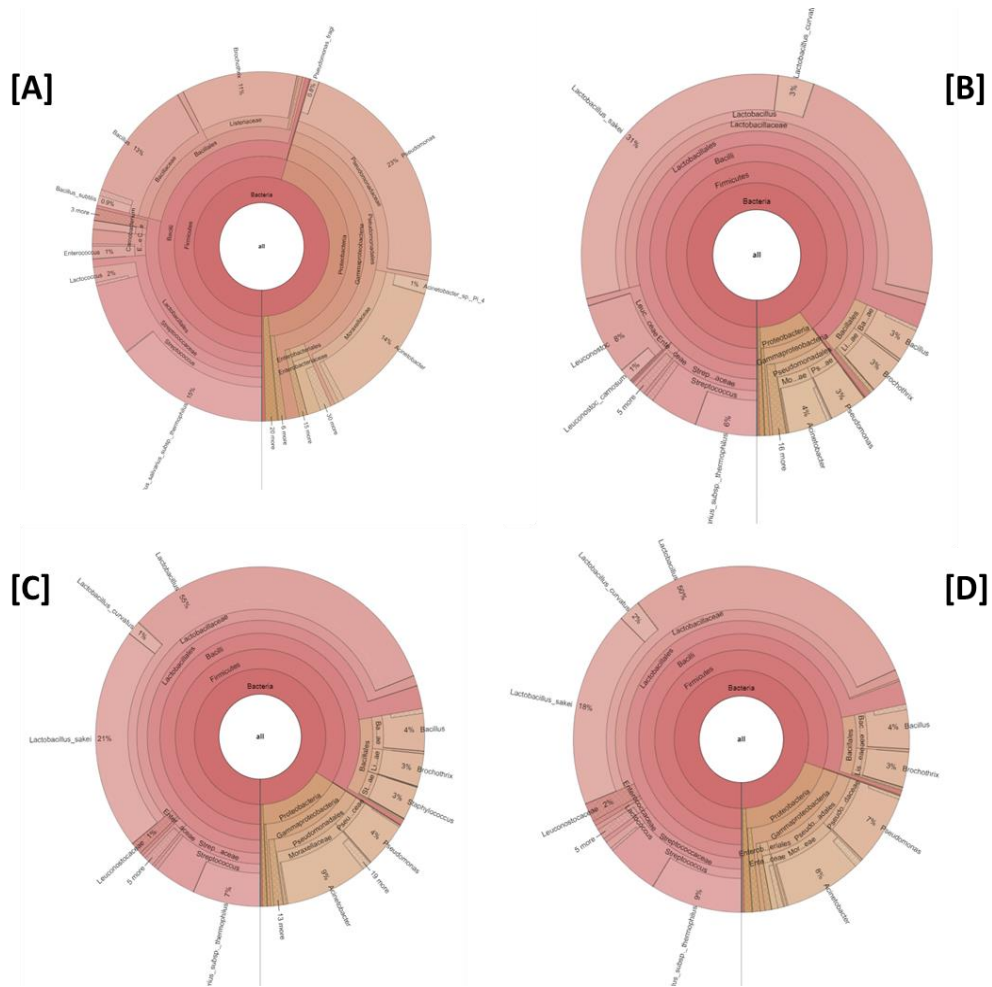


Figura 30. Imágenes tomadas de los gráficos interactivos (Krona) de las muestras del chorizo tipo español. **[A]** Pasta cárnica (tiempo cero). **[B]** 10 días. **[C]** 20 días. **[D]** 30 días de maduración.

Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Psychrobacter	Psychrobacter_sp._Nj-69	6	0,009075	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_sp._LPPA_221	6	0,009075	4	0,002101	2	0,001430	5	0,003705
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Wohlfahrtiimonas	Koukoulia_aurantiaca	6	0,009075	1	0,000525	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Curtobacterium	Curtobacterium_flaccumfaciens	5	0,007562	2	0,001050	1	0,000715	2	0,001482
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_idriensis	5	0,007562	6	0,003151	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_sp._EN5	5	0,007562	1	0,000525	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_sp._G5-6b	5	0,007562	3	0,001576	5	0,003576	2	0,001482
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Leuconostocaceae	Fructobacillus	Fructobacillus_tropaeoli	5	0,007562	0	0,000000	2	0,001430	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Leuconostocaceae	Leuconostoc	Leuconostoc_fallax	5	0,007562	1	0,000525	1	0,000715	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	Streptococcus_thermophilus_LMD-9	5	0,007562	2	0,001050	7	0,005006	3	0,002223
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Aeromonas	Pseudomonas_putida	5	0,007562	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Morganella	Morganella_morganii	5	0,007562	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_alkaliterris	4	0,006050	0	0,000000	1	0,000715	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_amyloliquefaciens_XH7	4	0,006050	0	0,000000	1	0,000715	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_carboniphilus	4	0,006050	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus	Paenibacillus_sp._CH-3	4	0,006050	1	0,000525	1	0,000715	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus	Enterococcus_durans	4	0,006050	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_delbrueckii_subsp._bulgaricus	4	0,006050	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Lactococcus	Lactococcus_sp._0905C15	4	0,006050	14	0,007353	2	0,001430	19	0,014080
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	Streptococcus_mutans	4	0,006050	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobium	Rhizobium_larrymoorei	4	0,006050	3	0,001576	7	0,005006	14	0,010375
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Alcaligenes	Bordetella_sp._J7	4	0,006050	1	0,000525	1	0,000715	1	0,000741
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Aeromonas	Aeromonas_salmonicida	4	0,006050	0	0,000000	2	0,001430	1	0,000741
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella	Klebsiella_pneumoniae	4	0,006050	7	0,003677	2	0,001430	3	0,002223
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	Methylocaldum	Methylococcaceae_bacterium_OS5014	4	0,006050	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Acinetobacter_xiamenensis	4	0,006050	4	0,002101	5	0,003576	2	0,001482
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_oryzihabitans	4	0,006050	0	0,000000	3	0,002145	3	0,002223
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_sp._SMB11	4	0,006050	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	Corynebacterium_durum	3	0,004537	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Brevibacteriaceae	Brevibacterium	Brevibacterium_sp._JC43	3	0,004537	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Leeuwenhoekella	Leeuwenhoekella_blandensis_MED2	3	0,004537	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Myroides	Myroides_odoratimimus	3	0,004537	2	0,001050	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Anoxybacillus	Bacillaceae_bacterium_NS1-3	3	0,004537	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_sp._HM06-10	3	0,004537	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Geobacillus	Geobacillus_stearothermophilus	3	0,004537	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Listeriaceae	Brochothrix	Brochothrix_campestris	3	0,004537	1	0,000525	1	0,000715	2	0,001482
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Aerococcaceae	Eremococcus	Aerosphaera_tetra	3	0,004537	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Aerococcaceae	Facklamia	Facklamia_tabacinasalis	3	0,004537	0	0,000000	1	0,000715	1	0,000741
Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	Gemmata	Gemmata_sp._Br1-2	3	0,004537	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	SAR11_clade	Surface_1	Candidatus_Pelagibacter	Candidatus_Pelagibacter_ubique	3	0,004537	7	0,003677	6	0,004291	3	0,002223
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Pseudorhodiferax	beta_proteobacterium_OR-189	3	0,004537	5	0,002626	0	0,000000	6	0,004446
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Proteus	Proteus_mirabilis	3	0,004537	3	0,001576	0	0,000000	2	0,001482
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Acinetobacter_sp._KSL5401-022	3	0,004537	2	0,001050	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Serratia_sp._E98a	3	0,004537	0	0,000000	1	0,000715	5	0,003705
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_jessenii	3	0,004537	2	0,001050	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_sp._4-9	3	0,004537	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000

Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Halomonas	bacterium_YCG11	2	0,003025	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Acinetobacter_baumannii_OIFC032	2	0,003025	3	0,001576	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Acinetobacter_calcoacetikus	2	0,003025	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Acinetobacter_sp_5-4	2	0,003025	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Acinetobacter_sp_CD-4	2	0,003025	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Acinetobacter_sp_LMG_V90	2	0,003025	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Moraxella	Moraxella_sp_0408225	2	0,003025	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Agrobacterium_agile	2	0,003025	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_denitrificans	2	0,003025	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_plecoglossicida	2	0,003025	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_sp_E7	2	0,003025	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	Corynebacterium_simulans	1	0,001512	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	Corynebacterium_sp_Coryn-1	1	0,001512	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	Corynebacterium_variabile_DSM_447	1	0,001512	5	0,002626	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Nocardiaceae	Rhodococcus	Rhodococcus_erythropolis	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Frankiales	Acidothermaceae	Acidothermus	Acidothermus_cellulolyticus_11B	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Kineospiriales	Kineosporiaceae	Quadrisphaera	Cellulomonas_sp_NII-1013	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Brevibacteriaceae	Brevibacterium	Brevibacterium_epidermidis	1	0,001512	0	0,000000	1	0,000715	1	0,000741
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Brevibacteriaceae	Brevibacterium	Brevibacterium_sp_2C6-41	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Microbacterium	Microbacterium_sp_BK-15	1	0,001512	0	0,000000	1	0,000715	1	0,000741
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Pseudoclavibacter	Pseudoclavibacter_helvolus	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	4	0,002964
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Arthrobacter	Arthrobacter_sp_248	1	0,001512	3	0,001576	1	0,000715	1	0,000741
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Arthrobacter	Arthrobacter_sp_SH-61B	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Arthrobacter	Arthrobacter_woluwensis	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Kocuria	Kocuria_varians	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Promicromonosporac	Cellulosimicrobium_	Cellulosimicrobium_cellulans	1	0,001512	1	0,000525	2	0,001430	3	0,002223
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Pseudonocardiales	Pseudonocardiaceae	Actinomycetospora	Actinomycetospora_corticicola	1	0,001512	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Streptomycetales	Streptomycetaceae	Streptomyces	Streptomyces_sp_RV15	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae	Atopobium	Atopobium_minutum	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	6	0,004446
Bacteria	Actinobacteria	Thermoleophilia	Gaiellales	Gaiellaceae	Gaiella	Gaiella_occulta	1	0,001512	1	0,000525	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Thermoleophilia	Solirubrobacterales	Solirubrobacteraceae	Solirubrobacter	Solirubrobacter_pauli	1	0,001512	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Dysgonomonas	Dysgonomonas_capnocytophagoides	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Chryseobacterium	Chryseobacterium_sp_HMD1043	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Chryseobacterium	Chryseobacterium_sp_p20H	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Elizabethkingia	Elizabethkingia_meningoseptica	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	Flavobacterium_sp_DM1	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Pedobacter	Pedobacter_ginsengisoli	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Anaerobacillus	Bacillus_sp_oral_taxon_F26	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_amyloliquefaciens_LL3	1	0,001512	0	0,000000	3	0,002145	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_atrophaeus_1942	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_megaterium	1	0,001512	1	0,000525	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_methylotrophicus	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_pseudofirmus	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_safensis	1	0,001512	1	0,000525	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_sp_19495	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_sp_A-5A	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000

Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Trabulsiella	Cronobacter_sp_crA1	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Yersinia	Serratia_sp_GIST-WP4w1	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Yersinia	Yersinia_kristensenii	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Yersinia	Yersinia_ruckeri	1	0,001512	0	0,000000	1	0,000715	2	0,001482
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Halomonas	Halomonas_sp_L10	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Kushneria	Kushneria_aurantia	1	0,001512	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Acinetobacter_sp.	1	0,001512	0	0,000000	1	0,000715	2	0,001482
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Acinetobacter_sp_3C_8	1	0,001512	0	0,000000	1	0,000715	1	0,000741
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Acinetobacter_sp_An9	1	0,001512	0	0,000000	2	0,001430	3	0,002223
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Acinetobacter_sp_G30	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Acinetobacter_sp_IGCAR-9/07	1	0,001512	2	0,001050	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Acinetobacter_sp_OTUC6	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	bacterium_OC5	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Enhydrobacter	Moraxella_osloensis	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Psychrobacter	Psychrobacter_cryohalolentis_K5	1	0,001512	0	0,000000	1	0,000715	1	0,000741
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Psychrobacter	Psychrobacter_psychrophilus	1	0,001512	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Psychrobacter	Psychrobacter_sp_20	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Psychrobacter	Psychrobacter_urativorans	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Cenchrus_americanus	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	3	0,002223
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Proteus_mirabilis	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_aeruginosa	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_cichorii	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_poaie	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_sp_23jan04	1	0,001512	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_sp_6A18S4	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_sp_7065	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_sp_AZ22R11	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_sp_B3	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_sp_BM5	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_sp_Ch10048	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_sp_DZQ5	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_sp_G12.1	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_sp_New10529	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_sp_SF1	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_sp_SK-1-3-1	1	0,001512	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_sp_SOD-3	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_stutzeri	1	0,001512	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_thiervalensis	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	2	0,001482
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_tolaasii	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	bacterium_TLCL5	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Vibrio	lobster_gut_bacterium_ABHa2	1	0,001512	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Ignatzschineria	swine_effluent_bacterium_CHNDP41	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Lysobacter	Luteimonas_sp_BZ92r	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	Stenotrophomonas_sp_S2	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema	Treponema_sp_T	1	0,001512	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	Actinomyces	Actinomyces_massiliensis	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000

Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium	Bifidobacterium_thermophilum	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	Corynebacterium_flavescens	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	Corynebacterium_glutamicum	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	Corynebacterium_matruchotii_ATCC_0	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	Corynebacterium_nuruki_S6-4	0	0,000000	0	0,000000	2	0,001430	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	Corynebacterium_sputi	0	0,000000	0	0,000000	4	0,002861	1	0,000741
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	Corynebacterium_suicordis	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	Corynebacterium_xerosis	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	3	0,002223
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Dietziaceae	Dietzia	Dietzia_sp._M1T8B24	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Frankiales	Frankiaceae	Frankia	Kaistibacter_ginsenosidimutans	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Brevibacteriaceae	Brevibacterium	Brevibacterium_oceani	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Brevibacteriaceae	Brevibacterium	Brevibacterium_sp._NCCP-68	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Dermabacteraceae	Brachybacterium	Brachybacterium_fresconis	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Dermatophilaceae	Kineosphaera	Kineosphaera_limosa	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Microbacterium	Microbacterium_oxydans	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Okibacterium	Okibacterium_fritillariae	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Arthrobacter	Arthrobacter_agilis	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Arthrobacter	Arthrobacter_creatinolyticus	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Arthrobacter	Arthrobacter_sp.	0	0,000000	1	0,000525	1	0,000715	1	0,000741
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Arthrobacter	Arthrobacter_sp._346	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Arthrobacter	Arthrobacter_sp._KOPRI_25804	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Arthrobacter	Arthrobacter_sp._R-36708	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Kocuria	Kocuria_kristinae	0	0,000000	2	0,001050	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Kocuria	Kocuria_palustris	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Kocuria	Kocuria_rhizophila	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	5	0,003705
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Micrococcus	Micrococcus_sp._PSSH2	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Nesterenkonia	Nesterenkonia_sp._AC84	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Rothia	Rothia_sp._LH-CAB6	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	2	0,001482
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Ruaniaceae	Ruania	Ruania_albidiflava	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Streptomycetales	Streptomycetaceae	Streptomyces	Streptomyces_thermoatroviridis	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Streptosporangiales	Thermomonosporaceae	Thermomonospora	Thermomonospora_curvata	0	0,000000	2	0,001050	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides	Bacteroides_pyogenes	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	2	0,001482
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas	Porphyromonas_endodontalis	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Chryseobacterium	Chryseobacterium_hominis	0	0,000000	2	0,001050	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Empedobacter	Empedobacter_sp._F-Fue-04TIIa	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	Flavobacterium_antarcticum	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Myroides	Myroides_pelagicus	0	0,000000	0	0,000000	2	0,001430	0	0,000000
Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	bacterium	bacterium_SM9-19	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Wautersiella	Wautersiella_falsenii	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Wautersiella	Wautersiella_sp._M1T8B12	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	3	0,002223
Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Olivibacter	Flavobacterium_sp._Xb-5	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	2	0,001482
Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Pedobacter	Pedobacter_sp._PX8b_S1	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium	Sphingobacterium_bambusae	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	19	0,014080
Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium	Sphingobacterium_multivorum	0	0,000000	2	0,001050	0	0,000000	2	0,001482
Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium	Sphingobacterium_sp._WS_4556	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	7	0,005187
Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium	bacterium_1B1a	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741

Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium	bacterium_BYJ5-1	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Alicyclobacillaceae	Alicyclobacillus	Alicyclobacillus_pohliae	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_amyloliquefaciens_IT-45	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_amyloliquefaciens_subsp_pl	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_cereus	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_coahuilensis_m4-4	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_decolorationis	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_horneckiae	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_mojavensis	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_niabensis	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_oleronius	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	2	0,001482
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_pseudocaliphilus	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_sp_A1-2	0	0,000000	2	0,001050	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_sp_B5-4b	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_sp_DM-1	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_sp_EBL3-7	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	2	0,001482
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_sp_HME7618	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_sp_IPON6	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_sp_JSM_081004	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_sp_SAFN-006	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_sp_SGb27	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_subtilis_subsp_subtilis_str_	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	bacterium_Te36A	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Calditerricola	Calditerricola_satsumensis	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Geomicrobium	haloalkaliphilic_bacterium_EMB1	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Halalkalibacillus	Halalkalibacillus_sp_B3A	0	0,000000	1	0,000525	2	0,001430	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Halolactibacillus	Halolactibacillus_miurensis	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Paucisalibacillus	Paucisalibacillus_globulus	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Virgibacillus	Virgibacillus_sp_12	0	0,000000	2	0,001050	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Virgibacillus	Virgibacillus_sp_WS_4627	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus	Paenibacillus_mucilaginosus	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus	Paenibacillus_sp_HDDMM03	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus	Paenibacillus_sp_PG5SR2	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Saccharibacillus	Paenibacillus_sp_C10	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	Jeotgalibacillus	Bacillus_sp_2216.25.27	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Sporolactobacillaceae	Sporolactobacillus	Sporolactobacillus_inulinus	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Salinicoccus	Salinicoccus_carnicancri	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus	Staphylococcus_ariettae	0	0,000000	0	0,000000	2	0,001430	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus	Staphylococcus_sciuri	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	3	0,002223
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus	Staphylococcus_sp_SDT3S20	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Aerococcaceae	Aerococcus	Aerococcus_urinae	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Aerococcaceae	Facklamia	Facklamia_sourekii	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	Alkalibacterium	Alkalibacterium_iburiense	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	Atopococcus	Atopococcus_tabaci	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	Carnobacterium	Carnobacterium_gallinarum	0	0,000000	3	0,001576	2	0,001430	2	0,001482
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	Carnobacterium	Carnobacterium_sp_17-4	0	0,000000	0	0,000000	2	0,001430	0	0,000000

Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	Desemzia	Desemzia_incerta	0	0,000000	2	0,001050	2	0,001430	2	0,001482
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	Granulicatella	Granulicatella_sp._canine_oral_taxon	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	Marinilactibacillus	Marinilactibacillus_psychrotolerans	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	3	0,002223
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	Trichococcus	Trichococcus_pasteurii	0	0,000000	3	0,001576	3	0,002145	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus	Enterococcus_casseliflavus	0	0,000000	1	0,000525	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus	Enterococcus_cecorum	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Tetragenococcus	Tetragenococcus_halophilus	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Vagococcus	Vagococcus_elongatus	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	2	0,001482
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_acidophilus	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_alimentarius	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_amylophilus	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_bifermentans	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_brantae	0	0,000000	0	0,000000	5	0,003576	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_cacaonum	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_ceti	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_composti	0	0,000000	10	0,005252	1	0,000715	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_coryniformis	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_crispatus	0	0,000000	3	0,001576	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_crustorum	0	0,000000	2	0,001050	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_fermentum	0	0,000000	4	0,002101	10	0,007151	7	0,005187
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_fuchuensis	0	0,000000	2	0,001050	5	0,003576	3	0,002223
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_graminis	0	0,000000	9	0,004727	9	0,006436	10	0,007411
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_guizhouensis	0	0,000000	3	0,001576	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_hammesii	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_hayakitensis	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_lindneri	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_malefermentans	0	0,000000	61	0,032039	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_manihotivorans	0	0,000000	8	0,004202	10	0,007151	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_nasuensis	0	0,000000	0	0,000000	2	0,001430	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_oligofermentans	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_parabuchneri	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_paralimentarius	0	0,000000	17	0,008929	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_perolens	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	2	0,001482
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_plantarum	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_reuteri	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_sakei_subsp._carnosus	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_sakei_subsp._sakei_23	0	0,000000	5	0,002626	8	0,005721	5	0,003705
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_salivarius	0	0,000000	1	0,000525	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_similis	0	0,000000	15	0,007878	11	0,007867	29	0,021491
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_sp._MbBipro17	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_sp._MbBipto3	0	0,000000	3	0,001576	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_sp._Mphoto3	0	0,000000	6	0,003151	2	0,001430	2	0,001482
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_sp._TS3	0	0,000000	9	0,004727	2	0,001430	5	0,003705
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus_vaccinostercus	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	2	0,001482
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Pediococcus	Pediococcus_argentinicus	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Pediococcus	Pediococcus_clausenii_ATCC_BAA-	0	0,000000	0	0,000000	2	0,001430	0	0,000000

Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	bacterium_WM06i-B4E	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	2	0,001482
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	marine_bacterium_W12	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Salinisphaerales	Salinisphaeraceae	Salinisphaera	Salinisphaeraceae_bacterium_PC39	0	0,000000	1	0,000525	0	0,000000	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae	Methylophaga	Methylophaga_sp._DG1231	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae	Sulfurivirga	Sulfurivirga_caldicuralii	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Vibrio	Vibrio_vulnificus	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Arenimonas	bacterium_CYCU-0215	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Lysobacter	Lysobacter_concretionis	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	Pseudomonas_sp._CNE_23	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	Pseudomonas_sp._KOPRI_25723	0	0,000000	1	0,000525	1	0,000715	0	0,000000
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Xanthomonas	Xanthomonas_sp._B05-08.04.0214	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Bacteria	Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Spirochaeta	Spirochaeta_isovaleric	0	0,000000	0	0,000000	0	0,000000	1	0,000741
Total							66119	100	190394	100	139832	100	134940	100,0

15.- PRODUCTOS GENERADOS

- 1.- Artículo científico publicado en la revista Meat Science (2019).
- 2.- XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería (2015). Cartel: Análisis fisicoquímico y dinámica poblacional bacteriana, durante el proceso de maduración del chorizo tipo español mediante PCR-DGGE.
- 3.- IFT16 (2016). Identification and Biochemical Characterization of lactic acid bacteria isolated from spanish-style sausage.
- 4.- XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería (2017). Presentación oral. Análisis de la diversidad bacteriana mediante secuenciación de alto rendimiento del chorizo tipo español durante el proceso de maduración.



Evaluation of the bacterial diversity of Spanish-type chorizo during the ripening process using high-throughput sequencing and physicochemical characterization

Carmen Juárez-Castelán^a, Israel García-Cano^a, Alejandra Escobar-Zepeda^b,
Alejandro Azaola-Espinosa^c, Yenizey Álvarez-Cisneros^a, Edith Ponce-Alquicira^{a,*}

^a Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina, 09340, Iztapalapa, Ciudad de México, Mexico

^b Instituto de Biotecnología, Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Chamilpa, 62210, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^c Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso No. 1100, Col. Villa Quietud, 04960, Coyoacán, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Spanish-type chorizo

Population dynamics

High-throughput sequencing

Lactic acid bacteria

ABSTRACT

Spanish-type chorizo is a fermented meat product that is highly appreciated by consumers. The physicochemical properties (pH, water activity (a_w), total acidity (TA), and malonaldehyde content) were evaluated in the initial meat batter and at different ripening stages. Bacterial diversity and dynamics were also examined using high-throughput sequencing. A decrease in pH and a_w was observed during ripening, while the TA and malonaldehyde contents increased significantly. This data correlated with the changes in lactic acid bacteria and enterobacteria populations. Total bacterial diversity in the initial samples was represented by Proteobacteria (44%) and Firmicutes (55%) phyla, where *Pseudomonas* (23%), *Streptococcus* (21%), *Acinetobacter* (14%), *Bacillus* (13%), and *Brochothrix* (11%) were the most abundant genera. In contrast, Firmicutes reached the highest frequency (~89%), with *Lactobacillus* and *Streptococcus* being the most represented at the end of ripening. *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus acidilactici*, and *Weissella thailandensis* were identified by 16S rRNA gene analysis and were considered potentially responsible for the stability, microbiological safety, and sensory characteristics of this product.

1. Introduction

Fermented meat products have been consumed for centuries, and their manufacture involves fermentation and ripening/drying processes, including mixing meats with salts, sugars, and seasoning. This type of product can also be smoked and subjected to the action of selected microbial cultures and enzymes (Estevan-Fernández, 2013; Toldrá & Hui, 2014).

During manufacture, starter cultures are generally added to fermented foods to control the presence of microorganisms that alter meat quality, to ensure stability and safety, and to improve the sensory characteristics of the final product (Cocolin, Manzano, Cantoni, & Comi, 2001; Polka, Rebecchi, Pisacane, Morelli, & Puglisi, 2015). However, products without the addition of a starter culture that fulfil the aforementioned characteristics are available, and they rely on the quality of the raw ingredients and the ripening conditions used

(Aquilanti et al., 2007; Cocolin et al., 2009; Fonseca, Cachaldora, Gómez, Franco, & Carballo, 2013). An example of this product is the Spanish-type chorizo produced in the state of Hidalgo (central Mexico). The preparation of this product is based on a mixture of pork meat, lard, curing salts, paprika, and other spices to form a batter that is stuffed into permeable casings and subjected to a 30-day ripening process under controlled conditions, without the intentional addition of a starter culture. The Spanish-type chorizo does not require refrigeration for conservation or thermal treatment before its consumption, and has pleasant sensory properties.

During the ripening process, physicochemical and biochemical changes induce the development of specific microorganism populations depending on their optimal growth conditions (Tabanelli, Montanari, Grazia, Lanciotti, & Gardini, 2013). Most microorganisms proliferate at high water activity (a_w) values; however, a few genera are able to multiply when the a_w is below 0.90. This parameter is not the only

* Corresponding author at: Avenida San Rafael Atlixco 186, Vicentina, 09340, Iztapalapa, Mexico City, Mexico.

E-mail address: pae@xanum.uam.mx (E. Ponce-Alquicira).

<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.09.001>

Received 16 May 2018; Received in revised form 29 August 2018; Accepted 2 September 2018

Available online 03 September 2018

0309-1740/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

limiting factor for microbial growth, because other factors, such as pH, acidity, and nutrient availability influence bacterial growth (Fonseca et al., 2013). In addition, lipid oxidation during ripening is one of the primary biochemical factors that determines the quality of the product and is related to changes in the flavour, colour, taste, and texture (Wenjiao, Yongkui, Yunchuan, Junxiu, & Yuwen, 2014).

The native microbiota of chorizo is diverse and complex; the microorganisms that can develop are closely related to the ripening conditions (Cocolin et al., 2001; Pérez-Alvarez, Sayas-Barberá, Fernández-López, & Aranda-Catalá, 1999). The dominant microbial species described in food have been isolated using traditional microbiological methods using selective culture media. However, these methods have the disadvantage of detecting only the cultivable bacteria and therefore generate an incomplete view of the total microbiota (Giraff & Neviani, 2001). At the beginning of the 1990s, new approaches for the description of bacterial communities appeared through the development of culture-independent methods, such as random amplification of polymorphic DNA (RAPD)-PCR, real-time PCR, temperature gradient gel electrophoresis (TGGE), and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Cocolin et al., 2007; Fonseca et al., 2013; Fontana, Vignolo, & Cocconcelli, 2005; Iacumin, Comi, Cantoni, & Cocolin, 2006). The use of these techniques resulted in the identification of lactic acid bacteria (LAB) in chorizos, including *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, and *Lactobacillus plantarum*, as well as several species of *Enterococcus*, *Pediococcus*, and *Staphylococcus* (Cocolin et al., 2009; Fonseca et al., 2013; Fontana et al., 2005; Urso, Comi, & Cocolin, 2006). Most of these methods allow for accurate identification through the sequencing of ribosomal 16S rRNA gene. Then, in the mid-to-late 1990s, new methods for DNA sequencing were developed, such as the pyrosequencing and the parallelized ligation-mediated and bead-based sequencing. These methods were described as high-throughput sequencing technology (HTS), which led to a revolution in the study of a wide range of microbial ecosystems (Kergourlay, Taminiau, Daube, & Vergès, 2015) including those in food. Currently, these technologies play a very important role in the study of microbial communities in food. For example, Polka et al. (2015), Fontana et al. (2016), and Koo et al. (2016) used HTS to study Italian salami, fermented meat sausage, and pork meat products, respectively. In the same way, Wang et al. (2016) and Yang, Zhu, Zhang, Liang, and Luo (2018) analysed the microbial community in chilled meat packaged under modified atmospheres. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the changes in the physicochemical properties of Spanish-type chorizo and their relationship with the microbiota at different stages of ripening. In addition, we studied diversity and bacterial dynamics using a metagenomics approach to gain a better understanding of the fermenting process. To the best of our knowledge, this is the first work to report the bacterial population dynamics and physicochemical changes during the ripening process of Spanish-type chorizo using HTS.

2. Materials and methods

2.1. Spanish-type chorizo samples

Four independent batches of the same Spanish-type chorizo formulation, produced industrially in Hidalgo, Mexico, were analysed (the specific quantities for each component in the formulation of the Spanish-type chorizo are protected confidentially by Murgati S.A de C.V). The samples consisted of the initial meat batter made of pork, lard, curing salts, spices, garlic, and paprika (time 0 of ripening), and the stuffed meat product after 10, 20, and 30 days of ripening in a chamber with a controlled temperature of 9–11 °C and a relative humidity of 85%. For the physicochemical determinations, each batch was analysed in triplicate. For the bacterial population dynamic assessment, a mixture of the total DNA corresponding to each time point from each of the four batches was used.

2.2. Physicochemical analysis

The pH was determined using 10 g of sample collected and homogenized with an Ultra-Turrax homogenizer (IKA T18, Wilmington, NC, USA) in 90 mL of distilled water (adjusted to pH 7.0) and filtered through gauze. The filtrate was used for pH measurement using an HI2550 pH meter (HANNA, Woonsocket, RI, USA). The total acidity was evaluated in 5 g of sample homogenized using the Ultra-Turrax in 100 mL of distilled water, filtered, and titrated with 0.1 N NaOH (HYCEL, CDMX, Mexico) using phenolphthalein as an indicator (Cira, Huerta, Hall, & Shirai, 2002). The results were expressed as the percentage of lactic acid from the total acidity. The water activity (a_w) was obtained using a 4TE hygrometer (AQUA LAB, Pullman, WA, USA) at room temperature (approximately 25 °C). Lipid peroxidation products were evaluated by the spectrophotometric determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), where the malonaldehyde (MDA) and other oxidation products react with 2-thiobarbituric acid under acidic conditions to form a pink pigment with maximum absorbance at 532–535 nm. For this determination, 5 g of sample was homogenized with 25 mL of 20% trichloroacetic acid and filtered through No. 42 filter paper. Subsequently, 3 mL of the filtrate was mixed with 3 mL of 2-thiobarbituric acid (80 mM; JT Baker, Center Valley, PA, USA) and placed in a boiling bath for 30 min, before being cooled to room temperature. The absorbance was measured on a Synergy HT Multi-Modal Reader (BioTek, Winooski, VT, USA). The concentration was calculated using a standard curve (0–0.14 µg/mL) of 1,1,3,3-tetramethoxypropane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and the results were expressed in mg MDA/kg of the sample (Zipser & Watts, 1962).

2.3. Microbiological analysis

Twenty-five grams of each sample was homogenized in 225 mL of 0.1% sterile peptone water (0.1% peptone and 0.85% NaCl) for 1 min at 300 rpm within a Stomacher 400 Circulator (Seward, West Sussex, BN, UK). Decimal dilutions were prepared using the same diluent. The solutions were used to determine the colony forming units (CFU/g) in plates with different culture media: (i) total aerobic mesophiles (TAM) in standard agar (BD, Bioxon, Cuautitlán Izcalli, EMX, Mexico), (ii) LAB in Man Rogosa Sharpe agar (MRS-VB; Difco, Sparks, MD, USA) under anaerobic conditions, (iii) Enterobacteria on methylene blue eosin agar (EMB; BD), and (iv) Staphylococci were enumerated on mannitol salt agar (BD), and incubated at 37 °C for 24–48 h. The log CFU/g sample was reported. Colonies with different morphologies on the MRS-VB plates were isolated from the four time points analysed and cultivated in MRS broth for identification by 16S rRNA sequencing.

2.4. DNA extraction of LAB isolates, 16S rRNA gene amplification, and sequence analysis

DNA was extracted from the isolated LAB according to the indications of the Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI, USA). The fD1 (Forward) 5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTG ATCCTGGCTCAG-3' and (Reverse) 5'-CCC GGGATCCAAGCTTAAGGAG GTGATCCAGCC-3' primers were used to amplify the complete 16S rRNA gene sequence, and PCR reactions were performed according to the method reported by García-Cano et al. (2014). Amplicons were purified using a GeneJET PCR Purification kit (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) and sequenced by Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). The identity of the rRNA gene sequences was analysed by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, National Centre for Biotechnology Information, v2.8.0, May 2018).

2.5. Microbial communities identified by sequencing

2.5.1. Total DNA extraction

Total DNA was obtained according to the method reported by Escobar-Zepeda, Sanchez-Flores, and Baruch (2016) with the following modifications. First, 15 g of meat product and 50 mL of sodium citrate buffer (2% w/v, pH 8.0) were mixed for 2 min at 300 rpm in a Stomacher 400 Circulator; then, 1 mL of Neutrase HT Proteolytic (ENMEX, Tlalnepantla, EMX, Mexico) was added and mixed for 5 min at 300 rpm. The homogenate was incubated for 1 h at 45 °C at 100 rpm (INO650 V9, Prendo, Puebla, PUE, Mexico) and then filtered through sterile gauze. The solution was transferred to sterile 50 mL conical tubes and centrifuged at 3000 × g for 7 min at 4 °C to separate the biomass in the aqueous phase from the lipid and protein fractions. The aqueous phase was centrifuged at 8000 × g (Eppendorf, Franklin Lakes, NJ, USA) for 5 min at 4 °C, the supernatant was discarded, and the pellet was washed with sterile saline solution (0.85% NaCl w/v, pH 7.0) and centrifuged at 8000 × g for 5 min at 4 °C. The obtained pellet was used to extract the total DNA according to the instructions of the Wizard® Genomic DNA purification kit. The DNA concentration was measured using a Take3 (Bio Tek, Winooski, VT, USA) plate coupled to a Synergy HT.

2.5.2. Illumina high-throughput sequencing

From the DNA samples, the V3–V4 variable regions of the 16S ribosomal gene were amplified using the universal primers SD-Bact-0341-bS-17 and SD-Bact-0785-a-A-21 (Klindworth et al., 2016). Four independent libraries were constructed from the amplicon mixture (one for each ripening time evaluated) using a TruSeq kit (Illumina Inc. San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's specifications. The ~550-bp amplicons were sequenced in an Illumina MiSeq instrument (Illumina Inc.) in a 300-cycle paired-end format.

Sequence data of the Spanish-type chorizo samples are available at the SRA site at NCBI with the bioproject identifiers SAMN05785554, SAMN05785555, SAMN05785556, and SAMN05785557.

2.5.3. Sequence data preparation and analysis

The overlapping sequences were assembled with their respective pairs using the Flash v1.2.11 software (Magoč & Salzberg, 2011). The extended fragments were used to perform operational taxonomic unit (OTU) diversity analysis by clustering sequences with 97% identity using the CD-HIT v4.6 program (Li & Godzik, 2006). Single OTUs per sample with a single sequence were discarded from the analysis. The Chao1 richness and Shannon diversity indices were estimated using the Phyloseq R library (McMurdie & Holmes, 2013). The abundance matrix of OTUs was normalised using the metagenomeSeq method (McMurdie & Holmes, 2014).

Taxonomic annotation of the extended fragments was performed using the Metaxa2 v2.1 program (Bengtsson-Palme et al., 2015). Count tables at different taxonomic levels were integrated and transformed into the relative total abundance, and stacked bar plots were generated using homemade scripts in Perl and R.

2.6. Statistical analysis

An analysis of variance (ANOVA) was performed to evaluate statistical differences in the pH, total acidity, a_w , and MDA between batches. Data were processed through an experimental design with two fixed factors (time and batch) across four levels. A two-way ANOVA and a Tukey test were performed to determine significant differences ($P < .05$) during the ripening period of Spanish-type chorizo.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical and microbiological analyses

Table 1 shows the variation in the physicochemical parameters and

microbiological analysis at time 0 and the meat product after 10, 20, and 30 days of ripening. The meat batter presented a pH value of 6.08 that decreased significantly ($P < .05$) during the ripening process, reaching a value of 5.54 at the end of the studied period. This pH change is consistent with the significant increase in acidity from 0.60 to 0.93% from day 0 to 30. Other studies on fermented sausages also detected a decrease in the pH at the end of the ripening process (Chen, Kong, Han, Liu, & Xu, 2016; Marcos, Aymerich, Guardia, & Garriga, 2007; Tabanelli et al., 2013). The variation in acidity can be attributed to the accumulation of organic acids, including lactic, acetic, and propionic acids, among others, mainly derived from the presence of LAB, as this group of microorganisms consists of acidifying bacteria that play important roles in fermentation processes.

The values of a_w showed significant differences during the maturation process. The meat batter presented an a_w value of 0.96, which gradually decreased to 0.84 on day 30. Other authors have reported similar a_w values from 0.84 to 0.87 in ripened sausages (Casaburi et al., 2007; Marcos et al., 2007; Tabanelli et al., 2013). This a_w reduction probably occurred because of the controlled relative humidity conditions in the ripening chamber, combined with the decrease in the meat water retention capacity. As the pH value becomes close to the isoelectric point of myofibrillar proteins (~5.3), this favours protein-protein interactions that promote the loss of water and a reduction of the a_w in fermented meat products (Gounadaki, Skandamis, & Nychas, 2009).

In addition, lipid oxidation might affect the quality and shelf life of meat products (Wenjiao et al., 2014). In this study, the TBARS method was used to determine the presence of MDA and the formation of other compounds derived during the second stage of lipid oxidation, such as aldehydes and ketones (Wójciak & Dolatowski, 2015). The MDA concentration in the meat batter was 0.29 mg MDA/kg, which increased to a maximum value of 0.41 mg MDA/kg during the ripening process. During the same period, the amount of LAB increased, which were mainly represented by Lactobacillus. Chen, Kong, Han, Xia, and Xu (2017) showed that some LAB inhibited lipid oxidation in sausages during fermentation. Therefore, this phenomenon could explain why the concentration of MDA did not continue to increase as Lactobacillus was detected as dominant in the middle and final ripening stages. Even at the end of fermentation, the samples of Spanish-type chorizo maintained values below the oxidation threshold of 2 mg MDA/kg, the concentration at which unpleasant tastes may be detected (Hu et al., 2016; Steele et al., 2016; Wenjiao et al., 2014). Even though, a slight oxidation is desirable in meat and fermented meat products, because the volatile compounds contribute to the development of aroma and flavour characteristics. However, this process is also one of the primary mechanisms underlying the deterioration of quality if the concentration is too high (Marcos et al., 2007).

In relation to the microbial analyses, the total number of aerobic mesophiles increased from 5.20 to 5.50 log CFU/g at the end of the ripening process, and we associated this with the microorganisms responsible for the fermentation process. These results are similar to those obtained from a study of a Galician sausage fermented for 30 days (Fonseca et al., 2013). The LAB population increased from 4.38 log CFU/g (time 0) to 6.48 log CFU/g at day 10, representing a total increase of 2.5 orders of magnitude. This value was stable for the rest of the ripening process until day 30 (6.31 log CFU/g). Thirteen types of colonies, grouped by their morphology, were isolated during ripening process; among them seven different strains of LAB were identified with 98% identity values by 16S rRNA gene sequencing, where *Lactobacillus sakei* and *Pediococcus acidilactici* predominate in the ripened samples (Table 2).

The initial number of enterobacteria in the batter was 1.77 log CFU/g, which decreased to 1.4 log CFU/g with no significant difference during the maturation process. These microorganisms are associated with deterioration of meat and its derivatives preserved under refrigeration conditions, and may be associated with foodborne diseases

Table 1

Results of physicochemical (a_w , pH, total acidity and mg MDA) and microbiological analyses, at time zero (meat batter) and in the Spanish-type chorizo samples at different ripening time. Average \pm 1 standard deviations are reported. Values in the same column followed by the different letter (^a, ^b or ^c) are significantly different ($P \leq .05$) according to the Tukey test for comparison of means.

Ripening time	Physicochemical parameters				Microbial population (log CFU/g)			
	pH	TA (%)	a_w	MDA (mg/kg)	Total mesophiles	LAB	Enterobacteria	Staphylococci
0 d	6.08 \pm 0.05 ^a	0.60 \pm 0.016 ^a	0.96 \pm 0.002 ^a	0.291 \pm 0.007 ^a	5.20 \pm 0.22 ^a	4.38 \pm 0.17 ^a	1.77 \pm 0.04 ^b	3.0 \pm 0.02 ^c
10 d	5.85 \pm 0.01 ^b	0.91 \pm 0.005 ^b	0.91 \pm 0.002 ^b	0.414 \pm 0.005 ^b	6.22 \pm 0.2 ^b	6.48 \pm 0.27 ^c	1.37 \pm 0.01 ^a	1.94 \pm 0.03 ^a
20 d	5.92 \pm 0.009 ^b	0.91 \pm 0.023 ^b	0.88 \pm 0.004 ^c	0.419 \pm 0.004 ^b	5.63 \pm 0.49 ^{ab}	5.93 \pm 0.38 ^b	1.42 \pm 0.03 ^a	1.99 \pm 0.04 ^a
30 d	5.54 \pm 0.04 ^c	0.93 \pm 0.012 ^b	0.86 \pm 0.008 ^d	0.402 \pm 0.015 ^b	5.50 \pm 0.61 ^{ab}	6.31 \pm 0.22 ^{bc}	1.31 \pm 0.02 ^a	2.36 \pm 0.05 ^b

(Gounadaki et al., 2009). The drop in pH in combination with the increase of LAB may help to inhibit the development of meat-altering microorganisms, because some bacteria are not tolerant of the presence of organic acids and pH values lower than 5.0, including *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Shigella*, and in general, the enterobacteria group. Finally, the staphylococci count decreased from 3.0 log CFU/g in the meat batter to 2.36 log CFU/g after 30 days of maturation, these values are within the limits shown in NOM-145-SSA1-1995 (n.d.), for ripened meat products in Mexico.

3.2. OTUs diversity and taxonomic annotation

Between 679,000 and 868,000 paired-end sequences were obtained from Spanish-type chorizo from each ripening time point. In all cases, we archived extended fragments for at least 90% of the total sequences, with a coverage of 0.99. In this work, we reported the total number of OTUs because the abundance filtering may affect the detection of the less abundant phylotypes; the high number of OTUs observed was mainly caused by the high sequence yield by the *de novo* clustering method used, and the sensitivity of the high-throughput sequencing methods, particularly of the Illumina technology. Table 3 shows the total bacterial genera and the bacterial genera detected by applying an abundance filter $> 0.1\%$. To evaluate the biodiversity of OTUs in the meat batter and among the Spanish-type chorizo samples, we analysed the species diversity using the alpha indices (Chao and Shannon). In the samples of Spanish-type chorizo, the high-throughput sequencing allowed the analysis of between 64 and 71% of the total diversity in the Spanish-type chorizo samples (Table 3). The Shannon index that represents the richness of the sample, this index is proportional to the microbial diversity and was higher at time zero compared with that in the other ripened samples. At time zero, there were several dominant genera, in contrast to samples at day 10, where the dominant genus was *Lactobacillus*. From day 10 to 30, the diversity remained virtually constant (Table 3- Shannon index). The Chao1 index indicated the species richness in the samples; this index increased over time and was greatest at day 30 from 6977.53 to 11,792.73. We observed between 390 and

Table 2

Identification by 16S rRNA gene sequencing of the isolated strains from MRS-VB plates obtained at time zero (meat batter) and in the Spanish-type chorizo samples at different ripening time, ratio between of the strains during the process.

Name	Ripening time (days)	Colonies (%)	Identities (16S rRNA gene)	Identity (%)	Accession number
1100	0	40.37	<i>Weissella thailandensis</i>	99	HE575179.1
1101	0	4.01	<i>Pediococcus acidilactici</i>	98	MF355338.1
1102	0	55.62	<i>Lactobacillus sakei</i>	99	MG835614.1
1106	10	88.22	<i>Lactobacillus sakei</i>	99	MF43196.1
1107	10	3.3	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	JX402122.1
1108	10	8.26	<i>Weissella thailandensis</i>	99	MH665828.1
1109	10	0.30	<i>Weissella thailandensis</i>	99	MH665828.1
1112	20	1.77	<i>Weissella thailandensis</i>	99	JQ805715.1
1113	20	60.99	<i>Lactobacillus sakei</i>	99	FJ040202.1
1115	20	37.22	<i>Pediococcus acidilactici</i>	98	JX431046.1
1118	30	54.5	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	CP025206.1
1119	30	45.5	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	CP025206.1

Table 3

Alpha diversity indices for the 97% OTUs for time zero (meat batter) and in the Spanish-type chorizo samples at different ripening time.

Attribute	Ripening time			
	0 d	10 d	20 d	30 d
Read number	679,704	868,088	857,756	817,106
OTUs observed	5174	6697	6420	7398
Chao1	6977.53	10,460.62	10,470.48	11,792.73
Shannon	4.40	3.47	3.35	3.66
Coverage	0.9937	0.9921	0.9919	0.9901
Total bacteria genera detected	442	398	390	428
Bacteria genera in abundance 0.1%	22	18	16	19

442 bacterial genera, with a range of bacterial recover between 16 and 22, which are similar in the order of magnitude of those cited by Polka et al. (2015) and Greppi et al. (2015). This behaviour could be directly related to the physicochemical changes observed in the batter.

3.3. Effect of the ripening time on the bacterial composition of Spanish-type chorizo

As shown in Fig. 1, the meat batter and Spanish-type chorizo samples exhibited marked taxonomical differences. At time zero, the main phyla detected were *Firmicutes* and *Proteobacteria* (Fig. 1A), which represented 55 and 44% of the total relative abundance, respectively. After time zero, *Firmicutes* increased and *Proteobacteria* decreased; the highest *Firmicutes* frequency ($\sim 89\%$) was reached at day 10 (Fig. 1A), indicating their selection as the dominant microbiota. The distribution at time zero at the order level showed a higher percentage of the *Enterobacteriales* and *Pseudomonadales* belonging to the phylum *Proteobacteria* (Fig. 1B), as well as *Bacillales* and *Lactobacillales* corresponding to the phylum *Firmicutes* (Fig. 1C). After 10 days of ripening, the *Lactobacillales* increased up to 90%, while the *Bacillales* decreased to 9% of the relative total abundance of *Firmicutes*. Some other orders observed

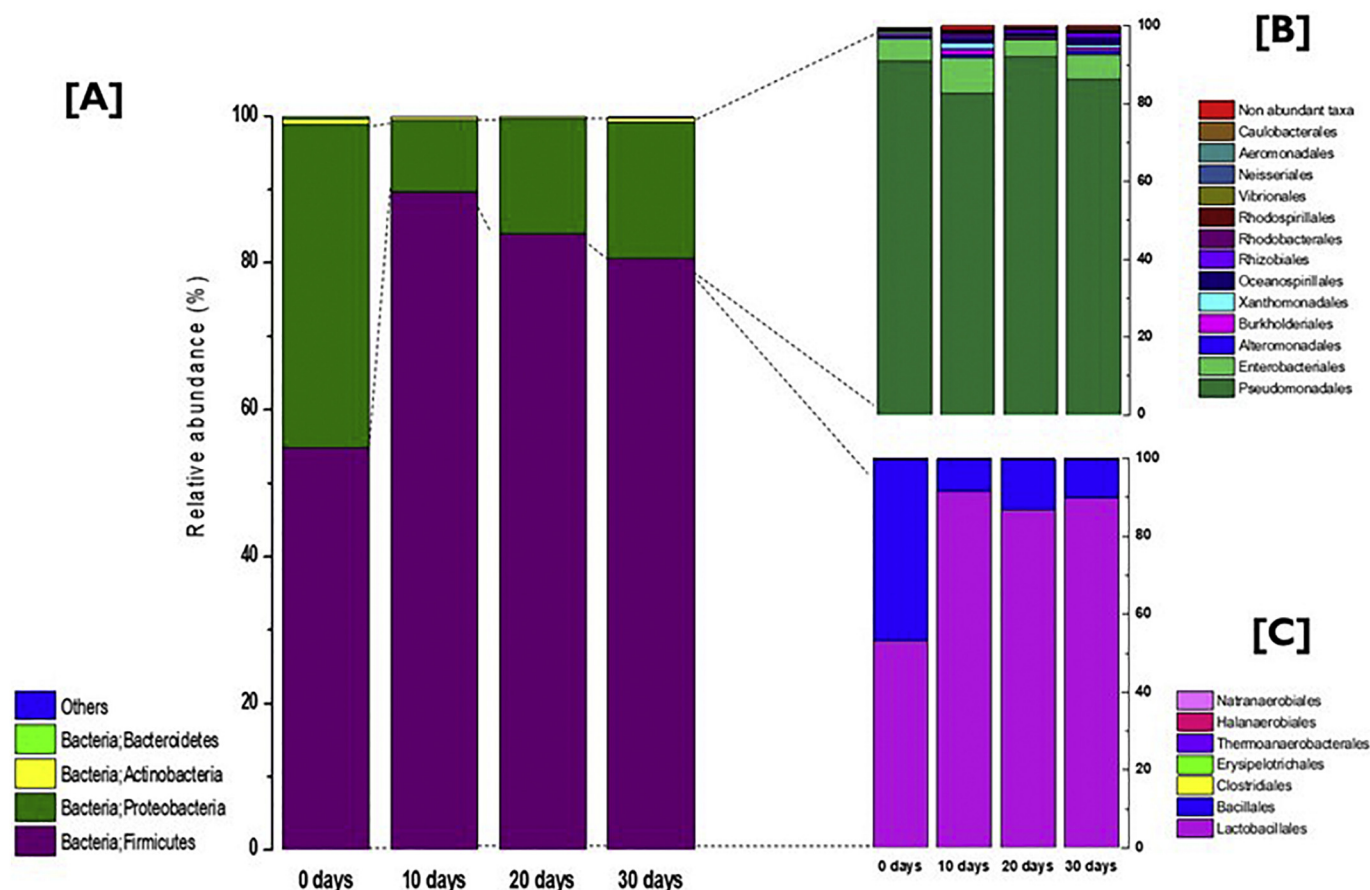


Fig. 1. Relative abundance of the population in the meat batter (0 days) and different ripening time of Spanish-type chorizo (10, 20 and 30 days). (A) Annotation at the phylum level (B); *Proteobacteria* at the order level; (C) *Firmicutes* at the order level.

in lower percentages included *Alteromonadales*, *Burkholderiales*, *Enterobacteriales*, *Flavobacteriales*, *Oceanospirillales*, *Rhizobiales*, and *Xanthomonadales* (Krona chart of Supplementary material 1).

The two most representative phyla included 538 bacterial genera during the ripening process, of which 168 corresponded to Firmicutes and 370 to Proteobacteria. The genera that presented the greatest abundances at time zero (Fig. 2) were *Pseudomonas* (25%), *Streptococcus* (23.7%), *Acinetobacter* (15.3%), *Bacillus* (14.3%), and *Brochothrix* (12.2%); these bacteria are frequently found in processed meat products (Gounadaki et al., 2009; Yang et al., 2018). The quantity and types of microorganisms present during this time depend on factors such as hygiene and handling of the raw materials during processing, as well as the pH, a_w , moisture, ripening temperature, and the food ingredients. The identified genera are similar to those reported by Quijada et al. (2018), and Polka et al. (2015), with controlled conditions of humidity and temperature in the ripening process. In particular the temperature during ripening influences LAB evolution and the speed of the pH decrease, sausages fermented at high temperatures (> 37 °C) presented a rapid decrease in pH and favours pediococci; in comparison to those fermented at lower temperatures that encourages lactobacilli. Milicevic et al. (2014) reported the high presence of *Lactobacillus sakei* and other representative lactobacilli in several fermented meats elaborated in Europe and America due to their ability to proliferate on low temperatures and in the presence of high concentrations of NaCl. Besides, a pH between 4.8 and 5.2, and low temperature of maturation are optimal for the activity of protease enzymes, which have an important role during the meat maturation process (Toldrá & Hui, 2014). In relation to the microflora some of the microorganisms that cause alterations in meat products correspond to the genera *Brochothrix*, *Moraxella*, and *Pseudomonas* (Cervený, Meyer, &

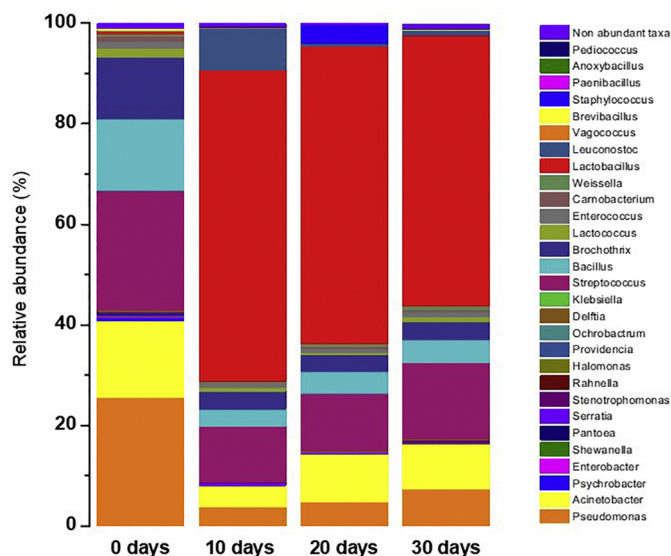


Fig. 2. Relative abundance of the population at the genus level in the meat batter (0 days) and different ripening time of Spanish-type chorizo (10, 20 and 30 days).

Hall, 2009), and these genera were found in this study at time zero. From day 10, the a_w and pH decreased (Table 1), which caused a decrease in the amount of *Pseudomonas*, because the minimum a_w and pH values required for the growth of these bacteria are 0.97 and 5.0, respectively (Lebert, Begot, & Lebert, 1998). After 10 days, the microbial diversity decreased because of the decrease in pH and a_w that occurred

during ripening (Table 1). In particular, the pH decrement favoured the increase in *Lactobacillus* up to 61.9% of the dominant genera and the decrease in *Acinetobacter* (4%), *Bacillus* (3%), *Brochothrix* (1%), *Pseudomonas* (3%), and *Streptococcus* (12%) during the ripening process (Fig. 2). Cerveny et al. (2009) indicated that the genera described above are present at a significant percentage in raw and intact meat, and that effective carcass decontamination, proper evisceration procedures, and rapid chilling greatly reduce the initial microbiota and extend the product's shelf life.

Pseudomonas could be part of the resident microbiota of food processing plants (Fontana et al., 2016) because these bacteria have the ability to adhere to working surfaces and equipment (Stellato, Filippis, Storia, & Ercolini, 2015). Studies related to *Pseudomonas fragi* isolates from meat products have revealed their ability to adapt to conditions where the a_w (1.0–0.97), pH (7.0–5.8), and temperature (7–25 °C) values are different from those optimal for their growth. This bacterium presents its highest growth at approximately 7 °C (Lebert et al., 1998), which may help to explain the presence of *Pseudomonas* in samples at time zero.

In addition, the *Leuconostoc* genus was found among the bacteria reported in the subdominant fraction. There are studies showing that strains of this bacterium, such as *Leuconostoc carnosum*, have been isolated from fermented meat products, which may help to improve their stability and flavour (Jacobsen, Budde, & Koch, 2003).

The identified LAB strains possibly play an important role in the processing of the Spanish-type chorizo; because several studies clearly demonstrated that certain LAB affect both the physicochemical properties and the microbial stability of fermented meats. LAB can inhibit the development of spoilage and pathogenic microorganisms by acidification and the production of antimicrobials; they also help to reduce oxidation reactions and to protect the meat colour. LAB also contribute to the taste and texture of fermented products, as a result of reactions such as lipolysis, proteolysis, and the conversion of lactose in citrate and pyruvate intermediates, which can be converted to various aromatic compounds, such as diacetyl, acetoin, acetaldehyde and acetic acid. In addition, small peptides and free amino acids can be further transformed into alcohols, aldehydes, acids, and esters responsible for the flavour profile of fermented meats (Coconcelli & Fontana, 2007; Vignolo, Castellano, & Fadda, 2014). Therefore, LAB could be employed as starter cultures in different meat products to obtain high-quality sausages (Cocolin et al., 2009; Urso et al., 2006).

4. Conclusions

Our metagenomic analysis revealed marked microbial variety during the ripening process of Spanish-type chorizo. The main physicochemical and microbiological changes took place during the first 10 days of ripening. We detected 733 bacterial genera using Metaxa2 v2.1. The predominant genus was *Lactobacillus*, which represented up to ~62% of the total abundance during the ripening process. The presence of the species *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus acidilactici*, and *Weissella thailandensis* was confirmed in isolated strains by sequencing the complete 16S rRNA gene. These bacteria are probably responsible for the organoleptic characteristics of the ripened product. The results demonstrated that the controlled humidity and temperature conditions (9–11 °C and 85% relative humidity) in the ripening process, and the physicochemical and biochemical changes generated in the first 10 days, are crucial to establish the dominant microbiota during this process.

Declaration of interest

The authors guarantee that no competing interest exists.

Acknowledgments

We thank Murgati SA de CV for providing the Spanish-type chorizo samples. We acknowledge the Unit of Massive Sequencing and Bioinformatics-UNAM for bioinformatic support. Carmen Juárez-Castelán thanks CONACyT, Mexico, for the scholarship grant for biotechnology doctoral studies. The results were supported by UAM and CONACyT, Mexico as part of the INNOVAPYME 2016 Project 232144.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.09.001>.

References

- Aquilanti, L., Santarelli, S., Silvestri, G., Osimani, A., Petruzzelli, A., & Clementi, F. (2007). The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. *Food Microbiology*, *44*, 136–141.
- Bengtsson-Palme, J., Hartmann, M., Eriksson, K. M., Pal, C., Thorell, K., Larsson, D. G. J., & Nilsson, R. H. (2015). MMETAXA2: Improved identification and taxonomic classification of small and large subunit rRNA in metagenomic data. *Molecular Ecology Resources*, *15*, 1403–1414.
- Casaburi, A., Aristoy, M. C., Cavella, S., Monaco, R. D., Ercolini, D., Toldrá, F., & Villani, F. (2007). Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. *Meat Science*, *76*, 295–307.
- Cerveny, J., Meyer, J. D., & Hall, P. A. (2009). Microbiological spoilage of meat and poultry products. In W. H. Sperber, & M. P. Doyle (Eds.). *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages* (pp. 72–74). Georgia: E-Publishing Inc.
- Chen, Q., Kong, B., Han, Q., Liu, Q., & Xu, L. (2016). The role of bacterial fermentation in the hydrolysis and oxidation of sarcoplasmic and myofibrillar proteins in Harbin dry sausages. *Meat Science*, *121*, 196–206.
- Chen, Q., Kong, B., Han, Q., Xia, X., & Xu, L. (2017). The role of bacterial fermentation in lipolysis and lipid oxidation in Harbin dry sausages and its flavor development. *LWT - Food Science and Technology*, *77*, 389–396.
- Cira, L., Huerta, S., Hall, G., & Shirai, K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemical*, *37*, 1359–1366.
- Coconcelli, P. S., & Fontana, C. (2007). Bacteria. In F. Toldrá (Ed.). *Handbook of fermented meat and poultry* (pp. 117–128). Iowa: Blackwell Publishing.
- Cocolin, L., Diez, A., Urso, R., Rantsiou, K., Comi, G., Bergmaier, I., & Beifmohr, C. (2007). Optimization of conditions for profiling bacterial populations in food by culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, *120*, 100–109.
- Cocolin, L., Dolci, P., Rantsiou, K., Urso, R., Cantoni, C., & Comi, G. (2009). Lactic acid bacteria ecology of three traditional fermented sausages produced in the North of Italy as determined by molecular methods. *Meat Science*, *82*, 125–132.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., & Comi, G. (2001). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*, 5113–5121.
- Escobar-Zepeda, A., Sanchez-Flores, A., & Baruch, M. Q. (2016). Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology*, *57*, 116–127.
- Estevan-Fernández. (2013). Oficina económica y comercial de la embajada de España en México. El mercado del jamón y el embutido curado en México. http://www.ivace.es/Internacional_Informes-Publicaciones/Pa%C3%ADses/M%C3%A9xico/M%C3%89XICOJAMONEMBUTIDOICEX2013_.pdf [Accessed May 25, 2017].
- Fonseca, S., Cachaldora, A., Gómez, M., Franco, I., & Carballo, J. (2013). Monitoring the bacterial population dynamics during the ripening of Galician chorizo, a traditional dry fermented Spanish sausage. *Food Microbiology*, *33*, 77–84.
- Fontana, C., Bassi, D., López, C., Pisacane, V., Otero, M., Puglisi, E., ... Vignolo, G. (2016). Microbial ecology involved in the ripening of naturally fermented llama meat sausages. A focus on lactobacilli diversity. *International Journal of Food Microbiology*, *236*, 17–25.
- Fontana, C., Vignolo, G., & Coconcelli, P. S. (2005). PCR-DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages. *Journal of Microbiology Methods*, *63*, 254–263.
- García-Cano, I., Serrano-Maldonado, C. E., Olvera-García, M., Delgado-Arciniega, E., Peña-Montes, C., Mendoza-Hernández, G., & Quirasco, M. (2014). Antibacterial activity produced by *Enterococcus* spp. Isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese. *LTW - Food Science Technology*, *59*, 26–34.
- Giraff, G., & Neviani, E. (2001). DNA-based culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, *67*, 19–34.
- Gounadaki, A., Skandamis, P. N., & Nychas, G. (2009). Fermented meats. In R. Fernandes (Ed.). *Microbiology handbook: Meat products*. Leatherhead Food Research (pp. 129–155). UK: E-Publishing Inc.
- Greppi, A., Ferrocino, I., La Storia, A., Rantsiou, K., Ercolini, D., & Cocolin, L. (2015). Monitoring of the microbiota of fermented sausages by culture independent rRNA-based approaches. *International Journal of Food Microbiology*, *212*, 67–75.

- Hu, H., Pereira, J., Xing, L., Hu, Y., Qiao, C., Zhou, G., & Zhang, W. (2016). Effects of regenerated cellulose emulsion on the quality of emulsified sausage. *LWT- Food Science and Technology*, *70*, 315–321.
- Iacumin, L., Comi, G., Cantoni, C., & Coccolin, L. (2006). Molecular and technological characterization of *Staphylococcus xylosum* isolated from naturally fermented Italian sausages by RAPD, Rep-PCR and Sau-PCR analysis. *Meat Science*, *74*, 281–288.
- Jacobsen, T., Budde, B. B., & Koch, A. G. (2003). Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. *Journal of Applied Microbiology*, *95*, 242–249.
- Kergourlay, G., Taminiau, B., Daube, G., & Vergès, M. C. (2015). Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. *International Journal of Food Microbiology*, *213*, 31–39.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., ... Rieke, S. C. (2016). Metagenomic assessment of the microbial diversity in ground pork products from markets in the North Central Region of South Korea. *Journal of Environmental Science and Health. Part B*, *51*, 622–627.
- Lebert, I., Begot, C., & Lebert, A. (1998). Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8–7.0), water activity (0.97–1.00) and temperature (7–25 °C). *International Journal of Food Microbiology*, *39*, 53–60.
- Li, W., & Godzik, A. (2006). Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, *22*, 1658–1659.
- Magoč, T., & Salzberg, S. L. (2011). FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, *27*, 2957–2963.
- Marcos, B., Aymerich, T., Guardia, M. D., & Garriga, M. (2007). Assessment of high hydrostatic pressure and starter culture on the quality properties of low-acid fermented sausages. *Meat Science*, *76*, 46–53.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). PhyloSeq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One*, *8*, e61217.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2014). Waste Not, Want Not: Why rarefying microbiome data is inadmissible. *PLoS Computational Biology*, *10*, e1003531.
- Milicevic, B., Danilovic, B., Zdolec, N., Kozachinski, L., Dobranic, V., & Savic, D. (2014). Microbiota of the fermented sausages: Influence to product quality and safety. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, *20*, 1061–1078.
- NOM-145-SSA1-1995. Mexican Official Standard. Productos cárnicos troceados y curados. Productos cárnicos curados y madurados. Disposiciones específicas sanitarias.
- Pérez-Alvarez, J. A., Sayas-Barberá, M. E., Fernández-López, J., & Aranda-Catalá, V. (1999). Physicochemical characteristics of Spanish-type dry-cured sausage. *Food Research International*, *32*, 599–607.
- Polka, J., Rebecchi, A., Pisacane, V., Morelli, L., & Puglisi, E. (2015). Bacterial diversity in typical Italian salami at different ripening stages as revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons. *Food Microbiology*, *46*, 342–356.
- Quijada, N. M., Fillips, F., Sanz, J. J., García-Fernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., Ercolini, D., & Hernández, M. (2018). Different *Lactobacillus* populations dominate in "Chorizo de León" manufacturing performed in different production plants. *Food Microbiology*, *70*, 94–102.
- Steele, K. S., Weber, M. J., Boyle, E. A. E., Hunt, M. C., Lobaton-Sulabo, A. S., Cundith, C., ... Roenbaugh, T. L. (2016). Shelf life of fresh meat products under LED or fluorescent lighting. *Meat Science*, *2016*, 75–84.
- Stellato, G., Filippis, F. D., Stora, A. L., & Ercolini, D. (2015). Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy processing environmental. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*, 7893–7904.
- Tabanelli, G., Montanari, C., Grazia, L., Lanciotti, R., & Gardini, F. (2013). Effects of a_w at packaging time and atmosphere composition on aroma profile, biogenic amine content and microbiological features of dry fermented sausages. *Meat Science*, *94*, 177–186.
- Toldrá, F., & Hui, Y. (2014). Dry-Fermented sausages and ripened meats: An overview. In Y. H. Hui, I. Astiasaran, J. Sebranek, & R. Talon (Eds.). *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 321–326). Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Urso, R., Comi, G., & Coccolin, L. (2006). Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: Isolation, identification and molecular characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, *29*, 671–680.
- Vignolo, G., Castellano, P., & Fadda, S. (2014). Bioprotective cultures. In Y. H. Hui, I. Astiasaran, J. Sebranek, & R. Talon (Eds.). *Handbook of fermented meat and poultry* (pp. 129–137). Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Wang, T., Zhao, L., Sun, Y., Ren, F., Chen, S., Zhang, H., & Guo, H. (2016). Changes in the microbiota of lamb packaged in a vacuum and in modified atmospheres during chilled storage analysed by high-throughput sequencing. *Meat Science*, *121*, 253–260.
- Wenjiao, F., Yongkui, Z., Yunchuan, C., Junxiu, S., & Yuwen, Y. (2014). TBARS predictive models of pork sausages stored at different temperatures. *Meat Science*, *96*, 1–4.
- Wójciak, K. M., & Dolatowski, Z. J. (2015). Evaluation of natural in combination with aid whey for use in fermented sausage. *Science in Agriculture*, *3*, 125–133.
- Yang, X., Zhu, L., Zhang, Y., Liang, R., & Luo, X. (2018). Microbial community dynamics analysis by high-throughput sequencing in chilled beef longissimus steaks packaged under modified atmospheres. *Meat Science*, *141*, 94–102.
- Zipser, M., & Watts, B. (1962). A modified 2-thiobarbituric acid (TBA) method for the determination of malonaldehyde in cured meats. *Food Technology*, *16*, 102–107.



Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. otorga la presente

Constancia

A: Carmen Josefina Juárez Castelán, Alejandro Azaola Espinosa, Yenizey Merit Álvarez Cisneros, Israel García Cano, Edith Ponce Aiquira

Por su participación con la Presentación en Cartel

"ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO Y DINÁMICA POBLACIONAL BACTERIANA, DURANTE EL PROCESO DE MADURACIÓN DE CHORIZO TIPO ESPAÑOL MEDIANTE PCR-DGGE"

en el XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería,
realizado del 21 al 26 de Junio de 2015, en Guadalajara, Jalisco, México.

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
Presidente de la SMBB

Dr. Carlos Regalado González
Presidente del Comité Organizador

Dr. José Adolfo Escalante Lozada
Presidente del Comité Científico



Certificate of Participation

This certifies that

CARMEN JUAREZ-CASTELAN

POSTER ATTENDED:

006 - 60 - Identification and Biochemical Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From Spanish-Style Sausage

attended IFT16: Where Science Feeds Innovation® July 16-19, 2016 held in Chicago, Illinois, USA

The IFT16 scientific and applied sessions qualify for Certified Food Scientist (CFS) recertification contact hours (CH). CFS Certificants may claim a maximum of 22 CH for their participation in scientific and technical symposia and poster sessions related to the CFS Content Domains.

IFT is a Continuing Professional Education (CPE) accredited provider (IN141) with the Academy of Nutrition and Dietetics' Commission on Dietetic Registration (CDR).

Clare Keessey
IFT Meeting Planner



XVII
CONGRESO NACIONAL DE
BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C.
otorga la presente

Constancia

A

Carmen Josefina Juárez Castelán, Israel García Cano, Grisel Alejandra Escobar
Zepeda, Edith Ponce Alquicira

por su participación con la Presentación Oral

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE
ALTO RENDIMIENTO DE CHORIZO TIPO ESPAÑOL DURANTE EL PROCESO
DE MADURACIÓN**

Puerto Vallarta, Jal., 25 al 30 de junio de 2017.

Dr. Carlos Regalado González
Presidente de la SMBS-2016 - 2018

Dr. Adelfo Escalante Lozada
Presidente del Comité Organizador 2016 - 2018

Dr. Nicolás Óscar Soto Cruz
Presidente del Comité Científico 2016 - 2018

