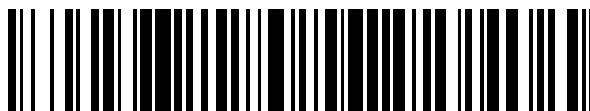


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 785 205**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6869 (2008.01)

C12Q 1/689 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2014** **PCT/EP2014/077672**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2015** **WO15097006**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2014** **E 14820806 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2020** **EP 3087198**

54 Título: **Análisis metagenómico de muestras**

30 Prioridad:

24.12.2013 EP 13199610

13.01.2014 EP 14150903

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.10.2020

73 Titular/es:

UNIVERSITE DE LIEGE (50.0%)

Avenue Pré-Aily 4

4031 Angleur, BE y

QUALITY PARTNER S.A. (50.0%)

72 Inventor/es:

DAUBE, GEORGES;

TAMINIAU, BERNARD;

NEZER, CARINE y

DELHALLE, LAURENT

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 785 205 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Análisis metagenómico de muestras

La invención se refiere a un método analítico que se ha desarrollado para identificar y cuantificar el contenido total de microorganismos de las muestras de alimentos fermentados.

5 El contenido microbiano de los alimentos, las heces o las muestras ambientales a menudo se identifican o cuantifican a través de métodos dependientes del cultivo. Entre las tecnologías moleculares de nueva generación, el análisis metagenómico ha emergido como una herramienta poderosa. La metagenómica aplica un conjunto de tecnologías genómicas y herramientas bioinformáticas para acceder directamente al contenido genético de comunidades enteras de organismos. Esta tecnología se usa comúnmente para describir los perfiles de la comunidad microbiana de varios ecosistemas como mares, suelos, rumen y heces, pero también para estudiar la microbiota compleja de alimentos.

10 Quedan varios problemas con el análisis metagenómico de alimentos y otras muestras similares. En primer lugar, es necesario proporcionar un enfoque metagenómico global que no dependa de la capacidad del microbio para crecer en medios de cultivo determinados en condiciones ambientales definidas (por ejemplo, pH, T^a, Aw). Tal enfoque debería proporcionar la descripción así como la cuantificación de los microorganismos observados, que es una necesidad crítica en algunos entornos, por ejemplo, cuando se deben explicar los problemas de deterioro de los alimentos.

15 En segundo lugar, los métodos de análisis metagenómicos de la técnica anterior pueden estar sesgados por la presencia en las muestras que se analizan de microorganismos no viables. En muchos casos, especialmente en el análisis metagenómico de muestras de alimentos, es importante ser capaz de caracterizar y cuantificar solo los microorganismos vivos en una muestra. Las técnicas metagenómicas de la técnica anterior no permiten tal análisis y resultados, por lo tanto, puede ser engañoso cuando se aplica al análisis de muestras de alimentos.

20 En tercer lugar, los métodos de análisis metagenómico de la técnica anterior pueden estar sesgados por la presencia de ADN contaminante presente en la muestra, que se amplifica junto con la secuencia diana de interés, pero que no proporciona información útil sobre la microbiota de la muestra. Por ejemplo, el ADN del cloroplasto o el ADN mitocondrial pueden co-amplificarse con la diana, donde la diana es el gen bien conocido de ARNr 16S.

25 En cuarto lugar, los métodos de análisis metagenómico de la técnica anterior pueden estar sesgados por la presencia de una gran cantidad de ADN de bacterias u otros microorganismos añadidos deliberadamente a los alimentos como un ingrediente o por la presencia de una especie dominante natural. Tal ADN puede enmascarar el ADN de interés en un análisis metagenómico.

30 Park EJ y cols. (Food microbiology, Academic Press Ltd., Londres, GB, Vol. 30, nº. 1, páginas 197-204, 2011) describen el análisis de la comunidad bacteriana durante la fermentación de diez tipos representativos de kimchi con pirosecuenciación con código de barras.

35 Carrol IM y cols., (Neurogastroenterology & Motility, Vol. 24, nº. 6, páginas 521-e248, 2012) describen alteraciones en la composición y diversidad de la microbiota intestinal en pacientes con síndrome de intestino irritable con predominio de diarrea.

Nocker A y cols., (International Microbiology, Springer Verlag Iberica, Barcelona, ES, Vol. 13, nº. 2, páginas 59-65, 2010) describen la discriminación entre células vivas y muertas en comunidades bacterianas de muestras de agua ambiental analizadas por pirosecuenciación 454.

40 Lundberg DS y cols., (Nature Methods, página 999, 2013) describen mejoras para la secuenciación de amplicones de ARN ribosómico (ARNr) 16S, una técnica fundamental en metagenómica.

Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar los métodos y herramientas de análisis metagenómico. La invención supera estos y otros problemas.

Resumen de la invención

45 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método de análisis metagenómico de alimentos fermentados de acuerdo con la reivindicación 1 de esta memoria.

50 Se describe un enfoque metagenómico integrado desarrollado para (I) identificar y (II) cuantificar el contenido de microorganismos de cualquier muestra, (III) distinguir si las secuencias de ADN observadas derivaban de gérmenes vivos o muertos, (IV) bloquear la conocida co-amplificación de ADN mitocondrial y plasmídico con cebadores bacterianos universales 16S, que podría representar más del 90% de las secuencias en algunas preparaciones de alimentos y, (V) bloquear la amplificación de gérmenes sobre-representados evitando que se observen gérmenes raros pero importantes.

Nuestro análisis metagenómico es un enfoque basado en la PCR dirigida al locus del ADNr altamente conservado que codifica para el gen de ADNr 16S. Este gen se usa comúnmente para la clasificación taxonómica bacteriana, ya que

contiene una sucesión de nueve regiones hipervariables con secuencias bien conservadas en medio. Las secuencias conservadas se usan para diseñar cebadores bacterianos universales que flanquean una región polimórfica elegida en función de su alto contenido de información para una identificación precisa de especies del contenido de microorganismos.

Se describe un método de análisis metagenómico de un alimento o muestra de heces para detectar y cuantificar microorganismos presentes en dicha muestra, el análisis comprende la amplificación de la región V2-V3 del ARNr bacteriano 16S en dicha muestra. En algunas realizaciones, se amplifica la región V1-V3 del ARNr bacteriano 16S. Los inventores han identificado que la región V2-V3 proporciona una excelente hipervariabilidad entre la flora común de descomposición de los alimentos y, por lo tanto, permite distinguir y cuantificar las bacterias que probablemente estén presentes en las muestras de alimentos.

En algunas realizaciones, el uso de V2-V3 del ARNr 16S, de acuerdo con la invención, en un análisis metagenómico, permite la identificación y distinción de secuencias de bacterias de las familias: *Acetobacteraceae*, *Aeromonadaceae*, *Bacteroidaceae*, *Burkholderiaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Comamonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Listeriaceae*, *Moraxellaceae*, *Neisseriaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Shewanellaceae*, *Streptococcaceae*, *Vibrionaceae* y *Xanthomonadaceae*.

En más detalle, la invención permite la detección y distinción de bacterias del género: *Acetobacteraceae* *Acetobacter*, *Acetobacteraceae* *Gluconacetobacter*, *Aeromonadaceae* *Aeromonas*, *Bacteroidaceae* *Bacteroides*, *Burkholderiaceae* *Burkholderia*, *Carnobacteriaceae* *Carnobacterium*, *Clostridiaceae* *Clostridium*, *Comamonadaceae* *Comamonas*, *Comamonadaceae* *Delftia*, *Enterobacteriaceae* *Escherichia*, *Enterobacteriaceae* *Pantoea*, *Enterobacteriaceae* *Serratia*, *Enterococcaceae* *Enterococcus*, *Chryseobacterium*, *Flavobacteriaceae* *Flavobacterium*, *Flavobacteriaceae* *Myroides*, *Lachnospiraceae* *Butyrivibrio*, *Lactobacillaceae* *Lactobacillus*, *Lactobacillaceae* *Pediococcus*, *Leuconostocaceae* *Leuconostoc*, *Leuconostocaceae* *Weissella*, *Listeriaceae* *Listeria*, *Moraxellaceae* *Acinetobacter*, *Moraxellaceae* *Psychrobacter*, *Neisseriaceae* *Alysia*, *Pseudoalteromonadaceae* *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonadaceae* *Pseudomonas*, *Shewanellaceae* *Shewanella*, *Streptococcaceae* *Lactococcus*, *Streptococcaceae* *Streptococcus*, *Vibrionaceae* *Aliivibrio*, *Vibrionaceae* *Photobacterium*, *Vibrionaceae* *Vibrio* y *Xanthomonadaceae* *Xanthomonas*.

El análisis metagenómico del ADN presente en una muestra puede proporcionar un análisis cuantitativo relativo de los diferentes microorganismos presentes. Sin embargo, en realizaciones preferidas, la cantidad de algunos, de cada uno de los microorganismos detectados, se normaliza y se expresa como un porcentaje de las unidades formadoras de colonias en la muestra. Esto puede ser importante en algunas realizaciones ya que las cantidades absolutas relativas de microorganismos en una muestra pueden no ser indicativas del potencial de deterioro de la muestra o del límite de vida útil. Por lo tanto, se puede cuantificar con precisión la calidad de una muestra de alimentos.

La normalización de la cantidad de microorganismos en una muestra se puede llevar a cabo determinando el porcentaje de microorganismos representado por al menos una unidad taxonómica operativa (OTU) en la muestra. Esto se puede combinar con la determinación del recuento de unidades formadoras de colonias (CFU) de la muestra y la normalización del porcentaje de organismos representados por dicha OTU en una proporción del recuento total de CFU viables de la muestra.

En algunas realizaciones se puede proporcionar una cuantificación adicional de ADN en la muestra, llevando a cabo una PCR cuantitativa específica de taxones (qPCR) en muestras después del análisis metagenómico. En tales realizaciones, los taxones elegidos para el análisis de qPCR son aquellos taxones de interés identificados por el análisis metagenómico. Se puede emplear cualquier forma de qPCR que use cualquier gen adecuado y cualquier proceso de detección y cuantificación. Por ejemplo, se puede amplificar el gen ARNr 16S en las pruebas de qPCR. Las diferentes pruebas de qPCR que se podrían emplear incluyen aquellas que implican un colorante intercalante y aquellas que implican un cebador o sonda indicador marcado. Por ejemplo, se puede realizar la qPCR usando una sonda de hidrólisis (por ejemplo, una sonda Taqman), una sonda de baliza molecular, un par de sondas de hibridación dual, un sistema de cebador de amplifluor, un sistema de cebador escorpión, un sistema de luz sobre la extensión o un sistema de cebador Qzyme.

En algunas realizaciones se amplifica la región V2-V3 del ARNr 16S en el análisis metagenómico como parte de un fragmento más grande del gen ARNr 16S. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se amplifica la región V1-V3.

En algunas realizaciones, se pueden usar uno o ambos cebadores que tienen secuencias que comprenden las secuencias de SEQ ID Nos 1 y/o 2 para amplificar la región V1-V3. Preferiblemente, se usa un par de cebadores que comprenden las secuencias de la SEQ ID N°. 1 y la SEQ ID N°. 2, respectivamente, para amplificar la región V1-V3. En algunas realizaciones, los cebadores consisten en las secuencias SEQ ID Nos. 1 y 2 respectivamente.

Tales cebadores se pueden modificar mediante la adición de adaptadores, secuencias clave, etiquetas o secuencias universales. En algunas realizaciones, al menos uno de los cebadores tiene la secuencia de SEQ ID N°. 82. En algunas realizaciones, al menos uno de los cebadores como la secuencia de SEQ ID N°. 83. En algunas realizaciones, se usa una pareja de cebadores que tienen las secuencias de las SEQ ID Nos. 82 y 83 respectivamente.

- Con el fin de mejorar el poder analítico del análisis metagenómico de una muestra, se describen métodos en los que se reduce la amplificación de ADN plasmídico o mitocondrial, y/o ADN seleccionado de microorganismos seleccionados. Se describe el uso de la fijación del ácido nucleico peptídico (PNA) en un método de análisis metagenómico de una muestra para reducir la amplificación de al menos uno de : i) ADN de cloroplasto presente en la muestra; ii) ADN mitocondrial presente en la muestra; o iii) ADN de uno o más microorganismos seleccionados que pueden estar presentes en la muestra.
- 5 La fijación del PNA puede comprender realizar un análisis metagenómico en presencia de un oligonucleótido de PNA que comprende una secuencia derivada de un gen de ARNr 16S de cloroplasto, preferiblemente una secuencia común a una pluralidad de genes de ARNr 16S.
- 10 El oligonucleótido de PNA puede comprender una secuencia común a al menos dos de, y, preferiblemente, a todas las secuencias de ARNr 16S de cloroplasto de las SEQ ID Nos 3 a 10, o común a al menos dos de, y, preferiblemente, a todas las secuencias de ARNr 16S de cloroplasto de las SEQ ID Nos. 18 a 25.
- El oligonucleótido de PNA puede tener una secuencia no encontrada en las secuencias bacterianas de ARNr 16S de al menos uno de, y, preferiblemente, todas de las SEQ ID Nos. 11 a 16, o tiene una secuencia no encontrada en las secuencias bacterianas de ARNr 16S de al menos una de, y, preferiblemente, todas de las SEQ ID Nos. 26 a 31.
- 15 El oligonucleótido de PNA puede comprender la secuencia de SEQ ID N°. 17. Preferiblemente el oligonucleótido de PNA consiste en la secuencia de SEQ ID N°. 17.
- El oligonucleótido de PNA puede comprender la secuencia de SEQ ID N°. 32. Preferiblemente, el oligonucleótido de PNA consiste en la secuencia de SEQ ID N°. 32.
- 20 El análisis metagenómico se puede llevar a cabo en presencia de una pareja de oligonucleótidos de PNA que comprenden o consisten en las secuencias de SEQ ID Nos. 17 y 32 respectivamente.
- La fijación del PNA puede comprender llevar a cabo análisis metagenómico en presencia de un oligonucleótido de PNA que comprende una secuencia derivada de un gen mitocondrial de ARNr 18S, preferiblemente una secuencia común con una pluralidad de genes mitocondriales de ARNr 18S.
- 25 El oligonucleótido de PNA puede comprender una secuencia común a al menos dos de, y, preferiblemente, de todas las secuencias mitocondriales de ARNr 18S de las SEQ ID Nos. 33 a 38.
- El oligonucleótido de PNA puede tener una secuencia no encontrada en las secuencias de cloroplasto de ARNr 16S, o de las secuencias bacterianas de ARNr 16S de al menos una de, y, preferiblemente todas las de las SEQ ID Nos. 39 a 47.
- 30 El oligonucleótido de PNA puede comprender la secuencia de SEQ ID N°. 48, opcionalmente en donde dicho oligonucleótido de PNA consiste en la secuencia de SEQ ID N°. 48.
- En algunas realizaciones, la fijación del PNA comprende llevar a cabo análisis metagenómico en presencia de un oligonucleótido de PNA que comprende una secuencia derivada de un gen bacteriano de ARNr 16S, preferiblemente una secuencia común a una pluralidad de genes bacterianos de ARNr 16S.
- 35 El oligonucleótido de PNA puede comprender una secuencia común a al menos dos de, y, preferiblemente a todas las secuencias bacterianas de ARNr 16S de las SEQ ID Nos. 49 a 61.
- El oligonucleótido de PNA puede tener una secuencia no encontrada en las secuencias bacterianas de ARNr 16S de al menos una de, y, preferiblemente de todas las de las SEQ ID Nos. 62 a 79.
- 40 En algunas realizaciones, el oligonucleótido de PNA comprende la secuencia de SEQ ID N°. 80, opcionalmente en donde dicho oligonucleótido de PNA consiste en la secuencia de SEQ ID N°. 80.
- El análisis metagenómico se puede llevar a cabo en presencia de cualquiera de dos, tres o cuatro de los oligonucleótidos de PNA descritos anteriormente, es decir, cualquiera de dos, tres o cuatro oligonucleótidos de PNA que comprenden o consisten en las secuencias de SEQ ID Nos. 17, 32, 48 o 80 respectivamente.
- 45 La invención además está dirigida a la capacidad de distinguir la amplificación de ADN de microorganismos vivos y muertos en un análisis metagenómico de una muestra. La invención logra esto mediante el uso del colorante intercalante de monoazida de propidio que penetra en las células muertas en la muestra antes de la extracción de ADN, se intercala con el ADN de esas células muertas y previene la amplificación posterior. Por lo tanto, la invención proporciona en un aspecto adicional un método de análisis metagenómico de una muestra, en donde la monoazida de propidio (PMA) se añade a la muestra antes de la extracción del ADN con el fin de reducir la amplificación posterior
- 50 de microorganismos no viables de ADN presentes en la muestra.

En todos y en cada uno de los usos de la fijación del PNA descritos en esta memoria o el uso del PMA como se describe en esta memoria, se puede llevar a cabo el análisis metagenómico de acuerdo con cualquier otra realización o aspecto de la invención descrita en esta memoria.

5 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un kit para el análisis metagenómico de una muestra de acuerdo con la reivindicación 11 en esta memoria.

Se describe un kit para el análisis metagenómico de una muestra que comprende uno o ambos cebadores que comprenden la secuencia de SEQ ID N°. 1 y/o de SEQ ID N°. 2, preferiblemente en donde los cebadores consisten en las secuencias de SEQ ID N°. 1 y/o de SEQ ID N°. 2.

10 En algunas realizaciones, los cebadores del kit se pueden modificar mediante la adición de un adaptador, secuencia clave, etiqueta o secuencia universal. Preferiblemente, los cebadores tienen las secuencias de las SEQ ID Nos. 82 y 83 respectivamente.

En algunas realizaciones, un kit de la invención comprende además un oligonucleótido de PNA que comprende la secuencia de SEQ ID N°. 80.

En algunas realizaciones, el kit de la invención puede comprender además PMA.

15 En algunas realizaciones, el kit de la invención puede comprender además un reactivo para el análisis metagenómico de una muestra, por ejemplo, una muestra de comida o heces.

La invención se describirá ahora con más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos ilustrativos y las figuras, en las que:

La Figura 1 muestra las nueve regiones hipervariables del gen ARNr 16S.

20 La Figura 2 muestra el contenido de información taxonómica a lo largo del gen completo de ARNr 16S.

La Figura 3 muestra la secuencia del gen de RNA ribosomal 16S de *Escherichia coli* (Número de acceso al Genbank AY804014.1, SEQ ID N°. 81) con anotación de las frecuencias de polimorfismo a lo largo del reino bacteriano.

La Figura 4 muestra la estadística de cebador de ambos cebadores y el tamaño del producto amplicon y las secuencias de los cebadores directo e inverso (SEQ ID N°. 1 y SEQ ID N°. 2, respectivamente).

25 La Figura 5 muestra un diagrama de flujo de las etapas implicadas en el análisis metagenómico.

La Figura 6 muestra un alineamiento de las secuencias del ARN 16S de cloroplasto con varias secuencias de ARNr 16S bacteriano y la secuencia de una primera fijación de PNA. Las secuencias tituladas Cloroplasto 1 a Cloroplasto 8 son las SEQ ID Nos. 3 a 10 respectivamente. Las SEQ ID Nos. de las otras secuencias son: SEQ ID N°. 11 de *Pseudomonas*; SEQ ID N°. 12 de *Xanthomonas*; SEQ ID N°. 13 de *E. coli*; SEQ ID N°. 14 de *Lactococcus*; SEQ ID N°. 15 de *Brochothrix*; SEQ ID N°. 16 de *Arthrobacter*. El oligonucleótido de PNA QP-PNacup es la SEQ ID N°. 17.

La Figura 7 muestra un alineamiento adicional de secuencias de ARN 16S de cloroplasto con varias secuencias de ARNr 16S bacteriano y la secuencia de una segunda fijación de PNA. Las secuencias tituladas Cloroplasto 1 a Cloroplasto 8 son las SEQ ID Nos. 18 a 25 respectivamente. Las SEQ ID Nos. de las otras secuencias son: SEQ ID N°. 26 de *Pseudomonas*; SEQ ID N°. 27 de *Xanthomonas*; SEQ ID N°. 28 de *E. coli*; SEQ ID N°. 29 de *Lactococcus*; SEQ ID N°. 30 de *Brochothrix*; SEQ ID N°. 31 de *Arthrobacter*. El oligonucleótido de PNA QP-PNacd es la SEQ ID N°. 32.

La Figura 8 muestra un alineamiento de secuencias de ARN 18S mitocondrial con varias secuencias de ARNr 16S bacteriano y la secuencia de una tercera fijación de PNA. Las SEQ ID Nos. de las secuencias mostradas son: SEQ ID N°. 33 de *Mito-Oryza-sativa*; SEQ ID N°. 34 de *Mito-Oryza-rufipogon*; SEQ ID N°. 35 de *Mito-Bambusa-oldhamii*; SEQ ID N°. 36 de *Mito-Triticum-aestivum*; SEQ ID N°. 37 de *Mito-S.cereale*; SEQ ID N°. 38 de *Mito-Sorghum-bicolor*; Cloroplasto E1 a Cloroplasto E4 son las SEQ ID Nos. 39 al 42 respectivamente; SEQ ID N°. 43 de *E. coli*; SEQ ID N°. 44 de *Lactococcus lactis*; SEQ ID N°. 45 de *Weissella*; SEQ ID N°. 46 de *Brochothrix thermosphacta*; SEQ ID N°. 47 de *Staphylococcus*. El oligonucleótido de PNA QP-PNAm es la SEQ ID N°. 48.

La Figura 9 muestra un alineamiento de secuencias de ARNr 16S de varias bacterias de los taxones lactococcus, junto con varias bacterias contaminantes y una cuarta fijación de PNA. Las SEQ ID Nos. de las secuencias mostradas son: SEQ ID N°. 49 de *Lactobacillus-delbrueckii-subsp*; SEQ ID N°. 50 de *Lactobacillus-delbrueckii-subsp*; SEQ ID N°. 51 de *Lactobacillus-amylovorus*; SEQ ID N°. 52 de *Lactobacillus-acidophilus*; SEQ ID N°. 53 de *Lactobacillus-amyolyticus*; SEQ ID N°. 54 de *Lactobacillus-acetotolerans*; SEQ ID N°. 55 de *Lactococcus-piscium*; SEQ ID N°. 56 de *Lactococcus-plantarum*; SEQ ID N°. 57 de *Lactococcus-chungangensis*; SEQ ID N°. 58 de *Lactococcus-raffinolactis*; SEQ ID N°. 59 de *Lactococcus-lactis-subsp-Hordn*; SEQ ID N°. 60 de *Lactococcus-lactis-subsp-Lacti*; SEQ ID N°. 61 de *Lactococcus-lactis-subsp-Cremo*; SEQ ID N°. 62 de *Streptococcus-Thermophilus-19-5*; SEQ ID N°. 63 de *Streptococcus-Thermophilus-UKPS2*; SEQ ID N°. 64 de *Streptococcus-Thermophilus-SM1*; SEQ ID N°. 65 de *Streptococcus-paraubensis*; SEQ ID N°. 66 de *Streptococcus-iniae*; SEQ ID N°. 67 de *Streptococcus-dysgalactiae-ssp*; SEQ ID N°. 68

de *Streptococcus-agalactiae*; SEQ ID N°. 69 de *Streptococcus-equi*; SEQ ID N°. 70 de *Streptococcus-oligofermentans*; SEQ ID N°. 71 de *Enterococcus-faecalis*; SEQ ID N°. 72 de *Lactobacillus-algidus*; SEQ ID N°. 73 de *Lactobacillus-frumenti*; SEQ ID N°. 74 de *Lactobacillus-panis*; SEQ ID N°. 75 de *Lactobacillus-fermentum*; SEQ ID N°. 76 de *Lactobacillus-oligofermentans*; SEQ ID N°. 77 de *Lactobacillus-plantarum*; SEQ ID N°. 78 de *Brevibacterium-linens*; SEQ ID N°. 79 de *Psychroflexus-sp*. El oligonucleótido de PNA PNA Lactococcus es la SEQ ID N°. 80.

La Figura 10 muestra el análisis metagenómico de muestras de filete tártaro.

La Figura 11 muestra las proporciones relativas de los taxones bacterianos principales (más del 1% de prevalencia) en muestras de filete tártaro.

La Figura 12 muestra una representación del recuento bacteriano relativo convertido de las OTUs en el recuento total de población. Solo son visibles los taxones cuya población alcanzó las 10.000 células por gramo. La barra en negrita indica el umbral de 6 logaritmos de CFUs por encima de los cuales sería notable la actividad de deterioro.

La Figura 13 muestra una comparación entre el contenido bacteriano de 3 probióticos con o sin tratamiento con PMA.

La Figura 14 muestra un análisis de un producto de pasta con el protocolo metagenómico estándar, con las 2 fijaciones de PNA específicas para evitar el ADN plasmídico, con el PNA dirigido contra el ADN mitocondrial y finalmente con las 3 fijaciones de PNA juntas.

La Figura 15 muestra los perfiles bacterianos de 2 quesos obtenidos con y sin el uso de una sonda de fijación de PNA de *Lactococcus*.

La Figura 16 muestra la amplificación de ADN a partir de muestras con y sin PNA. En ambos, los bacillus que están presentes en alta concentración no se amplifican en el perfil metagenómico con la unión del diseño del PNA específico frente a una secuencia de bacillus específica.

La Figura 17 muestra la amplificación de ADN de muestras con y sin PNA. En ambos, los bacillus que están presentes en alta concentración no se amplifican en el perfil metagenómico con la unión del diseño del PNA específico frente a una secuencia de bacillus específica.

La Figura 18 muestra el Análisis A que muestra el resultado metagenómico de un producto de yogur sin ningún uso de PNA donde más del 98% de las secuencias provienen de *Streptococcus thermophilus* (94,9%) y *Lactobacillus delbrueckii* (3,6%) dejando menos lugar para la observación de floras de contaminación real.

El Análisis B muestra el resultado metagenómico con el uso del PNA específico que bloquea la amplificación de cualquier ADN que se origine en *Streptococcus thermophilus*. En este caso, la segunda flora tecnológica está tomando la delantera con la presencia del 84,5% de las secuencias que se originan a partir de *Lactobacillus delbrueckii*.

El Análisis C muestra el resultado metagenómico con el uso del PNA específico que bloquea la amplificación de cualquier ADN que se origina de *Lactobacillus delbrueckii*. En este caso, la segunda flora tecnológica está tomando la delantera con la presencia del 98,6% de las secuencias que se originan a partir de *Streptococcus thermophilus*.

El Análisis D muestra el resultado metagenómico con el uso del PNA específico que bloquea la amplificación de cualquier ADN que se origina de ambas especies tecnológicas (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii*). Solo en este caso, la flora de interés es visible como resultado del análisis metagenómico del producto alimenticio.

La Figura 19 muestra una comparación de la flora total estimada mediante microbiología clásica y deducida mediante qPCR dirigida para *Leuconostoc* sp, *Lactobacillus* sp y *Lactococcus* sp.

La Figura 20 muestra (A): Estimación (en porcentaje) de las proporciones relativas de taxones principales mediante análisis metagenómico; (B): Estimación de cada concentración de taxón (en cfu/g) que usa la estimación de la flora total basada en la PCR cuantitativa.

Ejemplos

Materiales y métodos

Aislamiento de ADN

Se homogeneizan muestras de veinticinco gramos de producto cárnico durante 1 minuto en 225 ml en una bolsa de tempo (bioMérieux Basingstoke, Inglaterra, ref. 80015) con agua fisiológica estéril usando un aparato stomacher. Luego se usan 1,5 ml de la suspensión para la extracción de ADN genómico total usando una etapa de lisis casera antes del uso convencional del kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN, Crawley, UK). Luego se evalúa la concentración de ADN mediante cuantificación fluorométrica de dsADN usando PicoGreen.

Análisis metagenómico descriptivo

-Selección del Amplicon y diseños de cebadores

- Se ha aplicado ampliamente la secuenciación del gen de ARNr 16S independiente del cultivo para examinar la diversidad microbiana. Los genes de ARN ribosomal (ARNr) 16S bacteriano contienen nueve "regiones hipervariables" (V1-V9) (Figura 1) que demuestran una considerable diversidad de secuencia entre diferentes bacterias. Desafortunadamente, las regiones hipervariables de ARNr 16S exhiben diferentes grados de diversidad de secuencia, y ninguna región hipervariable es capaz de distinguir entre todas las bacterias. Desafortunadamente, las regiones hipervariables exhiben diferentes grados de diversidad de secuencia y ninguna región es capaz de distinguir entre todas las bacterias. Los genes de longitud completa de ARNr 16S (aproximadamente 1.500 pb) se pueden usar para la identificación taxonómica precisa en base a la diversidad de secuencia subyacente entre las diferentes especies bacterianas. Sin embargo, las actuales tecnologías de secuenciación de ADN de alto rendimiento solamente pueden producir fragmentos de ARNr 16S en lugar de genes de longitud completa. El desafío es obtener una representación de confianza de comunidades bacterianas a lo largo de la clasificación taxonómica de secuencias cortas de genes de ARNr 16S.
- Los inventores han descubierto la región más apropiada para el análisis metagenómico de alimentos. Se analizó el contenido de información del ARNr 16S para la asignación bacteriana a nivel de especie para diferentes regiones 16S a través de los taxones alimentarios más frecuentes.
- Para este propósito, las secuencias de referencia de la mayoría de los taxones bacterianos alimentarios se extrajeron de bases de datos abiertas (Silva) y cortadas en silicio en varios fragmentos que contenían las secuencias de una o dos regiones hipervariables contiguas. Después de comparar esos fragmentos de las bases de datos, se calcularon porcentajes de identificación taxonómica de las especies para cada región. Como se puede ver en la Figura 2, la región V2-V3 parece ser la más informativa con respecto a la flora común de descomposición de alimentos.
- Dado el pequeño número de pares de bases contenidos entre V1 y V2 y su bajo nivel de conservación, el cebador directo se diseñó aguas arriba de V1 (Figura 3).
- La presencia de polimorfismos en los cebadores seleccionados podría causar un fallo en la detección de algunas especies bacterianas y, en consecuencia, dar lugar a una imagen incompleta de la caracterización de la composición de la microbiota.
- Para este propósito, se han impulsado diferentes análisis "in silico" (datos no mostrados) y han dado lugar a la degeneración de 2 bases en el cebador directo de 16S (Figura 3).
- El diseño final del oligonucleótido incluyó adaptadores de secuenciación de titanio A o B de 454 Life Sciences (Roche Diagnostics, Vilvoorde, Bélgica) y una secuencia clave fusionada al extremo 5' de los cebadores diana específicos. Los identificadores multiplex (MIDs) solo se incluyen junto con los adaptadores A.
- Como se ve en la Figura 3, se han degenerado dos bases debido al polimorfismo observado a través de los géneros (resultados no mostrados).
- ### 35 Construcción de librería genómica de 16S y pirosecuenciación
- Las regiones bacterianas V1-V3 del gen de ARNr 16S se amplificaron mediante PCR usando un conjunto de cebadores de fusión caseros que dieron lugar a un amplicon de 625 pb de longitud. Para la química GS Junior Titanium, el cebador directo (5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGGAGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') (SEQ ID N°. 82) contiene el adaptador B, una secuencia clave (TCAG) y nuestro cebador directo bacteriano conservado (Roche, Basilea, Suiza). El cebador inverso (5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGNNNNNNNNNACCGCGGCTGCTGGCAC-3') (SEQ ID N°. 83) contiene el adaptador A, una secuencia clave (TCAG), diez códigos de barras de bases (Ns) para distinguir las muestras y nuestro cebador bacteriano inverso conservado.
- La mezcla de amplificación contenía 5 U de polimerasa de alta fidelidad FastStart (Roche Diagnostics, Vilvoorde, Bélgica), tampón de reacción de enzima 1x, 200 µM de dNTPs (Eurogentec, Lieja, Bélgica), 0,2 µM de cada cebador de fusión y ADN genómico en un volumen de 25 µl.
- Las condiciones de PCR son las siguientes: 4 min a 94°C, 25 ciclos de desnaturalización (15 s a 94°C), alineamiento (45 s a 56°C) y extensión (60 s a 72°C), seguido de una elongación final (8 min a 72°C). Estas amplificaciones se realizaron en un aparato de sistema de gradiente Ep Master (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).
- Los productos de PCR de 625 nucleótidos se evalúan mediante electroforesis en gel y se purifican usando el kit AMPure (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly, EE.UU.) para eliminar amplicones más cortos que 100 pb. Se recogieron cantidades iguales de cada uno de los productos de PCR y se amplificaron posteriormente mediante PCR de emulsión antes de la secuenciación. Luego se realiza la pirosecuenciación con el Secuenciador Junior Roche 454 GS (Roche, Basilea, Suiza) que usa el protocolo de pirosecuenciación masivamente en paralelo.

Análisis bioinformático

El procesamiento de imágenes y datos para la secuenciación de amplicones se realiza usando el paquete de software Genome Sequencer FLX System 2.3 (Roche, Basilea, Suiza). El programa Mothur se usa para la primera parte del análisis de las secuencias. Se descartan las secuencias con una longitud inferior a 450 bases. Se eliminan las secuencias con bases ambiguas u homopolímeros de más de diez nucleótidos y con una puntuación de calidad promedio inferior a 25 junto con las secuencias de marcador y de cebador. Las secuencias de muestras multiplexadas se asignan en función de la presencia de códigos de barras únicos asignados a cada muestra. Las secuencias que pasan el control de calidad están alineadas con la base de datos de alineamiento SILVA. Las secuencias quiméricas se detectan usando el comando quimera-slayer incluido en el paquete Mothur y se eliminan las quimeras potenciales. Las secuencias se pre-agrupan para reducir las unidades taxonómicas operacionales falsas producidas por secuencias erróneas. Se prepara una matriz de distancia, (distancia = 0,01) y se agrupan las secuencias en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) usando el algoritmo de vecino promedio. Se requiere un umbral de confianza del 80% para la asignación del nivel de género con la Base de datos SILVA. Las OTU que representan menos del 0,01% del número total de lecturas se consideran artefactos y se descartan.

En una segunda fase, las secuencias representativas de cada OTU se comparan con la base de datos microbiana de 16S del NCBI, por ejemplo, usando la herramienta de búsqueda de alineamiento local básico (BLASTN). Las asignaciones BLAST para cada OTU se asignan si la puntuación por defecto BLASTN es superior a 800. Las asignaciones de género obtenidas mediante Mothur y BLAST se comparan y se anotan como no clasificadas en un caso de desapareamiento. En casos de varios aciertos con una puntuación superior a 800, se prima el primer acierto con el recuento más alto para dar la especie bacteriana y se dan los 5 aciertos siguientes con una puntuación decreciente para obtener información complementaria sobre los resultados de BLAST.

Finalmente, se realiza la conversión y normalización de los datos. El número de secuencias de cada OTU se usa para calcular porcentajes. El porcentaje de cada OTU se convierte finalmente como una proporción del recuento viable total obtenido mediante análisis microbiológico clásico. La Figura 4 muestra el diagrama de flujo del análisis metagenómico de cualquier muestra.

La descripción completa del canal de flujo casero bioinformático se describe en el anexo 1 que se incorpora en esta memoria en su totalidad.

Análisis metagenómico semi-cuantitativo

Es de gran importancia la conversión de las proporciones de secuencia en unidades formadoras de colonias reales, especialmente para el sector alimentario. Para que un microorganismo induzca trastornos organolépticos, su concentración promedio debe alcanzar un mínimo de 10^{5-6} CFU por gramo de muestra. De hecho, decir que un organismo deteriorado representa incluso el 90 por ciento de las bacterias observadas no significa nada si está presente solo una pequeña cantidad de flora total en el producto. Por lo tanto, es importante la normalización de los números de secuencias en una estimación de log CFU.

Se realizan análisis microbiológicos usando un abordaje microbiológico clásico para la determinación del recuento bacteriano total y, en cierta medida, la enumeración de subpoblaciones bacterianas.

Se prepararon diluciones en serie de diez veces de las muestras homogeneizadas en agua con peptona y se plaquearon sobre el medio correspondiente. Se mide el recuento bacteriano total contando las unidades formadoras de colonia (CFUs) presentes en el agar de placa de recuento (PCA) (Oxoid, Dardilly, Francia) después de 48 h de incubación a 30°C. Los resultados se expresan en logaritmos de CFU por gramo de muestra.

El porcentaje de cada OTU se podría convertir entonces como una proporción del recuento viable total obtenido mediante análisis microbiológico clásico.

Como el análisis metagenómico es un método no basado en cultivo, el ADN derivado de bacterias muertas también se secuencia. La normalización de las secuencias en el recuento total de bacterias en crecimiento está introduciendo una subestimación. Para contrarrestar este sesgo se puede proporcionar una qPCR dirigida a diferentes taxones.

Discriminación entre bacterias muertas o vivas

Los análisis metagenómicos han revolucionado la detección microbiana. Sin embargo, el obstáculo para las técnicas basadas en el ADN es que el ADN en el entorno puede ser muy estable y puede persistir durante largos periodos de tiempo (días a semanas) después de la muerte celular. Como el ADN de microorganismos vivos o muertos se amplifica por PCR de la misma manera, esto dará lugar a una sobreestimación de las dianas microbianas. Uno de los requisitos previos para sacar conclusiones ecológicas derivadas de las huellas genéticas es que los perfiles comunitarios bacterianos reflejan la porción viva de la muestra de interés.

El tratamiento de la muestra con monoazida de propidio (PMA), un agente intercalante del ADN, antes de la extracción del ADN, evita satisfactoriamente la amplificación de las dianas de los microorganismos muertos.

La monoazida de propidio es un colorante impermeabilizante de membrana que penetra selectivamente en las células con membranas comprometidas, que se pueden considerar muertas. Una vez dentro de las células, el PMA se intercala en el ADN y se puede entre-cruzar covalentemente a él después de la exposición a la luz visible fuerte. Este complejo posterior inhibe fuertemente la amplificación por PCR adicional. Usando la PCR después del tratamiento con PMA, el análisis de las comunidades bacterianas se puede limitar teóricamente a células con membranas celulares intactas.

Se homogeneizan veinticinco gramos de muestra de alimento durante 1 minuto en 225 ml en una bolsa tempo (bioMérieux Basingstoke, Inglaterra, ref. 80015) con agua fisiológica estéril usando un aparato stomacher. Luego se centrifugan 1,5 ml de la suspensión. Después de descartar el sobrenadante, el sedimento se expone durante 10 minutos a tratamiento con PMA (50 μ M) en una habitación oscura.

Después de una ligera exposición a la luz de 5 minutos, la solución se centrifuga de nuevo y el sedimento se mezcla directamente con la solución de lisis antes de la extracción del ADN usando el Kit DNeasy Blood & Tissue (QUIAGEN, Crawley, Reino Unido).

Eliminación de la co-amplificación del plástido y del ADN mitocondrial

En el caso de muestras de alimentos preparados que contengan especias, hierbas, hongos, vegetales o frutas; cualquiera que sea el método de extracción usado para aislar el ADN a partir de estas comunidades bacterianas, el ADN microbiano extraído está generalmente contaminado con ADN de origen vegetal, en particular de cloroplastos y mitocondrias. El mismo problema se dará para cualquier análisis metagenómico 16S que esté encaminado a conocer acerca de microbiotas asociadas a plantas.

Dado que los genes de ARNr 16S de cloroplasto y 18S de mitocondria comparten una alta similitud de secuencia con secuencias de ARNr 16S bacteriano, la contaminación con ADN de plantas plantea un serio desafío para la aplicación de métodos basados en PCR para perfilar y cuantificar poblaciones bacterianas en entornos vegetales.

Sin un tratamiento específico, no es raro secuenciar más del 95% del ADN mitocondrial y cloroplástico en lugar del bacteriano al que realmente se dirige, lo que es bastante irrelevante y no deseado teniendo en cuenta el precio de un análisis metagenómico.

El PNA (Ácido Nucleico Peptídico), un análogo del ADN creado artificialmente, fue inventado por los Drs. Nielsen, Egholm, Berg y Buchardt en 1991. El anillo de ribosa fosfato del ADN se reemplazó por el esqueleto de poliamida en el PNA. A pesar de un cambio estructural radical, el PNA es capaz de una unión específica de secuencia en forma de hélice a su secuencia de ADN o ARN complementario. Debido a su superior afinidad de unión y estabilidad química/biológica, el PNA se ha aplicado ampliamente en el campo de la biología (www.panagen.com).

La técnica de fijación de PNA por PCR se desarrolló muy al principio para detectar SNP en baja abundancia. Por ejemplo, algunas células cancerosas mutantes pueden estar entre las células sanas en una biopsia de tejido. La fijación de PNA complementaria a la secuencia de tipo salvaje se hibrida específicamente con la de tipo salvaje y bloquea su amplificación por PCR a la vez que permite la amplificación de la secuencia mutante de emparejamiento imperfecto. Un único desemparejamiento de base es suficiente para discriminar la amplificación del tipo mutante del tipo salvaje.

Se han desarrollado dos fijaciones de PNA para bloquear la co-amplificación del ADN cloroplástico (Figuras 6 y 7).

Se ha desarrollado una tercera fijación de PNA para bloquear la co-amplificación del ADN mitocondrial (Figura 8).

El uso de esas 3 fijaciones de PNA en la mezcla de PCR permite amplificar principalmente el ADN 16S bacteriano deseado para el ensayo del perfil del microbioma.

Eliminación de taxones específicos no deseados excesivamente representados.

En algunos casos, la diversidad bacteriana puede estar oculta por un taxón excesivamente representado. Un ejemplo es la presencia de una gran cantidad de especies de *Lactococcus* en cualquier queso, ya que estos taxones se usan ampliamente como iniciadores en la producción de suero de mantequilla y queso. Se han diseñado sondas específicas de fijación de PNA para evitar la amplificación de cualquier bacteria que pertenezca a los taxones de *Lactococcus* con el fin de dar énfasis a la flora contaminante ambiental o a cualquier otra especie que contribuye a la textura, sabor u olor específicos del queso.

Sobre el mismo principio del diseño mitocondrial o plastídico, se encontró una secuencia de PNA entre nuestros cebadores metagenómicos V1-V3. La sonda de PNA se caracteriza por una secuencia conservada, por ejemplo, a lo largo de los taxones de *Lactococcus*, pero que muestra al menos un punto de mutación en comparación con las otras clases bacterianas observadas en productos de queso.

El alineamiento usado para la sonda de PNA de *Lactococcus* se representa en la Figura 9.

Resultados

Análisis metagenómico descriptivo

La presente invención se podría usar para una completa descripción de la flora total de cualquier muestra (alimentos, bebidas, heces, cualquier muestra biológica, suelo, agua o cualquier muestra ambiental).

5 Como un ejemplo de un análisis metagenómico descriptivo, se analizaron un conjunto de muestras de filete tártaro. De hecho, el filete tártaro es un plato popular de carne en Bélgica y en otros países europeos. Esta preparación de carne, debido a su naturaleza cruda, es altamente sensible a la descomposición bacteriana. Por lo tanto, una mejor comprensión del contenido bacteriano de este producto será esclarecedor para controlar el riesgo de descomposición. La metagenómica dirigida al ADN ribosómico 16S ha aparecido como una poderosa herramienta para estudiar la
10 composición bacteriana de muestras de alimentos. El objetivo de este estudio es identificar las poblaciones bacterianas del filete tártaro de diferentes orígenes a lo largo de su vida útil y determinar las principales especies bacterianas de descomposición.

Los resultados del análisis metagenómico en el filete tártaro se muestran en la Figura 10. Cada carril representa el 100% de la composición bacteriana de una muestra. Cada color corresponde a una cierta cantidad de secuencias
15 asignadas a ciertos taxones.

Se identificaron un total de 32 especies de bacteria dominantes en las muestras de filete tártaro mediante el análisis metagenómico. *Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus algidus*, *Lactococcus piscium*, *Leuconostoc gelidum*, *Photobacterium kishitani*, *Pseudomonas sp.* y *Psychrobacter urativorans* son las especies bacterianas más predominantes en las muestras y representan el 89% de las especies bacterianas detectadas.

20 *Brochothrix thermosphacta* y *Lactobacillus algidus* representan el 50% de todas las especies detectadas. *Brochothrix thermosphacta* se detecta principalmente en muestras de restaurantes (2,8-93,9%; n=4/6) y supermercados sin carnicería interna (0,3-83,2%; n=8/8). *Lactobacillus algidus* está presente en cada categoría, pero en baja proporción para restaurantes (2,3-5,5%; n=3/6). *Pseudomonas sp.*, *Brochothrix thermosphacta* o *Leuconostoc gelidum* están presentes en alta proporción en algunas muestras en el Día 0. Estas bacterias son bien conocidas por descomponer
25 el producto cárnico y las muestras que contienen estas bacterias en alta proporción son más susceptibles a descomponerse rápidamente. Algunas muestras (datos no mostrados) contienen un alto nivel de *Streptococcus* o *Enterobacter* como resultado probablemente de la contaminación cruzada durante el procesamiento de la carne.

Un alimento con una concentración superior a 6 log de CFU/g se considera generalmente en mal estado. Sin embargo, los resultados indican que algunas muestras tienen una concentración alrededor de este límite teórico y contiene una
30 alta proporción de bacterias que no se consideran bacterias de descomposición como *Lactobacillus algidus*.

El análisis metagenómico es una herramienta poderosa para identificar y para medir las proporciones relativas de especies de bacterias dominantes en el filete tártaro como en cualquier otra muestra alimenticia o no alimenticia.

Algunas especies bacterianas podrían ser indicadores de la calidad de la carne. La identificación de algunas especies bacterianas a lo largo del tiempo proporciona información sobre la evolución del proceso de descomposición.

35 Por lo tanto, el análisis metagenómico podría ser una herramienta adicional para controlar y gestionar la calidad de la carne, así como el riesgo de descomposición.

Análisis metagenómico semi-cuantitativo

Los principales inconvenientes del enfoque metagenómico son la relatividad de las proporciones de las poblaciones bacterianas. El siguiente ejemplo muestra que vincular estas proporciones a un recuento bacteriano estimado validado
40 es una herramienta real para calificar con precisión la calidad de una muestra de alimentos.

La Figura 11 muestra las proporciones relativas de bacterias encontradas en varias muestras de preparación de filete tártaro obtenidas de 2 restaurantes, 2 de vendedores de sándwiches y 2 de carnicerías. La secuenciación metagenómica y el análisis siguieron el mismo protocolo que el descrito anteriormente.

45 Las muestras están claramente pobladas con varias poblaciones con un dominio principal de las Bacterias de Ácido Láctico (LAB). El primer taxón es *Lactobacillus algidus*, una bacteria común que se encuentra con frecuencia en la carne de ternera almacenada en frío. Esta bacteria es homofermentaria y no se conoce por ninguna actividad de descomposición. Otra LAB es *Lactococcus piscium*, que nuevamente es una bacteria que no descompone.

Sin embargo, se sabe que otras poblaciones observadas se sabe que poseen actividad de descomposición cuando su población es lo suficientemente alta. Este es el caso de *Leuconostoc, sp.*, *Weissella sp.*, *Photobacterium phosphoreum* y *Brochothrix thermosphacta*.
50

Nos gustaría centrarnos en 2 muestras: Restaurant-2 y Sandwich-2. Estas muestras poseen los niveles más altos de contaminación por *Leuconostoc*, *Weissella* y *Photobacterium* en términos de proporciones relativas.

En base a estas observaciones, se podría argumentar que ambas muestras no son de buena calidad debido a la presencia de bacterias de descomposición (*Leuconostoc* le da un sabor a queso y viscoso a la carne). Pero, de hecho, estas proporciones relativas no reflejan el verdadero nivel de contaminación bacteriana.

Con el fin de visualizar los resultados desde el punto de vista de un microbiólogo de alimentos, se convierten las poblaciones OTU en log de CFUs estimados, tomando lo siguiente como una afirmación arbitraria: que la proporción de una OTU con toda la población de OTU estaba relacionada con la misma proporción de log de CFUs con el log del recuento total de placas (Figura 12). Al elegir matrices invadidas activamente por bacterias, estas se consideraron activas y, por lo tanto, representadas correctamente por las colonias crecidas en placas. Esto no es una elección canónica, pero permite la selección de poblaciones de OTU con un tamaño de más de 100.000 células; un umbral por encima del cual se dice que da lugar a la descomposición para la mayoría de las bacterias que alteran los alimentos en el límite de la vida útil.

En la muestra restaurant-2, están presentes varias bacterias de descomposición con un nivel de población por encima de 1.000.000 células por gramo. Dicho nivel tiene claramente un notable efecto sensorial. Por el contrario, la muestra Sandwich-2 está de hecho poco contaminada. Como el recuento total de flora de bacterias mesofílicas es inferior a 10.000 células por gramo, no aparece en el gráfico. Por lo tanto, la población de descomposición, en el caso de que estén presentes, no tendrá un efecto sensorial en el momento del muestreo.

Esta combinación permite ver claramente el verdadero impacto de la bacterias presentes.

Discriminación entre bacterias muertas o vivas

La metagenómica es una herramienta extremadamente valiosa para el control de calidad de los probióticos. La metodología de la invención permite la validación del contenido determinado de bacterias y/o levaduras del producto. Como se describió anteriormente, añadiendo un tratamiento con PMA a la muestra antes de la extracción del ADN, se puede evaluar la viabilidad de los microorganismos determinados.

Como se ve en la Figura 13, el tratamiento con PMA modifica las proporciones de algunos grupos de bacterias. Comparando entre una muestra tratada con PMA (Px^{PMA}) o no (Px), se puede ver que está disminuyendo la cantidad total de ciertas especies después de un tratamiento con PMA lo que significa que el análisis concluye positivamente sobre la presencia de dicho grupo bacteriano en el probiótico, pero subraya el hecho de que no está bien conservada la viabilidad de este grupo. De hecho, la disminución de la proporción indica que parte de esas bacterias están ya realmente muertas, lo que no es interesante, ya que el efecto de una ingesta de probióticos se deberá a la actividad lucrativa de las bacterias viables.

Eliminación de la co-amplificación del plástido y del ADN mitocondrial.

Dado que los genes de ARNr 16S de cloroplasto y 18S mitocondrial comparten una gran similitud de secuencia con las secuencias de ARNr bacteriano 16S, la contaminación con ADN de plantas plantea un serio desafío para la aplicación de métodos basados en la PCR para perfilar y cuantificar poblaciones bacterianas en entornos de plantas. Perfilar el microbioma de un producto alimenticio mezclado con hierbas, especias o cualquier vegetal es realmente desafiante sin un tratamiento específico que evite la amplificación de ADN cloroplástico o mitocondrial. Sin este tipo de tratamiento, las proporción de estos ADN "contaminantes" podría representar de hecho en algunos casos hasta el 99 por ciento de las lecturas obtenidas por la secuenciación de alto rendimiento. Teniendo en cuenta el coste de un análisis, secuenciar 9.900 secuencias de cada 10.000 que salen de las especias cuando se intenta analizar la diversidad bacteriana del producto no es definitivamente lo que se espera.

Se analiza un producto de este tipo en la fecha de producción, lo que significa normalmente con una baja cantidad de flora bacteriana. Sin ningún tratamiento, la mayoría de las secuencias de ADN provenían del ADN cloroplástico. Basándose en el alineamiento de ADN bacteriano y cloroplástico descrito anteriormente, se diseñaron 2 sondas de fijación de PNA para bloquear la amplificación de cualquier ADN cloroplástico durante la PCR específica de 16S. Usando esas sondas, no se amplificó el ADN de cloroplasto, pero la mayoría de las secuencias producidas fueron de ADN mitocondrial. Sobre las mismas bases, se diseñó después una sonda de fijación de PNA dirigida frente la amplificación de cualquier ADN mitocondrial. Combinando las 3 sondas de fijación de PNA, finalmente se pudo observar la diversidad bacteriana del producto (figura 14).

Sin esas sondas, la diversidad bacteriana de muchas muestras alimentarias y agrícolas es simplemente imposible de explorar.

Eliminación de taxones específicos sobre-representados.

En alimentos fermentados, el uso de un iniciador para inducir la fermentación a menudo da como resultado que los microorganismos que forman parte de la receta caracterizan una parte importante del ecosistema final del producto.

En caso de un problema de calidad que de lugar a un producto no conforme, es realmente importante ser capaz de identificar la diversidad microbiana a menudo oculta por los principales microorganismos iniciadores. En cuanto a los

productos vegetales, la invención está usando una sonda de fijación de PNA para bloquear la amplificación de esas floras “contaminantes” para poder ver la diversidad que hay detrás.

La Figura 15 representa los resultados de un análisis metagenómico de dos quesos en grano diferentes con o sin sonda PNA diseñada frente a la amplificación de los taxones de *Lactococcus* que representan la mayor proporción de su flora microbiana.

El *Lactococcus lactis* se introduce a través del iniciador para iniciar la fermentación del queso. En ambos quesos, el perfil bacteriano está dominado por el género de *Lactococcus* que impiden observar la diversidad subyacente. Como se puede ver claramente en la figura 15, el uso de la fijación de PNA diseñado para bloquear la amplificación de cualquier especie de *Lactococcus* tiene un efecto enorme en el perfil bacteriano observado. Cuando se usa PNA *Lactococcus* en los protocolos metagenómicos, el género de *Lactococcus* desapareció claramente a favor de la diversidad subyacente.

Conclusión

El análisis metagenómico ofrece una nueva herramienta para identificar los microorganismos presentes en los alimentos perecederos y su evolución en función de las condiciones ambientales. La información disponible a través del análisis metagenómico proporciona una clara imagen de la comunidad microbiana. Los estudios de ecología microbiana han demostrado que el mundo bacteriano de los alimentos es mucho más diverso que el grupo cultivable de bacterias estudiadas por medios de cultivo. Para el análisis metagenómico, parecían en gran medida suficientes de 3 a 5 mil secuencias para identificar y caracterizar la microflora de descomposición, aunque esto podría cambiar según el objetivo y el presupuesto de un estudio particular. Muchos fabricantes de alimentos, agencias gubernamentales, minoristas, laboratorios de calidad de distribución e investigadores usan medios de cultivo generales sin conocer con precisión las comunidades bacterianas dentro de los alimentos. En comparación con los métodos basados en cultivos en medios selectivos y técnicas de cultivo independientes anteriores, el análisis metagenómico combinado con la enumeración de la flora psicotrófica proporciona información más valiosa y su uso se debe considerar como una técnica para el control de calidad, para determinar con precisión la vida útil o para desarrollar nuevos productos alimenticios.

La invención se refiere a una herramienta analítica global que es especialmente útil en la industria alimentaria para identificar y cuantificar la microbiota de descomposición responsable de las alteraciones organolépticas de los alimentos.

El término metagenómica se podría definir como “la aplicación de técnicas genómicas modernas al estudio de comunidades de organismos microbianos directamente en sus entornos naturales, evitando la necesidad de aislamiento y cultivo de laboratorio de especies individuales”. La secuenciación convencional comienza con un cultivo de células idénticas como una fuente de ADN. Sin embargo, los primeros estudios revelaron que probablemente hay grandes grupos de microorganismos en muchos entornos que no se pueden cultivar y, por lo tanto, no se pueden secuenciar.

Para estudios ambientales, el interés en la metagenómica es analizar la diversidad bacteriana completa para determinar el tipo y la abundancia relativa de cualquier población presente en muestras heterogéneas, como el microbioma del suelo, marino o intestinal.

El análisis metagenómico de la presente invención se puede usar como una herramienta para la seguridad de los alimentos y/o para el control de calidad de los alimentos. Se describe un paquete de diferentes opciones analíticas que permiten que el análisis se centre solo en la flora de descomposición viable específica para un tipo particular de muestra de alimentos. Se pueden usar los métodos actuales si la muestra es : cruda o cocida; con o sin adición de especias o cualquier tipo de vegetales en la receta; con o sin el uso de un iniciador bacteriano para impulsar el proceso de fermentación; y/o con o sin flora protectora adicional para la extensión de la vida útil del producto.

A diferencia de las muestras ambientales, las muestras de alimentos están potencialmente sujetas a diferentes tratamientos como: tratamiento térmico, como cocción, esterilización, pasteurización.

Esos tratamientos térmicos matarán la mayor parte de la flora bacteriana presente en los alimentos, pero el ADN seguirá estando presente y se tendrá en cuenta en la descripción metagenómica de la posible causa de alteración del producto cocinado y podría inducir a una interpretación falsa del origen del deterioro.

Esos productos cocinados deberían estar más o menos libres de bacterias de descomposición, pero podrían estar sujetos a una contaminación posterior al tratamiento térmico.

Fermentación

Un cultivo iniciador se puede definir como una preparación microbiana de grandes cantidades de células de al menos un microorganismo que se añadirán a una materia prima para producir un alimento fermentado acelerando y dirigiendo su proceso de fermentación.

El uso de un cultivo iniciador acorta el proceso de fermentación y reduce el riesgo de fallo de fermentación.

- 5 Como consecuencia, si el producto requiere un análisis metagenómico de los alimentos fermentados (queso, kéfir, yogur, salami, vino, cerveza, masa madre,...) para verificar la contaminación o el deterioro de la flora, los métodos actuales pueden detectar secuencias de la flora de interés mediante el uso de PNA específicamente añadido en la reacción de PCR para bloquear la amplificación del ADN no deseado que se origina en la flora inicial.

Adición de flora para una conservación biológica de los alimentos

La adición de una gran cantidad de flora protectora, es decir, bacterias no asociadas a ningún proceso de descomposición en un tipo específico de muestra de alimentos contribuirá a disminuir el desarrollo de la flora de descomposición no intencionado.

- 10 La invención en este caso también dará la oportunidad de cancelar la amplificación del ADN que se origina en la flora protectora mediante el uso de PNA específicamente dirigido.

Adición de especias o vegetales en la receta

- 15 En los alimentos preparados con especias o vegetales añadidos en la receta, las secuencias de ADN bacteriano 16S de descomposición a menudo se ocultan bajo un exceso de secuencias producidas por la co-amplificación del ADN 16S mitocondrial y cloroplastídial.

La presencia de ADN mitocondrial y plastídico en ese tipo de muestras ha limitado la plena realización del potencial que ofrece la última generación de abordajes metagenómicos dedicados a la industria de alimentos y piensos.

En este caso la presente invención también dará también la oportunidad de cancelar la co-amplificación del ADN que se origina de especias y/o vegetales mediante el uso de PNA específicamente dirigido.

- 20 La presente invención proporciona la cuantificación de las bacterias de descomposición identificadas mediante el uso de nuestro análisis metagenómico.

- 25 El producto alimenticio contiene algunas bacterias que están implicadas en la descomposición, los llamados organismos de deterioro específicos (SSO) y otros que crecen sin causar cambios desagradables. Dependiendo de la matriz alimentaria, generalmente se supone que el proceso de descomposición comienza con una concentración de flora total superior a 5-6 log cfu/g. Los SSO pueden estar presentes a una baja concentración y, en ese caso, no son capaces de estropear el producto.

El resultado de un estudio metagenómico es la identificación de las diferentes bacterias observadas con sus proporciones relativas y, por lo tanto, solo es semi-cuantitativa.

- 30 Para interpretar correctamente los datos de la ultra-secuenciación, es crucial desarrollar un método paralelo para estimar la concentración de las diferentes especies bacterianas presentes en la muestra de alimentos.

Si se combina con los resultados de la enumeración de bacterias totales en medio de cultivo convencional, las proporciones relativas obtenidas por análisis metagenómico podrían dar una estimación de la proporción real de las diferentes especies observadas en términos de cfu por gramo de muestras.

- 35 Sin embargo, un inconveniente de los métodos microbiológicos convencionales radica en su incapacidad para detectar parte de la microflora existente presente en una matriz alimentaria lo que da lugar a una subestimación de los niveles de contaminación de microorganismos.

Para obtener un recuento preciso y fiable del perfil metagenómico, la presente invención se refiere al uso de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) recientemente desarrollada de los diversos taxones predominantemente presentes en muestras de alimentos.

- 40 La presente invención se refiere, por lo tanto, a la estimación de la cantidad real de los diferentes taxones identificados en el perfil metagenómico basado en la cuantificación real de uno de ellos mediante qPCR lo que da una estimación de la concentración bacteriana mucho más precisa y fiable.

PNA

- 45 Una flora alimentaria tecnológica es una flora que aporta más valor al producto (textura, sabor, acidificación, propiedades nutricionales, estabilización y conservación). Esta flora a menudo se añade durante el proceso de fabricación del alimento desarrollado en proporciones para lograr el resultado deseado en el producto acabado. En la industria alimentaria, añadir flora útil es un proceso muy común.

- 50 Este uso podría ser un problema cuando el origen del deterioro se analiza mediante el uso de un análisis metagenómico de alimentos. De hecho, si un alimento se ha alterado, el propósito del análisis metagenómico será el de proporcionar una descripción de la flora que podría ser responsable de esta alteración. En el caso de cualquier uso

de flora tecnológica durante el proceso, su ADN podría estar presente en más del 95% evitando que se observe el ADN de la flora del deterioro.

Por lo tanto, en un análisis metagenómico de alimentos, es importante el uso de PNA específico que actúa contra la amplificación de cualquier ADN “contaminante” que pertenece a cualquier flora tecnológica específica.

5 Bacilo PNA

A pesar de las cepas formadoras de esporas, se usa ampliamente el género bacillus como iniciador en la fermentación de alimentos. En África, están implicados en la fermentación de las judías el *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus Licheniformis*. En Japón, Natto, un alimento saludable tradicional único, se elabora mediante un proceso de fermentación añadiendo bacterias beneficiosas, *Bacillus natto*, a la soja.

- 10 La presente invención se refiere al desarrollo de un PNA que bloquea la amplificación de cualquier especie de bacillus usado como o dentro de una flora tecnológica. Se ha verificado la precisión del diseño del PNA con el diseñador de PNA de “Life Technologies” (<http://www6.appliedbiosystems.com/support/pnadesigner.cfm>).

Tabla 1

Resultados de cálculo	
Secuencia	Lys-AGA CTG GGA TAA CTC CG
Marcador N terminal	N: Ninguno
Marcador C terminal	C: Ninguno
Tm	[1 µM] = 80°C [1 nM] = 69°C [1 pM] = 59°C
Peso molecular	4782,27
Longitud	Residuos: 18 Bases: 17
% de Purinas	58,80%
Extensión de Purinas	4
Complementariedad	Moderada AGACTGGGATAACTCCG
Recomendaciones de diseño	Diseño adecuado

PNA de *Streptococcus thermophilus* + PNA de *Lactobacillus delbrueckii*

- 15 En la industria de procesamiento de la leche, se usan ampliamente los cultivos iniciadores y los fermentos particularmente en la fabricación de yogur para proporcionar un aspecto organoléptico particular (acidificación, sabor, textura, etc.).

De acuerdo con el Codex Alimentarius (A-11a de 1975), el yogur es un producto lácteo coagulado que se origina de la fermentación de leche fresca o de leche pasteurizada, con o sin otros ingredientes añadidos, gracias a la acción de *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y de *Streptococcus thermophilus*. Para que el producto acabado tenga la designación de “yogur”, esas 2 bacterias deben ser viables y abundantes en cantidad.

Sin embargo, la diversidad microbiana de tales productos puede estar enmascarada por la presencia de una gran proporción de esta flora tecnológica. De este modo, la investigación de la diversidad a través del uso de técnicas moleculares se puede ver obstaculizada por la muy alta concentración de estas dos floras tecnológicas. Por lo tanto, es necesario encontrar o desarrollar una técnica adecuada para sortear este problema. La manera más fácil de abordar este problema es la exclusión a nivel analítico de la flora tecnológica para que se pueda detectar otra flora presente a niveles más bajos y proporcionar un mapeo más completo de la alteración microbiana del producto. El aspecto negativo de este enfoque es que la mayoría (a veces > 99%) de las secuencias generadas provendrán de esas 2 bacterias y, por lo tanto, serán irrelevantes para explorar la alteración del producto.

- 30 Otra forma es bloquear la amplificación de ADN específica de esas 2 bacterias añadiendo 2 moléculas de PNA en la reacción de PCR.

Diseño de PNA de *Streptococcus thermophilus*

La precisión del diseño se ha verificado con el diseñador de PNA de "Life Technologies" (<http://www6.appliedbiosystems.com/support/pnadesigner.cfm>).

Tabla 2

Resultados de cálculo	
Secuencia	Cys-ACC CTG CCT TGT AGC GGG
Marcador N terminal	N: Ninguno
Marcador C terminal	C: Ninguno
T _m	[1 µM] = 84°C [1 nM] = 74°C [1 pM] = 64°C
Peso molecular	5015,5
Longitud	Residuos: 19 Bases: 18
% de Purinas	50,00%
Extensión de Purinas	3
Complementariedad	Baja AACCTGCCTTGTAGCGGG
Recomendaciones de diseño	Diseño adecuado

5 Diseño de PNA de *Lactobacillus delbrueckii*

La precisión del diseño se ha verificado con el diseñador de PNA de "Life Technologies" (<http://www6.appliedbiosystems.com/support/pnadesigner.cfm>).

Tabla 3

Resultados de cálculo	
Secuencia	Lys-TAA CAA CAT GAA TCG CAT
Marcador N terminal	N: Ninguno
Marcador C terminal	C: Ninguno
T _m	[1 µM] = 74°C [1 nM] = 65°C [1 pM] = 56°C
Peso molecular	5000,57
Longitud	Residuos: 19 Bases: 18
% de Purinas	55,60%
Extensión de Purinas	3
Complementariedad	Moderada TAACAAC CAT GAATCGAT
Recomendaciones de diseño	Diseño adecuado

El uso de PCR cuantitativa para deducir la flora total y los datos metagenómicos.

En los métodos de la técnica anterior, las proporciones relativas obtenidas mediante análisis metagenómico se han combinado con la enumeración de la flora total a partir de la microbiología clásica. Esto permite una estimación de la cantidad de los principales microorganismos presentes en una muestra de alimentos.

5 Sin embargo, estos métodos originan algunos resultados sesgados ya que no se pueden cultivar numerosos microorganismos. Los datos de enumeración, por lo tanto, son ampliamente desestimados.

Para obtener una enumeración precisa y fiable, es importante elaborar una técnica alternativa a la microbiología clásica mediante PCR cuantitativa para detectar y cuantificar algunos taxones principales a partir de los alimentos.

10 La lista de taxones para identificar mediante qPCR se ha obtenido a partir de análisis metagenómicos previos de datos en varias muestras de alimentos. Estos taxones se eligieron en función de su frecuencia de aparición y su impacto en las cualidades organolépticas de los alimentos.

Los 7 taxones principalmente presentes en los alimentos perecederos clásicos seleccionados son:

- *Lactobacillus* sp.

- *Lactococcus* sp.

- *Leuconostoc* sp.

15 - *Psychrobacter* sp.

- *Pseudomonas* sp.

- *Brochothrix* sp.

- *Photobacterium* sp.

20 Todos los genes diana usados para las 7 pruebas de qPCR pertenecen a los genes conservados de “mantenimiento”, presentes en una sola copia en el genoma bacteriano, una característica importante para el método de cuantificación, que permite el diseño de cebadores comunes de “género” y sondas de hidrólisis que permiten la estimación de la proporción relativa de una mayoría de las especies incluidas en un mismo género bacteriano (tabla 1).

Tabla 4: Listado de cebadores y sondas diseñados para las pruebas de qPCR que permiten la estimación de la proporción relativa de 7 taxones principalmente presentes en alimentos perecederos clásicos:

Género bacteriano diana	Gen diana	Cebadores	Secuencia
Lactobacillus sp	tuf	Lactobacillus-Tuf-F2	5'-GCYCACGTWGAATAYGAAAC-3'
		Lactobacillus-Tuf-R2	5'-CGDACTTCCATTTCAACYAAGTC-3'
		Lactobacillus-Tuf-FAM1	5'-TGTGGCATWGGRCATCAGTTGC-3'
Lactococcus sp	rpoA	Lactococcus-RecA-F2	5'-GCCGAAATYGATGGYGAAAT-3'
		Lactococcus-RecA-R2	5'-CAACTTTTTCACGCAATTGGTTG-3'
		Lactococcus-RecA-FAM4	5'-TGATGTCWCAAGCYATGCGTAAAC-3'
Leuconostoc sp	fus	Leuconostoc-Fus-F1	5'-TTCTTGTTCCATGAAATCCATTTG-3'
		Leuconostoc-Fus-R1	5'-GAATACCCACTAGAWCGTACAC-3'
		Leuconostoc-Fus-FAM1	5'-TGTGTTTCACCAATTTTGTGAATTTTACC-3'
Photobacterium sp	rpoA	photobacterium-rpoA-F1	5'-AATGCCAGGTTGTGCTG-3'
		photobacterium-rpoA-R1	5'-GACTTGTTTCAGAGTWAGAATWACTTC-3'
		photobacterium-rpoA-FAM1	5'-ATCGAYGGTGTGTTACATGAGTACA-3'
Pseudomonas sp	rpoA	Pseudo-rpo-F2	5'-GGCGTKATCGAYTCSGT-3'
		Pseudo-rpo-R2	5'-CAGMGGRCGCTGGTTGATG-3'
		Pseudo-rpo-FAM2	5'-TCGYGTTGCGAYGACGA-3'

Género bacteriano diana	Gen diana	Cebadores	Secuencia
Carnobacterium sp	rpoA	Carnobacterium-rpoA-F1	5'-ATTGGYGTATTACCAGTCGA-3'
		Carnobacterium-rpoA-R1	5'-AACCATCTGCCCATACATC-3'
		Carnobacterium-rpoA-FAM1	5'-CGATTTACACCCAGTTAGTCGT-3'
Brochothrix sp	tuf	Brochothrix-tuf-F1	5'-CAGTACCTTCTGGTAACGTG-3'
		Brochothrix-tuf-R1	5'-ACTTCTTTCAGTGCAGAAGTATAC-3'
		Brochothrix-tuf-FAM	5'-TATTATCTAAAGAAGAGGGTGGACGTCATA-3'

Protocolo de PCR convencional

La PCR en tiempo real se realizó usando el sistema LightCycler 480 (Roche, Basilea, Suiza). Las mezclas de reacción de PCR se colocaron en un volumen final de 12 µl que contenía 6 µl de mezcla maestra de sonda LC480 (Roche, Basilea, Suiza), 2 µl de ADN molde (a 5 ng/µl), 0,25 µl de pareja de cebadores (10 µM cada uno), 0,125 µl de sonda Taqman (10 µM). Las condiciones de reacción incluyeron la etapa de iniciación durante 10 min a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. El sistema a tiempo real se suministra con el software de Lightcycler 480 versión 1.5 que usa algoritmos únicos de Roche para un análisis de datos automatizado altamente preciso y robusto. Las diluciones en serie (número de copias de 10^6 a 1) de ADN estándar se usan para determinar el número de bacterias. Se usó la media del Umbral de Ciclo (CT) en las tres repeticiones con el fin de estimar la carga de poblaciones de bacterias diana presentes en la muestra.

Prueba de especificidad y sensibilidad

Se probó la especificidad de cada género de qPCR en especies bacterianas cercanas que pueden estar presentes en los alimentos para verificar si cada prueba no interactúa con otras especies bacterianas filogenéticamente cercanas (tabla 5).

En la prueba de sensibilidad de los cebadores y sondas específicos, se examinaron las amplificaciones por PCR entre cebadores específicos y diluciones de diez en serie de ADN aislados del cultivo puro de 3 especies diana que pertenecen al género bacteriano diana que varía de 10^6 a 10 números de copia. Se construyeron las curvas estándar para los 6 sistemas de detección usando el valor de C_p obtenido de la concentración de ADN correspondiente.

Tabla 5: Prueba de sensibilidad de validación de la qPCR de género (A); prueba de especificidad (ND = no detectado).

(A)

	Números de copia de ADN probado	Valor C_p promedio $\pm$ SD para <i>Brochothrix thermosphacta</i>		Números de copia de ADN probado	Valor C_p promedio $\pm$ SD para <i>Carnobacterium sp</i> <i>P. angustum</i>
Diluciones seriadas de 10 veces de ADNs	1,00E+06	19,32 $\pm$ 0,04	Diluciones seriadas de 10 veces de ADNs	1,00E+06	19,05 $\pm$ 0,22
	1,00E+05	23,46 $\pm$ 0,06		1,00E+05	22,50 $\pm$ 0,23
	1,00E+04	27,04 $\pm$ 0,29		1,00E+04	25,53 $\pm$ 0,13
	1,00E+03	31,09 $\pm$ 0,09		1,00E+03	29,41 $\pm$ 0,07
	1,00E+02	35,27 $\pm$ 0,55		1,00E+02	32,57 $\pm$ 0,11
	1,00E+01	39 $\pm$ 0,9		1,00E+01	36,26 $\pm$ 0,75
	1,00E+00	ND		1,00E+00	38,5 $\pm$ 1,2
Parámetros de regresión lineal	eficiencia	2,014	Parámetros de regresión lineal	eficiencia	1,959
	pendiente	-3,29		pendiente	-3,425
	Punto de corte Y	38,78		Punto de corte Y	39,6

	Números de copia de ADN probado	Valor Cp promedio $\pm$ SD para <i>Carnobacterium</i> sp <i>C. maltaromaticum</i>		
Diluciones seriadas de 10 veces de ADNs	1,00E+06	18,05 $\pm$ 0,011		
	1,00E+05	21,67 $\pm$ 0,08		
	1,00E+04	25,27 $\pm$ 0,04		
	1,00E+03	28,69 $\pm$ 0,03		
	1,00E+02	31,8 $\pm$ 0,1		
	1,00E+01	34,28 $\pm$ 0,68		
	1,00E+00	38 (1/3)		
Parámetros de regresión lineal	eficiencia	1,907		
	pendiente	-3,56		
	Punto de corte Y	39,47		
	Números de copia de ADN probado	Valor Cp promedio $\pm$ SD para <i>Leuconostoc</i> sp		
		<i>L. citreum</i>	<i>L. gelidum</i>	<i>L. mesenteroides</i>
Diluciones seriadas de 10 veces de ADNs	1,00E+06	18,52 $\pm$ 0,05	17,52 $\pm$ 0,02	16,89 $\pm$ 0,13
	1,00E+05	21,84 $\pm$ 0,05	21,08 $\pm$ 0,12	20,7 $\pm$ 0,02
	1,00E+04	25,56 $\pm$ 0,17	24,33 $\pm$ 0,13	23,99 $\pm$ 0,04
	1,00E+03	28,52 $\pm$ 0,08	27,67 $\pm$ 0,13	27,44 $\pm$ 0,13
	1,00E+02	31,06 $\pm$ 0,09	30,51 $\pm$ 0,18	30,33 $\pm$ 0,26
	1,00E+01	33,7 $\pm$ 0,14	32,55 $\pm$ 0,19	31,8 $\pm$ 0,29
	1,00E+00	ND	ND	ND
Parámetros de regresión lineal	eficiencia	1,997	1,997	1,944
	pendiente	-3,33	-3,382	-3,464
	punto de corte Y	38,56	37,85	37,83

	Números de copia de ADN probado	Valor Cp promedio $\pm$ SD para <i>Lactobacillus</i> sp <i>C. maltaromaticum</i>		
		<i>L. acidophilus</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. casei</i>
Diluciones seriadas de 10 veces de ADNs	1,00E+06	19,01 $\pm$ 0,12	20,5 $\pm$ 0,12	17,79 $\pm$ 0,13
	1,00E+05	22,45 $\pm$ 0,13	23,89 $\pm$ 0,22	21,45 $\pm$ 0,1
	1,00E+04	25,82 $\pm$ 0,15	27,31 $\pm$ 0,04	24,8 $\pm$ 0,05
	1,00E+03	29,14 $\pm$ 0,1	30,36 $\pm$ 0,34	27,88 $\pm$ 0,21
	1,00E+02	32,47 $\pm$ 0,44	33,76 $\pm$ 1,04	31,33 $\pm$ 0,16
	1,00E+01	36,43 $\pm$ 0,73	35,43 $\pm$ 1,17	33,39 $\pm$ 0,83
	1,00E+00	38,32 $\pm$ 0,2	38,3 8 (1/3)	ND
Parámetros de regresión lineal	eficiencia	1,99	1,983	2,05
	pendiente	-3,346	-3,364	-3,2
	Punto de corte Y	39,18	40,7	36,95
	Números de copia de ADN probado	Valor Cp promedio $\pm$ SD para <i>Lactococcus</i> sp		
		<i>L. raffinolactis</i>	<i>L. lactis lacus</i>	<i>L. lactis cremoris</i>
Diluciones seriadas de 10 veces de ADNs	1,00E+06	16,9 $\pm$ 0,12	18,18 $\pm$ 0,01	18,26 $\pm$ 0,09
	1,00E+05	20,25 $\pm$ 0,07	21,54 $\pm$ 0,13	21,75 $\pm$ 0,05
	1,00E+04	23,67 $\pm$ 0,07	24,81 $\pm$ 0,12	25,23 $\pm$ 0,13
	1,00E+03	26,77 $\pm$ 0,05	28,18 $\pm$ 0,11	27,81 $\pm$ 0,1
	1,00E+02	30,13 $\pm$ 0,11	31,47 $\pm$ 0,36	32,33 $\pm$ 0,07
	1,00E+01	33 $\pm$ 0,09	35 $\pm$ 0,19	34,49 $\pm$ 0,4
	1,00E+00	ND	ND	ND
Parámetros de regresión lineal	eficiencia	2	2	1,954
	pendiente	-3,299	-3,321	-3,438
	punto de corte Y	36,7	38,12	38,83

(B)

	Valor Cp promedio $\pm$ SD						
Especies bacterianas cercanas probadas	<i>Brochothrix</i> sp	<i>Carnobacteriu</i> m sp	<i>Leuconostoc</i> sp	<i>Photobacterium</i> sp	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Lactococcus</i> sp	<i>Pseudomonas</i> sp
<i>C. maltaromaticum</i>	ND	17,78 $\pm$ 0,45	ND	ND	ND	ND	ND
Control negativo	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Extracción en blanco	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Leuconostoc gelidum</i>	ND	ND	17,52 $\pm$ 0,02	ND	ND	ND	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19,71 $\pm$ 0,01
<i>Pseudomonas fragi</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20,5 $\pm$ 0,03
<i>Brochothrix thermophacta</i>	19,74 $\pm$ 0,02	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Photobacterium angustum</i>	ND	ND	ND	19,5 $\pm$ 0,22	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus sakei</i>	ND	ND	ND	ND	21,8 $\pm$ 0,03	ND	ND
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ND	ND	ND	ND	19 $\pm$ 0,02	ND	ND
<i>Lactobacillus greminis</i>	ND	ND	ND	ND	20,06 $\pm$ 0,09	ND	ND
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	ND	ND	ND	ND	ND	16,2 $\pm$ 0,09	ND
<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	ND	ND	ND	ND	ND	18,26 $\pm$ 0,09	ND
<i>Lactococcus piscium</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Leuconostoc citrium</i>	ND	ND	18,52 $\pm$ 0,05	ND	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus salivarius</i>	ND	ND	ND	ND	18,33 $\pm$ 0,31	ND	ND
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	ND	ND	ND	ND	ND	20,86 $\pm$ 0,1	ND
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ND	ND	18,05 $\pm$ 0,35	ND	ND	ND	ND
<i>Lactococcus oligofermentans</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Serratia</i> sp	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Enterobacter</i> sp	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20,14 $\pm$ 0,16
<i>Pseudomonas veronii</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19,55 $\pm$ 0,27
<i>Pseudomonas poae</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19,75 $\pm$ 0,16
<i>Pseudomonas deceptioneensis</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19,37 $\pm$ 0,26
<i>Pseudomonas gessardii</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20 $\pm$ 0,09

Correlación entre la microbiología clásica, metagenómica dirigida y datos cuantitativos: ejemplo sobre muestras de productos alimenticios reales.

- 5 Se analizaron 6 matrices contaminadas naturalmente de diferentes orígenes (pudin blanco, crepes, hamburguesa, jamón, pasta, queso) por microbiología, análisis metagenómico y PCR cuantitativa para estimar la proporción de algunos taxones principales (*Carnobacterium* sp, *Leuconostoc* sp, *Photobacterium* sp, *Brochothrix* sp, *Pseudomonas* sp, *Lactococcus* sp y *Lactobacillus* sp). Entre las 7 pruebas de taxones en qPCR, se detectan 3 en todas las 6 muestras de alimentos (*Leuconostoc* sp, *Lactococcus* sp y *Lactobacillus* sp). Por lo tanto, la flora bacteriana total se podría deducir usando estos datos de qPCR. La flora total estimada mediante microbiología clásica siempre se estima
- 10 erróneamente en comparación con la flora total deducida por qPCR (figura 19). El método de qPCR permite estimar con mayor precisión la flora bacteriana total (incluidas las bacterias cultivadas o no).

- Esta deducción de la flora total por el método de qPCR permitirá cuantificar con mayor precisión todos los taxones identificados por el análisis metagenómico (figura 20). La figura 20 (A) muestra el perfil bacteriano obtenido por análisis metagenómico para las 6 muestras de alimentos. Estos análisis no permiten estimar la concentración de cada taxón denominado en unidades formadoras de colonias por gramo de matriz (cfu/g). La estimación de la flora total por PCR cuantitativa combinada con el porcentaje de lecturas del análisis genómico permite obtener una estimación de cada concentración de taxón en unidades formadoras de colonias por gramo de matriz (Figura 20 (B)).
- 15

La invención no está limitada por los ejemplos o figuras proporcionados en esta memoria. El experto es capaz de concebir alternativas para las diversas secuencias, herramientas y métodos mencionados en esta especificación. La invención está limitada solamente por el alcance de las reivindicaciones.

Listado de secuencias

5	<110> Université de Liege and Quality Partner s.a.	
	<120> Análisis metagenómico de muestras	
	<130> Daub2013-54	
	<150> EP13199610.0	
	<151> 24-12-2013	
10	<150> EP14150903.4	
	<151> 13-01-2014	
	<160> 107	
	<170> PatentIn version 3.5	
15	<210> 1	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
20	<400> 1	
	gagagtttga tymtggctca g	21
	<210> 2	
	<211> 17	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 2	
	accgcggctg ctggcac	17
30	<210> 3	
	<211> 82	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
35	<223> Secuencia de consenso	
	<400> 3	
	gagagtttga tcctggctca ggatgaacgc tggcggcatg cttaacacat gcaagtcgga	60
	cggaagtgg tgtttccagt gg	82
	<210> 4	
	<211> 82	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de consenso	
	<400> 4	

		gagagttcga tcctggctca ggatgaacgc tggcggcatg cttaacacat gcaagtcgga	60
		cggaagtgg tgtttccagt gg	82
		<210> 5	
		<211> 82	
		<212> ADN	
5		<213> Secuencia Artificial	
		<220>	
		<223> Secuencia de consenso	
		<400> 5	
		gagagtttga tcatggctca ggatgaacgc tggcggcatg cttaacacat gcaagtcgga	60
		cggaagtgg tgtttccagt gg	82
10		<210> 6	
		<211> 82	
		<212> ADN	
		<213> Secuencia Artificial	
		<220>	
15		<223> Secuencia de consenso	
		<400> 6	
		gagagtttga tcatggctca ggatgaacgc tggcggcatg cttaacacat gcaagtcgga	60
		cggaagtgg tgtttccagt gg	82
		<210> 7	
		<211> 82	
20		<212> ADN	
		<213> Secuencia Artificial	
		<220>	
		<223> Secuencia de consenso	
		<400> 7	
		gagagtttga tcatggctca ggatgaacgc tggcggcatg cttaacacat gcaagtcgga	60
25		cggaagtgg tgtttccagt gg	82
		<210> 8	
		<211> 82	
		<212> ADN	
		<213> Secuencia Artificial	
30		<220>	
		<223> Secuencia de consenso	
		<400> 8	
		gagagtttga tcatggctca ggatgaacgc tggcggcatg cttaacacat gcaagtcgga	60
		cggaagtgg tgtttccagt gg	82
		<210> 9	
35		<211> 82	
		<212> ADN	
		<213> Secuencia Artificial	
		<220>	
		<223> Secuencia de consenso	
40		<400> 9	

		gagagtttga tcatggctca ggatgaacgc tggcggcatg cttaacacat gcaagtcgaa	60
		cggaagtgg tgttccagt gg	82
	<210>	10	
	<211>	82	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Secuencia de consenso	
	<400>	10	
		gagagtttga tcatggctca ggatgaacgc tggcggcatg cttaacacat gcaagtcgaa	60
		cggaagtgg tgttccagt gg	82
10	<210>	11	
	<211>	94	
	<212>	ADN	
	<213>	Pseudomonas	
	<400>	11	
		gagagtttga tcatggctca gattgaacgc tggcggcagg cctaacacat gtcaagtcga	60
15		gcggatgaga agagcttgct cttcgattca gcgg	94
	<210>	12	
	<211>	101	
	<212>	ADN	
	<213>	Xanthomonas	
20	<400>	12	
		gagagtttga tcatggctca gattgaacgc tggcggcagg cctaacacat gcaagtcgaa	60
		cggcagcggg taggaagctt gcttcctatg ccggcgagtg g	101
	<210>	13	
	<211>	99	
	<212>	ADN	
25	<213>	Escherichia coli	
	<400>	13	
		gagagtttga tcatggctca gattgaacgc tggcggcagg cctaacacat gcaagtcgaa	60
		cggtaacagg aagcagcttg ctgtttcgct gacgagtgg	99
	<210>	14	
	<211>	112	
30	<212>	ADN	
	<213>	Lactococcus	
	<400>	14	
		gagagtttga tcctggctca ggatgaacgc tggcggcgtg cctaatacat gcaagtcgaa	60
		cgaaacttct ttatcaccga gtgcttgac tcaccgataa agagttgagt gg	112
	<210>	15	
35	<211>	97	
	<212>	ADN	
	<213>	Brochothrix	
	<400>	15	

		gagagtttga tcctggctca ggacgaacgc tggcggcgtg cctaatacat gcaagtcgaa	60
		cgaacggata aagagcttgc tcttttgaag ttagtgg	97
		<210> 16	
		<211> 91	
		<212> ADN	
5		<213> Arthrobacter	
		<400> 16	
		gagagtttga tcatggctca ggatgaacgc tggcggcgtg cttaacacat gcaagtcgaa	60
		cgatgaacct cacttgtggg gggattagt g	91
		<210> 17	
		<211> 17	
10		<212> ADN	
		<213> Secuencia Artificial	
		<220>	
		<223> Cebador	
		<400> 17	
15		gaagtgggtg ttccagt 17	
		<210> 18	
		<211> 65	
		<212> ADN	
		<213> Secuencia Artificial	
20		<220>	
		<223> Secuencia de consenso	
		<400> 18	
		ggagaagaag caatgacggt atctggggaa taagcatcgg ctaactctgt gccagcagcc	60
		gcggt	65
		<210> 19	
25		<211> 65	
		<212> ADN	
		<213> Secuencia Artificial	
		<220>	
		<223> Secuencia de consenso	
30		<400> 19	
		ggagaagaag caatgacggt atctggggaa taagcatcgg ctaactctgt gccagcagcc	60
		gcggt	65
		<210> 20	
		<211> 65	
		<212> ADN	
35		<213> Secuencia Artificial	
		<220>	
		<223> Secuencia de consenso	
		<400> 20	
		ggagaagaag caatgacggt atctggggaa taagcatcgg ctaactctgt gccagcagcc	60
		gcggt	65
40		<210> 21	

	<211>	65	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
5	<223>	Secuencia de consenso	
	<400>	21	
	ggagaagaag caatgacggt atctggggaa taagcatcgg ctaactctgt gccagcagcc		60
	gcggt		65
	<210>	22	
	<211>	65	
10	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Secuencia de consenso	
	<400>	22	
	ggagaagaag caatgacggt atctggggaa taagcatcgg ctaactctgt gccagcagcc		60
15	gcggt		65
	<210>	23	
	<211>	65	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
20	<220>		
	<223>	Secuencia de consenso	
	<400>	23	
	agagaagaag caatgacggt atctggggaa taagcatcgg ctaactctgt gccagcagcc		60
	gcggt		65
	<210>	24	
25	<211>	65	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Secuencia de consenso	
30	<400>	24	
	ggagaagaaa caatgacggt atctgaggaa taagcatcgg ctaactctgt gccagcagcc		60
	gcggt		65
	<210>	25	
	<211>	65	
	<212>	ADN	
35	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Secuencia de consenso	
	<400>	25	
	ggagaagaaa caatgacggt atctgaggaa taagcatcgg ctaactccgt gccagcagcc		60
	gcggt		65

	<210>	26		
	<211>	88		
	<212>	ADN		
	<213>	Pseudomonas		
5	<400>	26		
		tgggaggaag ggcagtaagc gaataccttg ctgttttgac gttaccgaca gaataagcac	60	
		cggctaactc tgtgccagca gccgcggt	88	
	<210>	27		
	<211>	88		
	<212>	ADN		
10	<213>	Xanthomonas		
	<400>	27		
		ggggaagaaa tcctgctggc taatatccgg cggggatgac ggtacccaaa gaataagcac	60	
		cggctaactt cgtgccagca gccgcggt	88	
	<210>	28		
	<211>	88		
15	<212>	ADN		
	<213>	Escherichia coli		
	<400>	28		
		ggggaggaag ggagtaaagt taataccttt gctcattgac gttaccgca gaagaagcac	60	
		cggctaactc cgtgccagca gccgcggt	88	
	<210>	29		
20	<211>	88		
	<212>	ADN		
	<213>	Lactococcus		
	<400>	29		
		agagaagaaa gtgcgtgaga gtaactgttc acgtttcgac ggtatctaac cagaaagcca	60	
		cggctaacta cgtgccagca gccgcggt	88	
25	<210>	30		
	<211>	88		
	<212>	ADN		
	<213>	Brochothrix		
	<220>			
30	<221>	característica_nueva		
	<222>	(34)..(34)		
	<223>	n es a, c, g, o t		
	<400>	30		
		agagaagaac atgggtgaga gtaactgttc accncttgac ggtatctaac cagaaagcca	60	
		cggctaacta cgtgccagca gccgcggt	88	
35	<210>	31		
	<211>	79		
	<212>	ADN		
	<213>	Arthrobacter		
	<400>	31		

	agggtagaag cctgtcttag gggtcggtga cggtagctgc agaagaagcg cgggctaact	60
	acgtgccagc agccgcggt	79
	<210> 32	
	<211> 17	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 32	
	arcaatgacg gtatctg 17	
10	<210> 33	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Oryza sativa	
	<400> 33	
15	ctgtttgatg agcctgcgta gtattaggta gttggtcggg taaag	45
	<210> 34	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Oryza rufipogon	
20	<400> 34	
	ctgtttgatg agcctgcgta gtattaggta gttggtcggg taaag	45
	<210> 35	
	<211> 45	
	<212> ADN	
25	<213> Bambusa oldhamii	
	<400> 35	
	ctgtttgatg agcctgcgta gtattaggta gttggtcagg taaag	45
	<210> 36	
	<211> 45	
30	<212> ADN	
	<213> Triticum aestivum	
	<400> 36	
	ctgtttgatg agcctgcgta gtattaggta gttggtcagg taaag	45
	<210> 37	
35	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> S. cereale	
	<400> 37	
	ctgtttgatg agcctgcgta gtattaggta gttggtcagg taaag	45
40	<210> 38	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Sorghum bicolor	
	<400> 38	
45	ctgtttgatg agcctgcgta gtattaggta gttggtcagg taaag	45
	<210> 39	
	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	

	<223>	Secuencia de consenso	
	<400>	39	
		gcccaggag gggctcgcgt ctgattagct agtgggtgag gcaata	46
5	<210>	40	
	<211>	46	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Secuencia de consenso	
10	<400>	40	
		gcccaggag gggctcgcgt ctgattagct agtgggtgag gcaata	46
	<210>	41	
	<211>	46	
	<212>	ADN	
15	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Secuencia de consenso	
	<400>	41	
		gccaaggag gggctcgcgt ctgattagct agtgggtgag gcaata	46
20	<210>	42	
	<211>	46	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
25	<223>	Secuencia de consenso	
	<400>	42	
		gccaaggag gggctcgcgt ctgattagct agtgggtgag gcaata	46
	<210>	43	
	<211>	47	
30	<212>	ADN	
	<213>	Escherichia coli	
	<400>	43	
		tgccatcgga tgtgccaga tgggattagc ttgtggtgg ggtaacg	47
	<210>	44	
35	<211>	50	
	<212>	ADN	
	<213>	Lactococcus lactis	
	<400>	44	
		tatcactttg ggatggacct gcggcgcat agctgttgg tagggaacg	50
40	<210>	45	
	<211>	50	
	<212>	ADN	
	<213>	weissella	
	<400>	45	
45		tatcactaag agatggccc gcggtgcatt agctagttg taaggtaatg	50
	<210>	46	
	<211>	50	
	<212>	ADN	
	<213>	Brochothrix thermosphacta	
50	<400>	46	
		tgtcactgtg agatggacc gcgctggatt agctagttg taaggtaatg	50

	<210>	47		
	<211>	50		
	<212>	ADN		
	<213>	staphylococcus sp		
5	<400>	47		
		tatcacttat agatggaccc gcgccgtatt agctagtgg taaggtaacg	50	
	<210>	48		
	<211>	18		
	<212>	ADN		
10	<213>	Secuencia Artificial		
	<220>			
	<223>	Cebador		
	<400>	48		
		tgttgatga gcctgcgt	18	
15	<210>	49		
	<211>	49		
	<212>	ADN		
	<213>	Lactobacillus delbrueckii		
	<400>	49		
20		ggcctaccaa ggcaatgatg cgtagccgag ttgagagact gatcggcca	49	
	<210>	50		
	<211>	49		
	<212>	ADN		
	<213>	Lactobacillus delbrueckii		
25	<400>	50		
		ggcctaccaa ggcaatgatg cgtagccgag ttgagagact gatcggcca	49	
	<210>	51		
	<211>	49		
	<212>	ADN		
30	<213>	Lactobacillus amylovorus		
	<400>	51		
		ggcctaccaa ggcgacgatg catagccgag ttgagagact gatcggcca	49	
	<210>	52		
	<211>	49		
35	<212>	ADN		
	<213>	Lactobacillus acidophilus		
	<400>	52		
		ggcctaccaa ggcaatgatg catagccgag ttgagagact gatcggcca	49	
	<210>	53		
40	<211>	49		
	<212>	ADN		
	<213>	Lactobacillus amyloticus		
	<400>	53		
		ggcctaccaa ggcaacgatg catagccgag ttgagagact gatcggcca	49	
45	<210>	54		
	<211>	49		
	<212>	ADN		
	<213>	Lactobacillus acetotolerans		
	<400>	54		
50		ggcctaccaa ggcaacgatg catagccgag ttgagagact gatcggcca	49	
	<210>	55		
	<211>	49		

	<212> ADN	
	<213> Lactococcus piscium	
	<400> 55	
	ggactaccaa ggcgatgata catagccgac ctgagagggt gatcgcca	49
5	<210> 56	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Lactococcus plantarum	
	<400> 56	
10	ggactaccaa ggcgatgata catagccgac ctgagagggt gatcgcca	49
	<210> 57	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Lactococcus chungangensis	
15	<400> 57	
	ggactaccaa ggcgatgata catagccgac ctgagagggt gatcgcca	49
	<210> 58	
	<211> 49	
	<212> ADN	
20	<213> Lactococcus raffinolactis	
	<400> 58	
	ggactaccaa ggcgatgata catagccgac ctgagagggt gatcgcca	49
	<210> 59	
	<211> 49	
25	<212> ADN	
	<213> Lactococcus-lactis-subsp-Hordn	
	<400> 59	
	ggctcaccaa ggcgatgata catagccgac ctgagagggt gatcgcca	49
	<210> 60	
30	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Lactococcus-lactis-subsp-Lacti	
	<400> 60	
	ggctcaccaa ggcgatgata catagccgac ctgagagggt gatcgcca	49
35	<210> 61	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Lactococcus-lactis-subsp-Cremo	
	<400> 61	
40	ggctcaccaa ggcgatgata catagccgac ctgagagggt gatcgcca	49
	<210> 62	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Streptococcus thermophilus	
45	<400> 62	
	ggctcaccaa ggcgacgata catagccgac ctgagagggt gatcgcca	49
	<210> 63	
	<211> 49	
	<212> ADN	
50	<213> Streptococcus thermophilus	
	<400> 63	
	ggctcaccaa ggcgatgata catagccgac ttgagagggt gatcgcca	49

	<210>	64	
	<211>	49	
	<212>	ADN	
	<213>	Streptococcus thermophilus	
5	<400>	64	
		ggctcaccta ggcgacgata catagccgac ctgagagggt gatcggccca	49
	<210>	65	
	<211>	49	
	<212>	ADN	
10	<213>	Streptococcus parauberis	
	<400>	65	
		ggctcacaa ggcgacgata catagccgac ctgagagggt gatcggccca	49
	<210>	66	
	<211>	49	
15	<212>	ADN	
	<213>	Streptococcus iniae	
	<400>	66	
		ggctcacaa ggcgacgata catagccgac ctgagagggt gatcggccca	49
	<210>	67	
20	<211>	49	
	<212>	ADN	
	<213>	Streptococcus dysgalactiae	
	<400>	67	
		ggctcacaa ggcgacgata catagccgac ctgagagggt gatcggccca	49
25	<210>	68	
	<211>	49	
	<212>	ADN	
	<213>	Streptococcus agalactiae	
	<400>	68	
30		ggctcacaa ggcgacgata catagccgac ctgagagggt gatcggccca	49
	<210>	69	
	<211>	49	
	<212>	ADN	
	<213>	Streptococcus equi	
35	<400>	69	
		ggcctacaa ggcgacgata catagccgac ctgagagggt gaacggcca	49
	<210>	70	
	<211>	49	
	<212>	ADN	
40	<213>	Streptococcus oligofermentans	
	<400>	70	
		ggctcaccta ggcgacgata catagccgac ctgagagggt gatcggccca	49
	<210>	71	
	<211>	49	
45	<212>	ADN	
	<213>	Enterococcus faecalis	
	<220>		
	<221>	característica_nueva	
	<222>	(11)..(11)	
50	<223>	n es a, c, g, o t	
	<220>		
	<221>	característica_nueva	
	<222>	(13)..(13)	

	<223>	n e s a, c, g, o t	
	<400>	71 ggctcaccaa ngncacgatg catagccgac ctgagagggt gatcggcca	49
5	<210>	72	
	<211>	49	
	<212>	ADN	
	<213>	Lactobacillus algidus	
	<400>	72 ggcccaccaa ggcaatgata cgtagccgac ctgagagggt gatcggcca	49
10	<210>	73	
	<211>	49	
	<212>	ADN	
	<213>	Lactobacillus frumenti	
15	<400>	73 ggcttaccaa ggcatgatg catagccgag ttgagagact gatcggcca	49
	<210>	74	
	<211>	49	
	<212>	ADN	
	<213>	Lactobacillus panis	
20	<400>	74 ggcttaccaa ggcaatgatg catagccgag ttgagagact gatcggcca	49
	<210>	75	
	<211>	49	
	<212>	ADN	
25	<213>	Lactobacillus fermentum	
	<400>	75 ggcctaccaa ggcatgatg catagccgag ttgagagact gatcggcca	49
	<210>	76	
	<211>	49	
30	<212>	ADN	
	<213>	Lactobacillus oligofermentans	
	<400>	76 ggctcaccaa gacaatgata cgtagccgaa ctgagagggt gatcggcca	49
	<210>	77	
35	<211>	49	
	<212>	ADN	
	<213>	Lactobacillus plantarum	
	<400>	77 ggctcaccat ggcaatgata cgtagccgac ctgagagggt aatcggcca	49
40	<210>	78	
	<211>	49	
	<212>	ADN	
	<213>	Brevibacterium linens	
45	<400>	78 ggcctaccaa ggcgacgacg ggtagccggc ctgagagggc gaccggcca	49
	<210>	79	
	<211>	49	
	<212>	ADN	
	<213>	Psychroflexus sp	
50	<400>	79 ggcttaccat ggcaacgata ggtaggggtc ctgagaggga gatcccca	49

ES 2 785 205 T3

<210> 80
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Cebador

<400> 80
 gatgatacat agccgacc 18

10 <210> 81
 <211> 1501
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 81
 gagagtttga tcatggctca gattgaacgc tggcggcagg cctaacacat gcaagtcgaa 60
 cggtaacagg aagcagcttg cttctttgct gacgagtgcc ggacgggtga gtaatgtctg 120
 ggaaactgcc tgatggaggg ggataactac tggaaacggc agctaatacc gcataacgtc 180
 gcaagaccaa agagggggac cttcgggcct cttgccatcg gatgtgcca gatgggatta 240
 gctagtaggt ggggtaacgg ctcacctagg cgacgatccc tagctggtct gagaggatga 300
 ccagccacac tggaaactgag acacgggtcca gactcctacg ggaggcagca gtggggaata 360
 ttgcacaatg ggcgcaagcc tgatgcagcc atgccgcgtg tatgaagaag gccttcgggt 420
 tgtaaagtac tttcagcggg gaggaaggga gtaaagttaa tacctttgct cattgacgtt 480
 acccgagaa gaagcaccgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtataac ggaggggtgca 540
 agcgttaatc ggaattactg ggcgtaaagc gcacgcagcg gtttggttaag tcagatgtga 600
 aatccccggg ctcaacctgg gaactgcatc tgatactggc aagcttgagt ctcgtagagg 660
 ggggtagaat tccaggtgta gcggtgaaat gcgtagagat ctggaggaat accggtggcg 720
 aaggcggccc cctggacgaa gactgacgct caggtgcaa agcgtgggga gcaaacagga 780
 ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac gatgtcgact tggaggttgt gcccttgagg 840
 cgtggcttcc ggagctaacg cgttaagtgc accgcctggg gtagtacggcc gcaagggttaa 900
 aactcaaatg aattgacggg ggcccgacaa agcgggtggag catgtgggtt aattcgatgc 960
 aacgcgaaga accttacctg gtcttgacat ccacggaagt tttcagagat gagaatgtgc 1020
 cttcgggaac cgtgagacag gtgctgcatg gctgtcgta gctcgtgttg tgaaatgttg 1080
 ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctta tcctttgttg ccagcgggtcc ggccgggaac 1140
 tcaaaggaga ctgccagtga taaactggag gaaggtgggg atgacgtcaa gtcacatgag 1200
 cccttacgac cagggtctaca cacgtgctac aatggcgcat acaaagagaa gcgacctcgc 1260
 gagagcaagc ggacctcata aagtgcgtcg tagtcggat tggagtctgc aactcgactc 1320
 catgaagtcg gaatcgctag taatcgtgga tcagaatgcc acggtgaata cgttccccggg 1380
 ccttgtagac accgcccgtc acaccatggg agtgggttgc aaaagaagta ggtagcttaa 1440
 ccttcgggag ggcgcttacc actttgtgat tcatgactgg ggtgaagtcg taacaaggta 1500
 a 1501

<210> 82
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 82
 cctatccct gtgtgccttg gcagtcacag gagagttga tytggtca g 51
 10 <210> 83
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (31)..(40)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 83
 ccatctcatc cctgcgtgc tccgactcag nnnnnnnnnn taccgcggt gctggcac 58
 20 <210> 84
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Cebador
 <400> 84
 agactggat aactccg 17
 30 <210> 85
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 85
 aacctgcctt gtagcggg 18
 35 <210> 86
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Cebador
 <400> 86
 taacaacatg aatcgcat 18
 45 <210> 87
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Lactobacillus-Tuf-F2
 50 <400> 87
 gcycacgtwg aataygaaac 20
 <210> 88

	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Lactobacillus		
	<400> 88		
5	cgdactcca ttcaacyaa gtc	23	
	<210> 89		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Lactobacillus		
10	<400> 89		
	tgtggcatwg grccatcagt tgc	23	
	<210> 90		
	<211> 20		
	<212> ADN		
15	<213> Lactococcus		
	<400> 90		
	gccgaaatyg atggygaaat	20	
	<210> 91		
	<211> 23		
20	<212> ADN		
	<213> Lactococcus		
	<400> 91		
	caactttttc acgcaattgg ttg	23	
	<210> 92		
25	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Lactococcus		
	<400> 92		
	tgatgtcwca agcyatgcgt aaac	24	
30	<210> 93		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Leuconostoc		
	<400> 93		
35	ttcttgttc atgaaatcca ttg	24	
	<210> 94		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Leuconostoc		
40	<400> 94		
	gaataccac tagawcgtac ac	22	
	<210> 95		
	<211> 29		
	<212> ADN		
45	<213> Leuconostoc		
	<400> 95		
	tgtgtttcac caatttgtg aattttacc	29	
	<210> 96		
	<211> 17		
50	<212> ADN		
	<213> Photobacterium		
	<400> 96		

	aatgccaggt tgtgctg	17	
	<210> 97		
	<211> 26		
	<212> ADN		
5	<213> Photobacterium		
	<400> 97		
	gactgttca gagtwaagaat wacttc	26	
	<210> 98		
	<211> 25		
10	<212> ADN		
	<213> Photobacterium		
	<400> 98		
	atcgayggtg tgttacatga gtaca	25	
	<210> 99		
15	<211> 17		
	<212> ADN		
	<213> Pseudomonas		
	<400> 99		
	ggcgtkatcg aytcsgt	17	
20	<210> 100		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Pseudomonas		
	<400> 100		
25	cagmggrcgc tggttgatg	19	
	<210> 101		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Pseudomonas		
30	<400> 101		
	tcgygtgcy gaygacga	18	
	<210> 102		
	<211> 20		
	<212> ADN		
35	<213> Carnobacterium		
	<400> 102		
	attggygtat taccagtcga	20	
	<210> 103		
	<211> 19		
40	<212> ADN		
	<213> Carnobacterium		
	<400> 103		
	aaccatctgc ccatacatc	19	
	<210> 104		
45	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Carnobacterium		
	<400> 104		
	cgatttacac cccagttagt cgt	23	
50	<210> 105		
	<211> 20		
	<212> ADN		

ES 2 785 205 T3

	<213>	Brochotrix	
	<400>	105	
		cagtaccttc tggtaacgtg	20
5	<210>	106	
	<211>	24	
	<212>	ADN	
	<213>	Brochotrix	
	<400>	106	
		actttttca ctgcagaagt atac	24
10	<210>	107	
	<211>	30	
	<212>	ADN	
	<213>	Brochotrix	
	<400>	107	
15		tattatctaa agaagagggt ggacgtcata	30

REIVINDICACIONES

1. Un método de análisis metagenómico de alimentos fermentados para detectar y cuantificar las bacterias presentes en dicha muestra, el análisis que comprende la amplificación de la región V1-V3 del ARNr bacteriano 16S en dicha muestra, en donde se analiza la región V1-V3 con la pareja de cebadores de SEQ ID N°:1 y SEQ ID N°:2, en donde el método comprende además el uso de una fijación de un Ácido Nucleico Peptídico (PNA) para reducir la amplificación de al menos uno de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii*, *Lactococcus* o *Bacillus* que pueden estar presentes en la muestra.
2. Un método de la reivindicación 1 en donde se añade monoazida de propidio (PMA) a la muestra antes de la extracción de ADN para reducir la posterior amplificación de ADN de bacterias no viables presentes en la muestra.
3. Un método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2 en donde dicho análisis puede detectar y distinguir bacterias de las familias: *Acetobacteraceae*, *Aeromonadaceae*, *Bacteroidaceae*, *Burkholderiaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Comamonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Listeriaceae*, *Moraxellaceae*, *Neisseriaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Shewanellaceae*, *Streptococcaceae*, *Vibrionaceae* y *Xanthomonadaceae*; y/o en donde dicho análisis puede detectar y distinguir bacterias de los géneros: *Acetobacteraceae* *Acetobacter*, *Acetobacteraceae* *Gluconacetobacter*, *Aeromonadaceae* *Aeromonas*, *Bacteroidaceae* *Bacteroides*, *Burkholderiaceae* *Burkholderia*, *Carnobacteriaceae* *Carnobacterium*, *Clostridiaceae* *Clostridium*, *Comamonadaceae* *Comamonas*, *Comamonadaceae* *Delftia*, *Enterobacteriaceae* *Escherichia*, *Enterobacteriaceae* *Pantoea*, *Enterobacteriaceae* *Serratia*, *Enterococcaceae* *Enterococcus*, *Chryseobacterium*, *Flavobacteriaceae* *Flavobacterium*, *Flavobacteriaceae* *Myroides*, *Lachnospiraceae* *Butyrivibrio*, *Lactobacillaceae* *Lactobacillus*, *Lactobacillaceae* *Pediococcus*, *Leuconostocaceae* *Leuconostoc*, *Leuconostocaceae* *Weisella*, *Listeriaceae* *Listeria*, *Moraxellaceae* *Acinetobacter*, *Moraxellaceae* *Psychrobacter*, *Neisseriaceae* *Alysiella*, *Pseudoalteromonadaceae* *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonadaceae* *Pseudomonas*, *Shewanellaceae* *Shewanella*, *Streptococcaceae* *Lactococcus*, *Streptococcaceae* *Streptococcus*, *Vibrionaceae* *Aliivibrio*, *Vibrionaceae* *Photobacterium*, *Vibrionaceae* *Vibrio* y *Xanthomonadaceae* *Xanthomonas*.
4. Un método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde se determina el porcentaje de bacterias representadas por al menos una unidad taxonómica operacional (OTU), y opcionalmente que comprende además determinar las unidades formadoras de colonias (CFU) de la muestra y normalizar el porcentaje de organismos representados por dicha OTU a una proporción de recuento de CFU viables totales de la muestra.
5. Un método de cualquier reivindicación precedente en donde dicho análisis metagenómico es seguido por una qPCR específica de taxones.
6. Un método de cualquier reivindicación precedente en donde dichos cebadores se modifican mediante la adición de un adaptador, secuencia clave, marcador o secuencia universal, que tiene opcionalmente las secuencias de SEQ ID Nos. 82 y 83 respectivamente.
7. Un kit para análisis metagenómico de una muestra que comprende uno o ambos cebadores que comprenden la secuencia de SEQ ID N°. 1 y/o SEQ ID N°. 2, en donde preferiblemente los cebadores consisten en las secuencias de SEQ ID N°. 1 y/o SEQ ID N°. 2 y que además comprende un oligonucleótido de PNA que comprende la secuencia de SEQ ID N°. 80, preferiblemente en donde el oligonucleótido de PNA consiste en la secuencia de SEQ ID N°. 80.
8. Un kit de la reivindicación 7 en donde el(los) cebador(es) se modifican mediante la adición de un adaptador, secuencia clave, marcador o secuencia universal, que tiene opcionalmente las secuencias de SEQ ID Nos. 82 y 83 respectivamente.
9. Un kit de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 que comprende además monoazida de propidio (PMA); y/o que comprende además un reactivo para análisis metagenómico de una muestra.

FIGURA 1

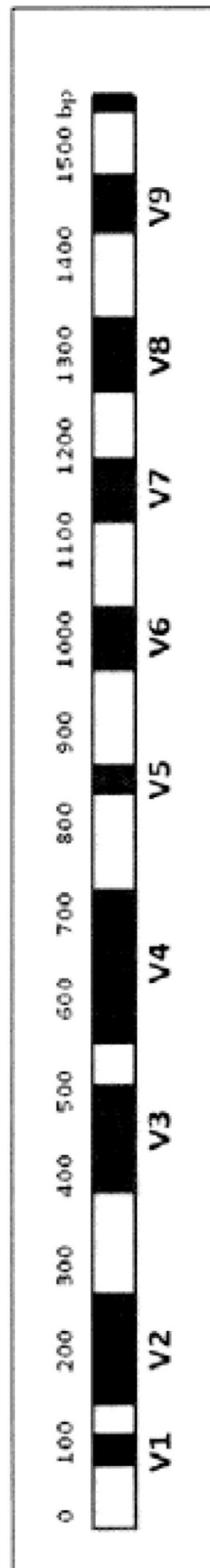


FIGURA 2

Porcentaje de especies con diferencias en regiones hipervariables de ADNr 16S

Genes bacterianos

REGIONES VARIABLES

	V1	V2/V3	V3	V3/V4	V4	V4/V5	V5	V5/V6	V6	V6/V7	V7	V7/V8	V8	V8/V9	V9
<i>Acetivibrioaceae</i> , <i>Acetivibrio</i>	77%	88%	80%	88%	87%	90%	55%	72%	63%	78%	38%	88%	68%	75%	56%
<i>Acetivibrioaceae</i> , <i>Chlorivibrio</i>	68%	81%	23%	88%	81%	84%	47%	24%	41%	63%	38%	59%	33%	60%	33%
<i>Acetivibrioaceae</i> , <i>Acetivibrio</i>	67%	85%	75%	78%	38%	31%	14%	42%	26%	34%	14%	59%	27%	38%	17%
<i>Bacteroidaceae</i> , <i>Bacteroides</i>	88%	99%	92%	92%	96%	96%	61%	87%	85%	88%	87%	88%	92%	100%	87%
<i>Bacteroidaceae</i> , <i>Bacteroides</i>	77%	100%	87%	93%	48%	67%	33%	79%	66%	73%	38%	48%	33%	50%	33%
<i>Carnobacteriaceae</i> , <i>Carnobacterium</i>	100%	100%	60%	88%	78%	90%	88%	100%	98%	100%	58%	98%	88%	100%	75%
<i>Chloridaceae</i> , <i>Chloridium</i>	94%	96%	77%	93%	88%	91%	72%	89%	85%	91%	69%	82%	87%	92%	92%
<i>Corynebacteriaceae</i> , <i>Corynebacterium</i>	100%	100%	100%	100%	73%	88%	88%	100%	95%	97%	42%	67%	30%	80%	60%
<i>Corynebacteriaceae</i> , <i>Delftia</i>	52%	67%	50%	59%	67%	67%	67%	100%	67%	100%	67%	67%	67%	100%	100%
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Enterobacter</i>	100%	100%	63%	100%	63%	88%	63%	63%	67%	67%	58%	67%	67%	67%	33%
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Paenibacillus</i>	58%	90%	60%	93%	56%	60%	45%	85%	66%	88%	38%	53%	58%	73%	36%
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Serratia</i>	52%	90%	80%	90%	47%	53%	37%	53%	46%	72%	47%	88%	87%	91%	16%
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Enterobacter</i>	69%	86%	58%	81%	48%	55%	33%	59%	45%	59%	28%	55%	49%	72%	98%
<i>Flavobacteriaceae</i> , <i>Chryseobacterium</i>	100%	100%	65%	90%	72%	88%	64%	88%	47%	71%	21%	66%	36%	77%	32%
<i>Flavobacteriaceae</i> , <i>Flavobacterium</i>	100%	100%	90%	92%	88%	99%	66%	84%	66%	84%	56%	82%	69%	81%	90%
<i>Flavobacteriaceae</i> , <i>Myxobolus</i>	89%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	56%	100%	88%	100%	49%	80%	100%
<i>Lactonitratibacteraceae</i> , <i>Lactonitratibacter</i>	7	100%	100%	100%	100%	100%	67%	100%	100%	100%	67%	100%	100%	100%	100%
<i>Lactonitratibacteraceae</i> , <i>Lactonitratibacter</i>	85%	93%	70%	89%	75%	80%	48%	76%	65%	78%	45%	82%	64%	80%	98%
<i>Lactonitratibacteraceae</i> , <i>Protonitratibacter</i>	87%	100%	73%	100%	87%	100%	34%	80%	72%	89%	64%	80%	80%	75%	100%
<i>Lactonitratibacteraceae</i> , <i>Lactonitratibacter</i>	88%	93%	80%	84%	78%	80%	45%	80%	55%	78%	58%	74%	67%	80%	100%
<i>Lactonitratibacteraceae</i> , <i>Wetmorella</i>	88%	88%	67%	93%	71%	86%	48%	85%	69%	88%	62%	82%	71%	75%	100%
<i>Lactonitratibacteraceae</i> , <i>Lactonitratibacter</i>	88%	88%	64%	64%	38%	100%	38%	33%	22%	38%	48%	100%	88%	100%	33%
<i>Shewanellaceae</i> , <i>Acetivibrio</i>	81%	94%	96%	96%	72%	80%	44%	37%	48%	38%	37%	67%	20%	100%	80%
<i>Shewanellaceae</i> , <i>Psychrobacter</i>	100%	75%	66%	88%	67%	67%	13%	27%	16%	33%	38%	39%	27%	71%	76%
<i>Shewanellaceae</i> , <i>Alphaproteobacteria</i>	100%	100%	100%	100%	58%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	58%	7	7
<i>Shewanellaceae</i> , <i>Shewanella</i>	58%	79%	38%	76%	39%	70%	34%	83%	49%	63%	22%	56%	81%	79%	45%
<i>Shewanellaceae</i> , <i>Shewanella</i>	57%	80%	78%	89%	62%	71%	43%	65%	47%	68%	28%	68%	48%	68%	44%
<i>Shewanellaceae</i> , <i>Shewanella</i>	58%	81%	85%	96%	67%	80%	33%	71%	53%	71%	29%	67%	57%	89%	48%
<i>Streptococcaceae</i> , <i>Lactococcus</i>	100%	100%	78%	75%	58%	50%	38%	58%	38%	63%	58%	75%	62%	50%	50%
<i>Streptococcaceae</i> , <i>Streptococcus</i>	100%	100%	76%	85%	74%	78%	39%	84%	68%	82%	28%	69%	45%	82%	69%
<i>Vibrionaceae</i> , <i>Vibrio</i>	58%	100%	100%	100%	58%	67%	58%	100%	100%	100%	17%	58%	58%	100%	100%
<i>Vibrionaceae</i> , <i>Photobacterium</i>	57%	86%	96%	89%	57%	74%	36%	82%	42%	65%	35%	78%	76%	80%	30%
<i>Vibrionaceae</i> , <i>Vibrio</i>	69%	86%	93%	87%	68%	66%	34%	61%	48%	68%	18%	63%	49%	88%	56%
<i>Xanthomonadaceae</i> , <i>Xanthomonas</i>	38%	44%	37%	67%	56%	56%	15%	28%	22%	22%	22%	46%	39%	30%	19%

FIGURA 3

SEQ ID N°. 81

01 GaGaGtT**TGa**Tcatggct**CA**GATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAAC

61 **GGTAACAGGAAGCAGCTTGCTTCTTTGCTGACG**AGTggcGGaCgGgTgAGTA**A**gTCTGG **V1**

121 GAgACgGCg**TGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCG** **V2**

181 **CAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCG**GATGTGCCCAGATGGGATTAG

241 CTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAC

301 CAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT

361 TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTT

421 GTAAAGTACTTT**CAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTA** **V3**

481 **CCCCGAGAAG**AAGCACCGGCTaaCtCCgtgccagcagccgcggtaaTacGGAGGGTGCAA

541 GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGCGG**TTTGTTAAGTCAGATGTGAA** **V4**

601 **ATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCT**TGAGTCTCGTAGAGGG

661 GGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGA

721 AGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT

781 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTT**GGAGGTTGTGCCCTTGAGGC** **V5**

841 **GTGGCTTCC**GGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA

901 ACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCA

FIGURA 3 cont.

```

961      ACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCC V6
1021     TTCCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGG
1081     GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACT V7
1141     CAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGC
1201     CCTTACGACCAGGSCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG V8
1261     AGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCC
1321     ATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGC
1381     CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAAC V9
1441     CTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAA

```

TOTALMENTE CONSERVADA conservada (minúscula) Variable (mayúscula) **Hipervariable**

FIGURA 4**V1-V3**

OLIGO	inicio	long.	tm	gc%
16S-V1-V3-FW GAGAGTTTGATYMTGGCTCAG SEQ ID NO. 1	1	21	57,47	47,62
16S-V1-V3-Rev ACCGCGGCTGCTGGCAC SEQ ID NO. 2	555	17	69,56	76,47

TAMAÑO DEL PRODUCTO: 555, CUALQUIER PAREJA COMPL.: 3,00, PAREJA 3' COMPL.: 2,00

FIGURA 5

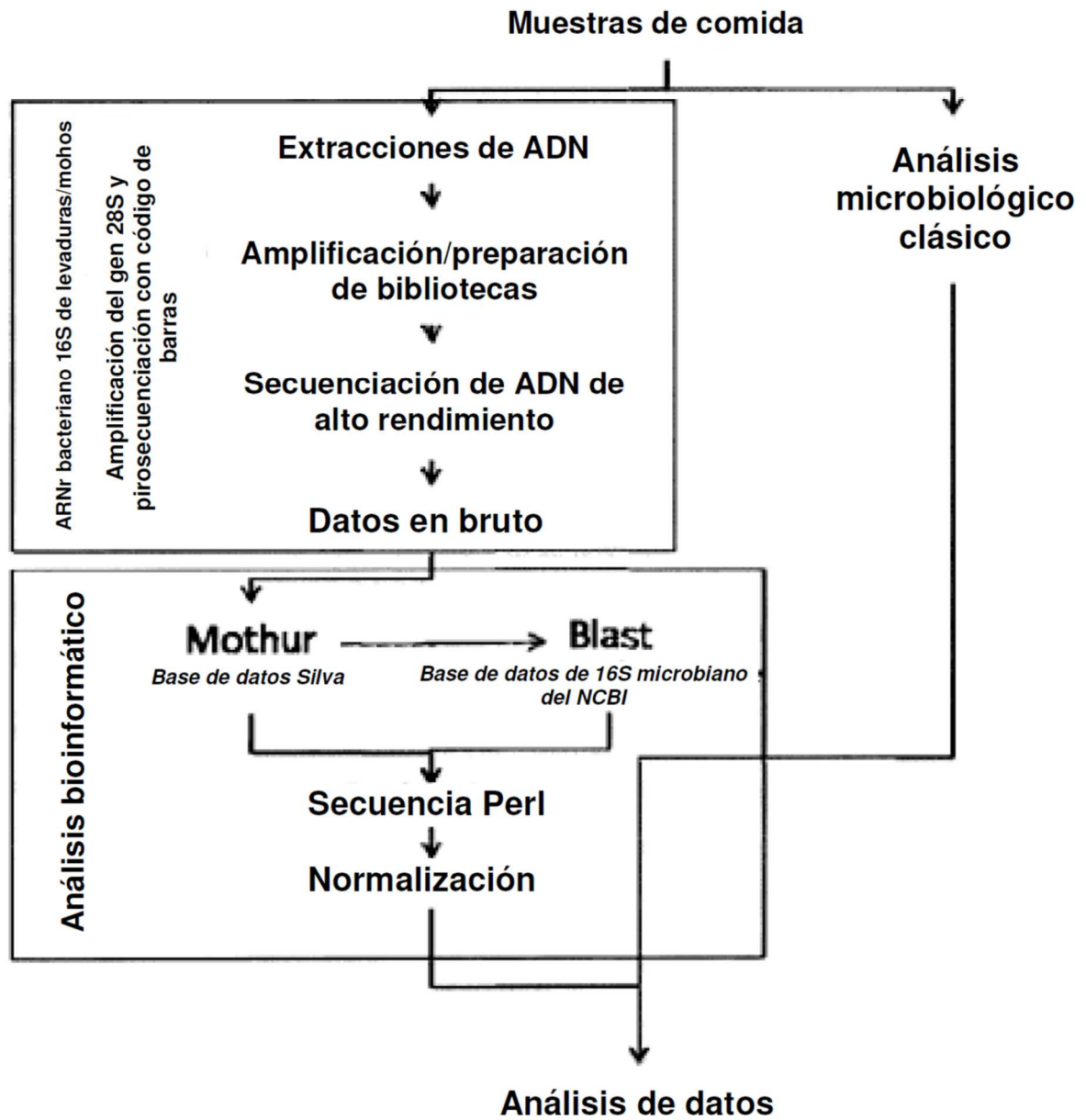


FIGURA 6

5

```
CHLOROPLAST1 GAGAGTTCGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGCATGCTTAACACATG-CAAGTCGG-----ACGGG-----AAGTGGT--GTT-----TCCAGTGG
CHLOROPLAST2 GAGAGTTCGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGCATGCTTAACACATG-CAAGTCGG-----ACGGG-----AAGTGGT--GTT-----TCCAGTGG
CHLOROPLAST3 GAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGCATGCTTAACACATG-CAAGTCGG-----ACGGG-----AAGTGGT--GTT-----TCCAGTGG
CHLOROPLAST4 GAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGCATGCTTAACACATG-CAAGTCGG-----ACGGG-----AAGTGGT--GTT-----TCCAGTGG
CHLOROPLAST5 GAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGCATGCTTAACACATG-CAAGTCGG-----ACGGG-----AAGTGGT--GTT-----TCCAGTGG
CHLOROPLAST6 GAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGCATGCTTAACACATG-CAAGTCGG-----ACGGG-----AAGTGGT--GTT-----TCCAGTGG
CHLOROPLAST7 GAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGCATGCTTAACACATG-CAAGTCGA-----ACGGG-----AAGTGGT--GTT-----TCCAGTGG
CHLOROPLAST8 GAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGCATGCTTAACACATG-CAAGTCGA-----ACGGG-----AAGTGGT--GTT-----TCCAGTGG

                                QP-PNacup G-----AAGTGGT--GTT-----TCCAGT
Pseudomonas GAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTTGAAACGCTGGCGCAGGCTTAACACATGTCAGTCGA-----GCGGAT-----GAGAAGA--GCTTGCTCT-----TCGATTACGCGG
Xanthomonas GAGAGTTTGATCATGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGCAGGCTTAACACATG-CAAGTCGAACGGCAGCGGT-----AGGAAGCTTGCTTCCAT-----GCCGGCGAGTGG
E.Coli GAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTTGAAACGCTGGCGCAGGCTTAACACATG-CAAGTCGAACGGTAACAGG-----AAGCAGCTTGCT-GTTTC-----GCTGACGAGTGG
Lactococcus GAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGCGTGCTTAATACATG-CAAGTCGAACGAACCTCTTTATCACCGAGTGCTTGCACTCACCGATAAAGAGTTGAGTGG
Brochothrix GAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCTTAATACATG-CAAGTCGAACGAACGG-----ATAAGAGCTTGCTCTTTT-----GAAGTTAGTGG
Arthrobacter GAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGCGTGCTTAACACATG-CAAGTCGAACGAT-----GAACCT-CACTTGT-----GGGGGGATTAGTGG

QP-MetaFw GAGAGTTTGATYMTGGCTCAG
```

15

20

FIGURA 7

5

10	CHLOROPLAST1	GGAGAGAAG-----CAATGACGGTATCTGGGGAATAAGCATCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGCGGT	
	CHLOROPLAST2	GGAGAGAAG-----CAATGACGGTATCTGGGGAATAAGCATCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGCGGT	
	CHLOROPLAST3	GGAGAGAAG-----CAATGACGGTATCTGGGGAATAAGCATCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGCGGT	
	CHLOROPLAST4	GGAGAGAAG-----CAATGACGGTATCTGGGGAATAAGCATCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGCGGT	
	CHLOROPLAST5	GGAGAGAAG-----CAATGACGGTATCTGGGGAATAAGCATCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGCGGT	
	CHLOROPLAST6	AGAGAGAAG-----CAATGACGGTATCTGGGGAATAAGCATCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGCGGT	
15	CHLOROPLAST7	GGAGAGAAG-----CAATGACGGTATCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGCGGT	
	CHLOROPLAST8	GGAGAGAAG-----CAATGACGGTATCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGCGGT	
		AR-----CAATGACGGTATCTG	QP-PNacdn
	Pseudomonas sp	TGGGAGGAAGGCAGTAACCGAATACCTTGCTGTTTTGACGTACCGACAGAAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGCGGT	
	Xanthomonas sp	GGGGAAGAAATCCTGCTGCTAATAATCCGGCGGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGCGGT	
20	E.Coli sp	GGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGCGGT	
	Lactococcus sp	AGAGAAGAAAGTCCGTGAGAGTAAGTGTTCACGTTTCGACGGTATCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGCGGT	
	Brochothrix sp	AGAGAAGAACATGGGTGAGAGTAAGTGTTCACCNCTTGACGGTATCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGCGGT	
	Arthrobacter sp	AGGGTAGAA-GCCTGTCTTAGGGGTCGGT-----GACGGTACCTGCAGAGAAGCGCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGCGGT	QP-MetaRev

25

FIGURA 8

5

Mito-Oryza-sativa	-----CTGTTTGATGAGCCTCGTAGTATTAGGTAGTTGGTCGGGTAAG
Mito-Oryza-rufipogon	-----CTGTTTGATGAGCCTCGTAGTATTAGGTAGTTGGTCGGGTAAG
Mito-Bambusa-oldhamii	-----CTGTTTGATGAGCCTCGTAGTATTAGGTAGTTGGTCAGGTAAG
Mito-Triticum-aestivum	-----CTGTTTGATGAGCCTCGTAGTATTAGGTAGTTGGTCAGGTAAG
Mito-S.cereale	-----CTGTTTGATGAGCCTCGTAGTATTAGGTAGTTGGTCAGGTAAG
Mito-Sorghum-bicolor	-----CTGTTTGATGAGCCTCGTAGTATTAGGTAGTTGGTCAGGTAAG
	-----TGTTTGATGAGCCTCGGT--- QP-PNAm -----
CHLOROPLASTE1	-----GCCCGAGGAGGGGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGCAATA
CHLOROPLASTE2	-----GCCCGAGGAGGGGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGCAATA
CHLOROPLASTE3	-----GCCCAAGGAGGGGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGCAATA
CHLOROPLASTE4	-----GCCCAAGGAGGGGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGCAATA
E.Coli	---TGCCATCGGATGTGCCACATGGGATTAGCTTGTGGTGGGTAACG
Lactoc-lactis	TATCACTTTGGGATGGACCTGCGCGCGCATTAGCTTGTGGTAGGGTAACG
Weissella	TATCACTAAGAGATGGTCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGSTAATG
Brochotr-Therm	TGTCACGTGTGAGATGGACCCCGCGCTGGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATG
Stapyllococcus	TATCACTTATAGATGGACCCCGCGCTATTAGCTAGTTGGTAGGTAACG

25

5	Lactobacillus-delbrueckii-subsp	GGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCCA
	Lactobacillus-delbrueckii-subsp	GGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCCA
	Lactobacillus-amylovorans	GGCTTACCAAGGCGACGATGATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCCA
	Lactobacillus-acidophilus	GGCTTACCAAGGCAATGATGATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCCA
	Lactobacillus-amylolyticus	GGCTTACCAAGGCAACGATGATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCCA
	Lactobacillus-acetotolerans	GGCTTACCAAGGCAACGATGATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCCA
	Lactococcus-piscium	GGACTTACCAAGGCGATATACATAGCCGACCTGAGAGGTTGATCGGCCCA
10	Lactococcus-plantarum	GGACTTACCAAGGCGATATACATAGCCGACCTGAGAGGTTGATCGGCCCA
	Lactococcus-chungangensis	GGACTTACCAAGGCGATATACATAGCCGACCTGAGAGGTTGATCGGCCCA
	Lactococcus-raffinolactis	GGACTTACCAAGGCGATATACATAGCCGACCTGAGAGGTTGATCGGCCCA
	Lactococcus-lactis-subsp-Hordn	GGCTTACCAAGGCGATATACATAGCCGACCTGAGAGGTTGATCGGCCCA
15	Lactococcus-lactis-subsp-Lacti	GGCTTACCAAGGCGATATACATAGCCGACCTGAGAGGTTGATCGGCCCA
	Lactococcus-lactis-subsp-Cremo	GGCTTACCAAGGCGATATACATAGCCGACCTGAGAGGTTGATCGGCCCA
	PNA Lactococcus	-----GATGATACATAGCCGACC-----
	Streptococcus-Thermophilus-19-5	GGCTTACCAAGGCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGTTGATCGGCCCA
	Streptococcus-Thermophilus-UKPS2	GGCTTACCAAGGCGATATACATAGCCGACTTGAAGAGGTTGATCGGCCCA
20	Streptococcus-Thermophilus-SW1	GGCTTACCTAGGCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGTTGATCGGCCCA
	Streptococcus-parauberis	GGCTTACCAAGGCCACGATACATAGCCGACCTGAGAGGTTGATCGGCCCA
	Streptococcus-iniae	GGCTTACCAAGGCCACGATACATAGCCGACCTGAGAGGTTGATCGGCCCA
	Streptococcus-dysgalactiae-ssp	GGCTTACCAAGGCCACGATACATAGCCGACCTGAGAGGTTGATCGGCCCA
25	Streptococcus-agalactiae	GGCTTACCAAGGCCACGATACATAGCCGACCTGAGAGGTTGATCGGCCCA
	Streptococcus-equi	GGCTTACCAAGGCCACGATACATAGCCGACCTGAGAGGTTGATCGGCCCA
	Streptococcus-oligofermentans	GGCTTACCTAGGCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGTTGATCGGCCCA
	Enterococcus-faecalis	GGCTTACCAANNCACGATGATAGCCGACCTGAGAGGTTGATCGGCCCA
	Lactobacillus-algidus	GGCCCAACCAAGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGTTGATCGGCCCA
	Lactobacillus-frumenti	GGCTTACCAAGGCGATGATGATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCCA
30	Lactobacillus-panis	GGCTTACCAAGGCAATGATGATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCCA
	Lactobacillus-fermentum	GGCTTACCAAGGCGATGATGATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCCA
	Lactobacillus-oligofermentans	GGCTTACCAAGGCAATGATGATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCCA
	Lactobacillus-plantarum	GGCTTACCATGGCAATGATGATAGCCGACCTGAGAGGTTGATCGGCCCA
	Brevibacterium-linens	GGCTTACCAAGGCCACGCGGTTAGCCGGCTTGAGAGGCGACCGGCCCA
35	Psychroflexus-ssp	GGCTTACCATGGCAACGATAGTTAGGGGTCTCTGAGAGGAGATCCCCCA

FIGURA 10

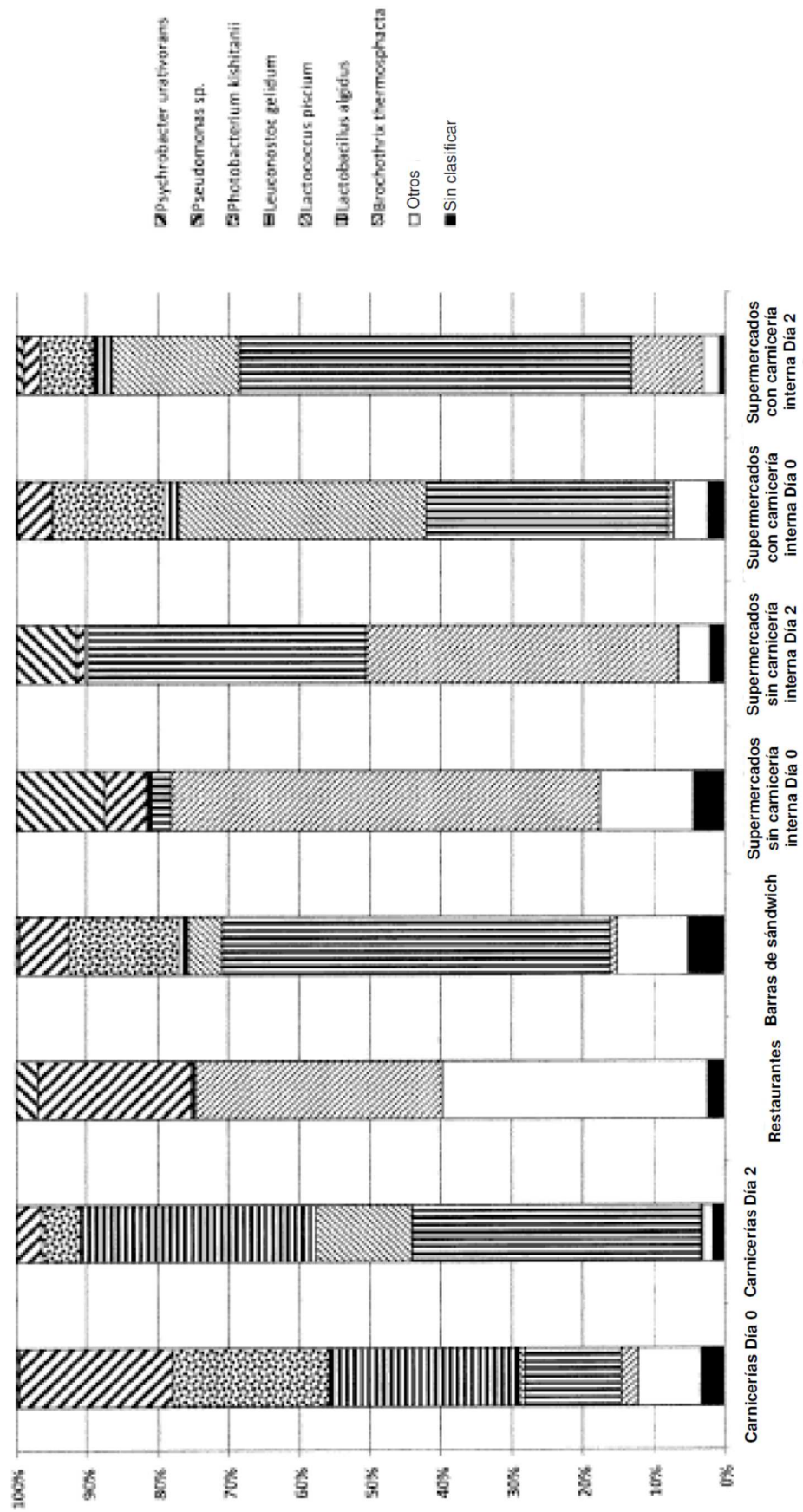


FIGURA 11

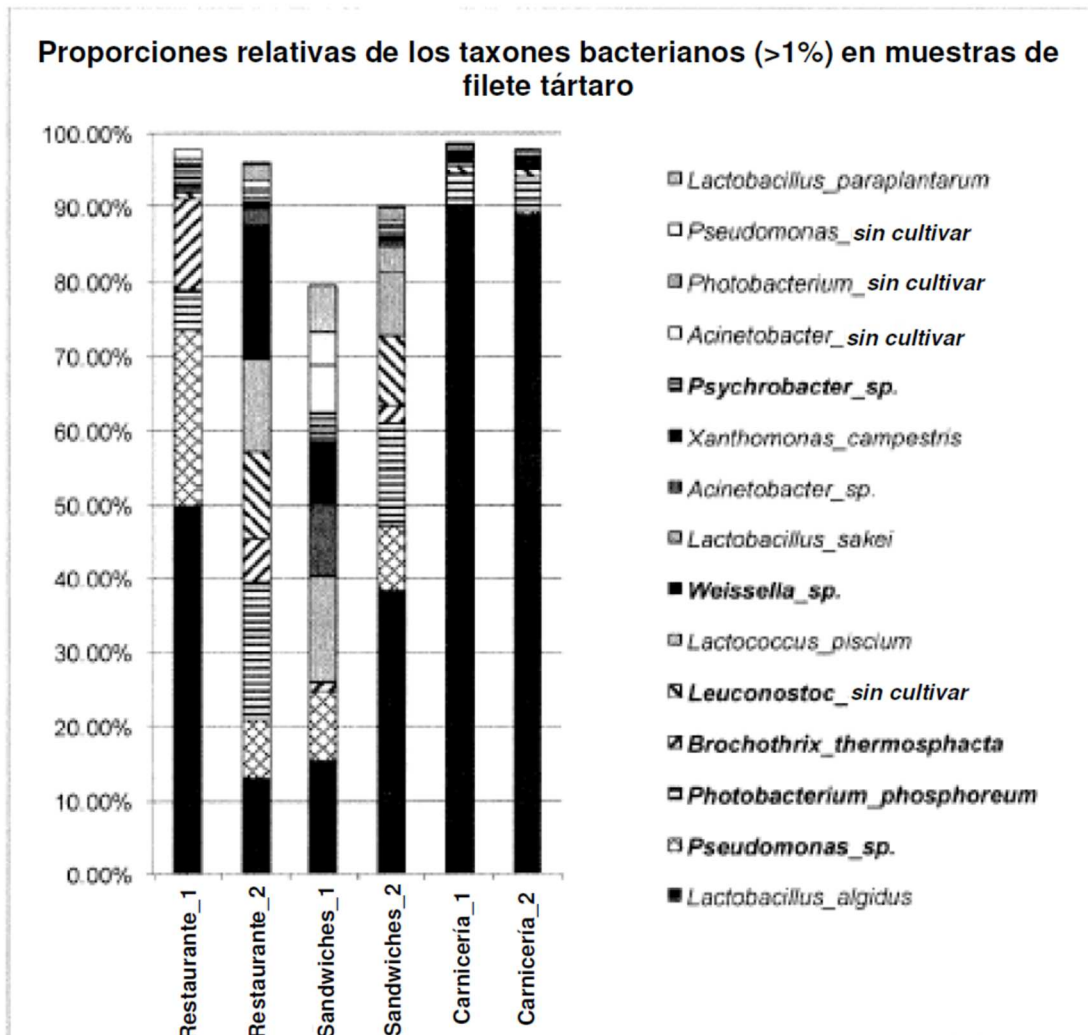


FIGURA 12

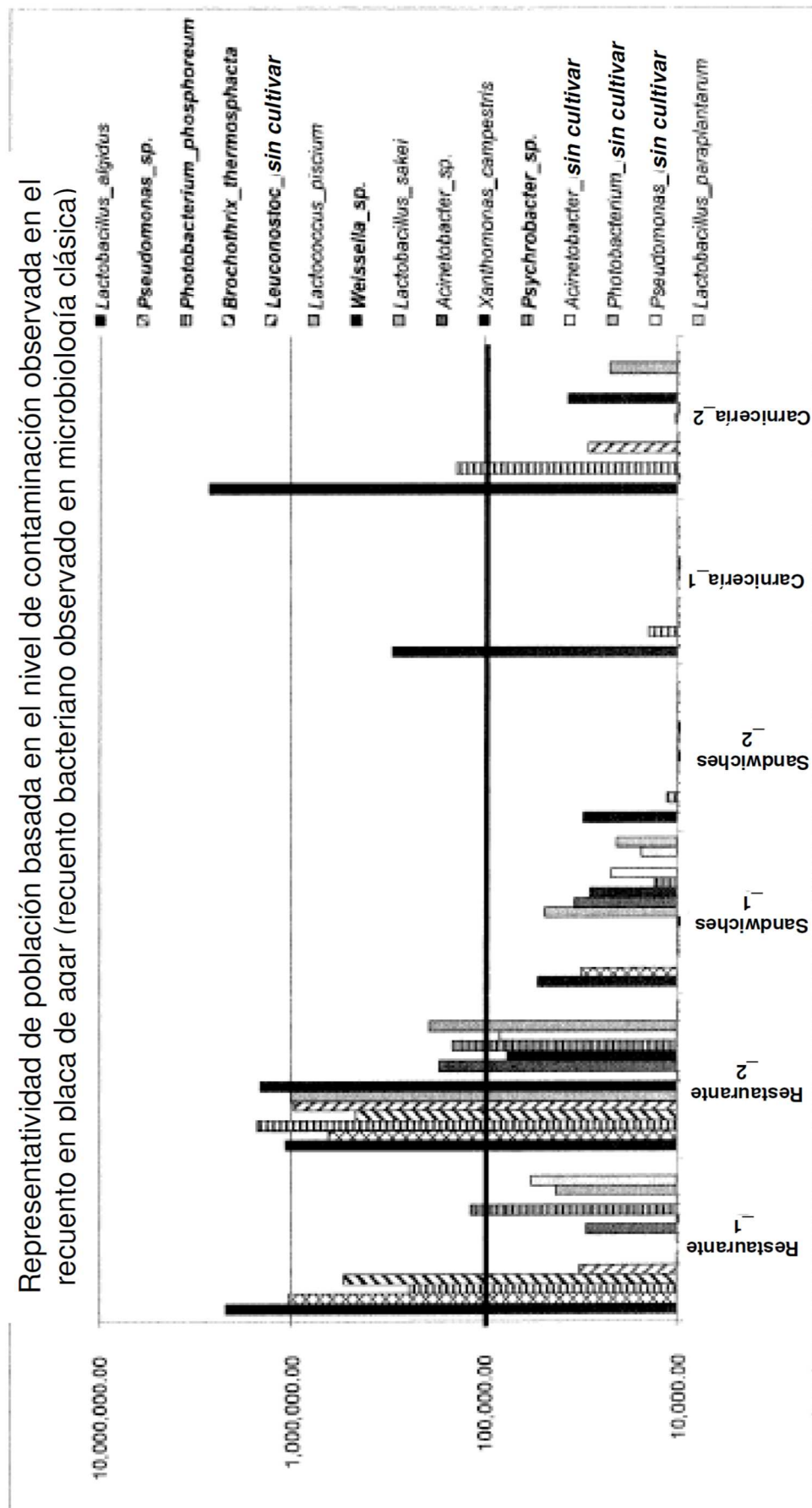


FIGURA 13

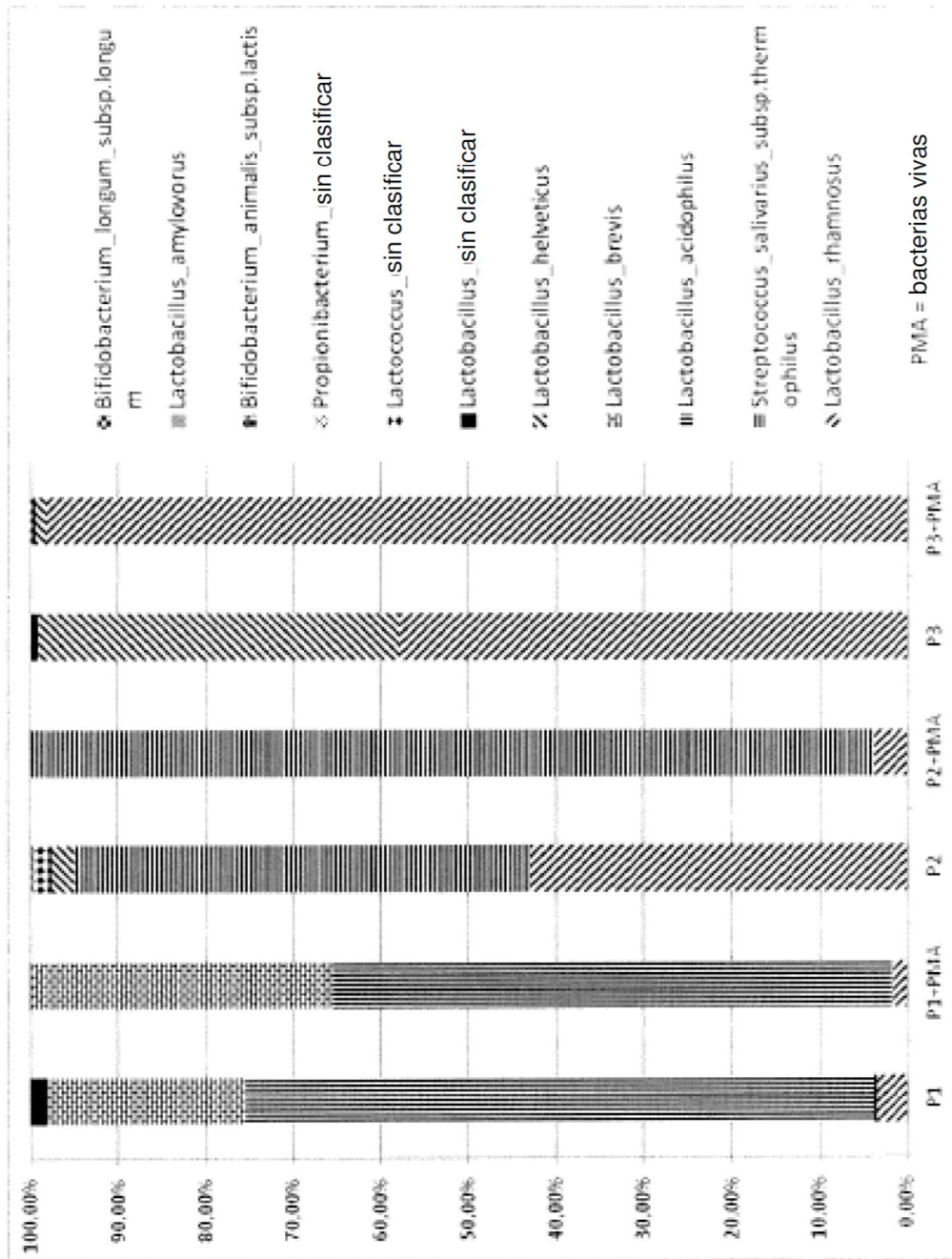


FIGURA 14

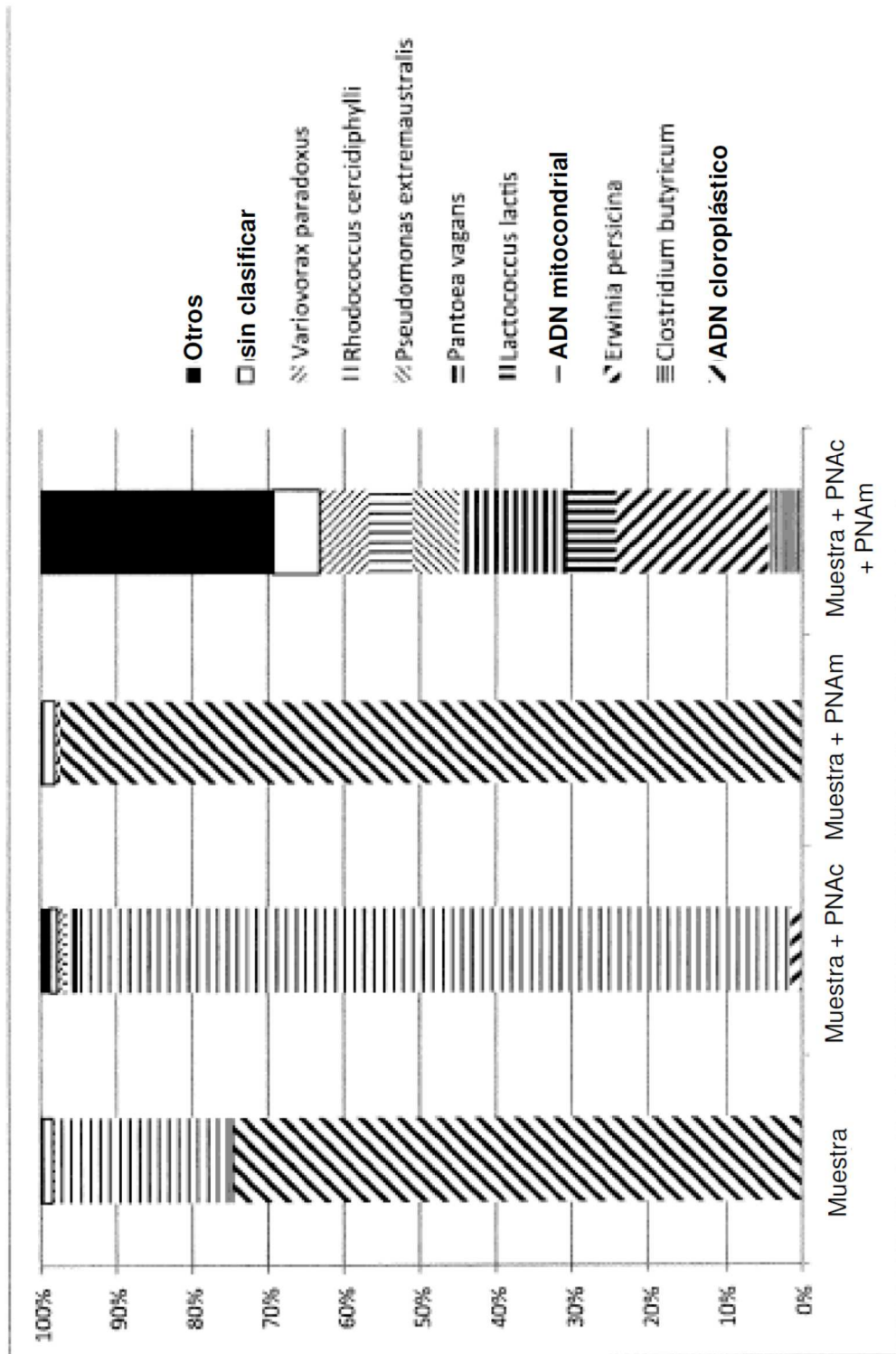


FIGURA 15

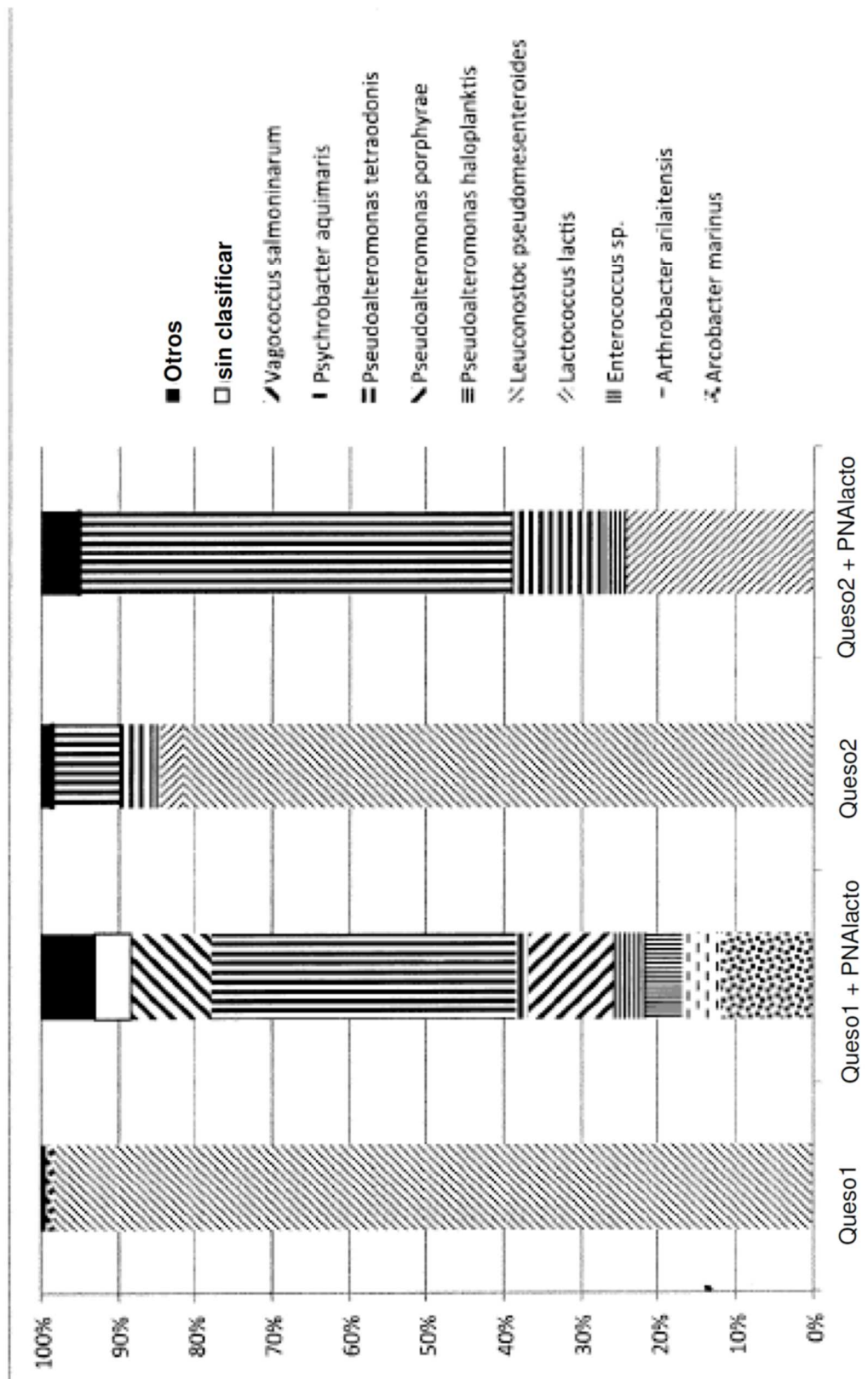


FIGURA 16

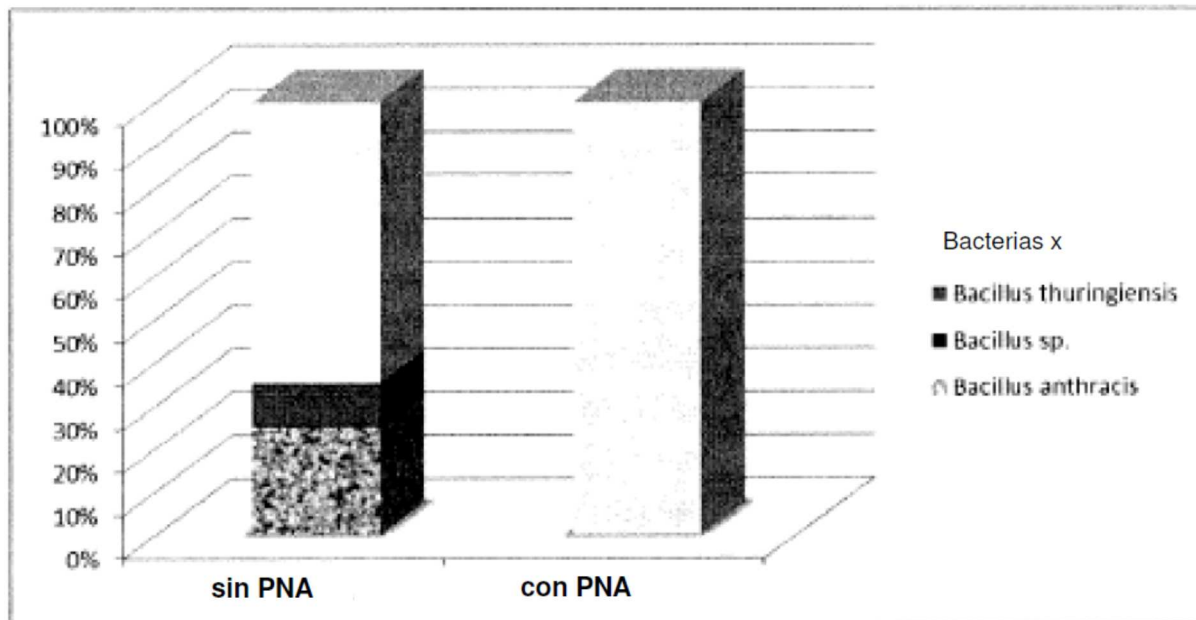


FIGURA 17

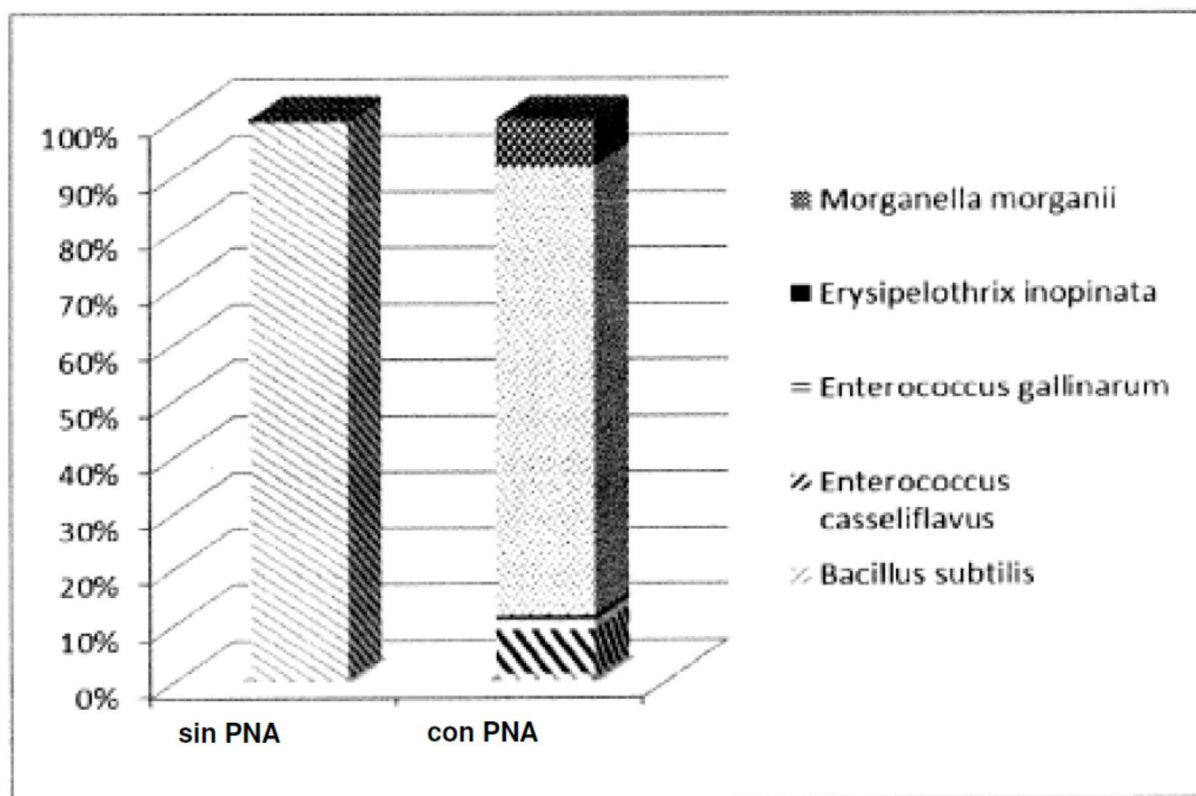


FIGURA 18

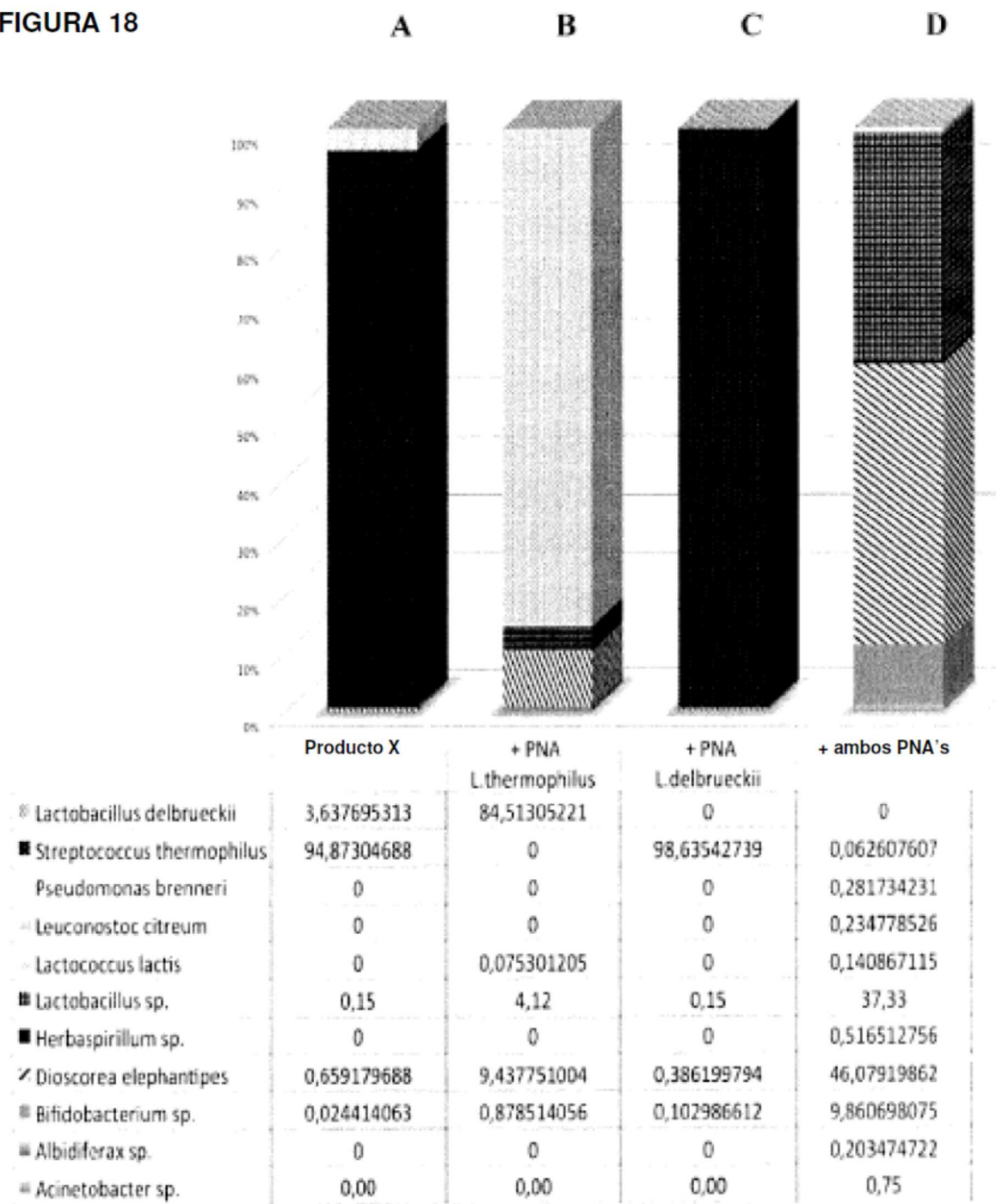


FIGURA 19

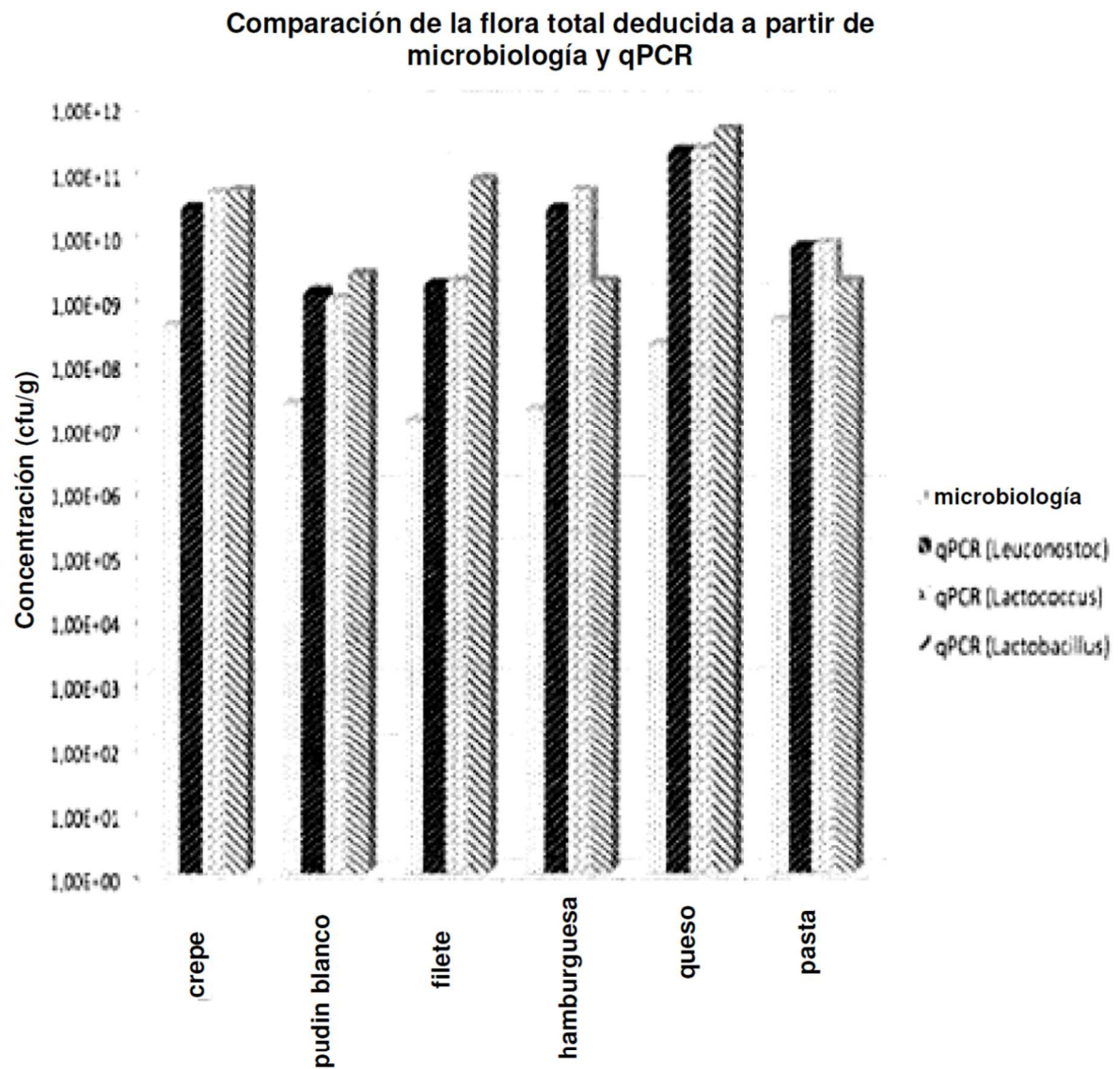


FIGURA 20 (A)

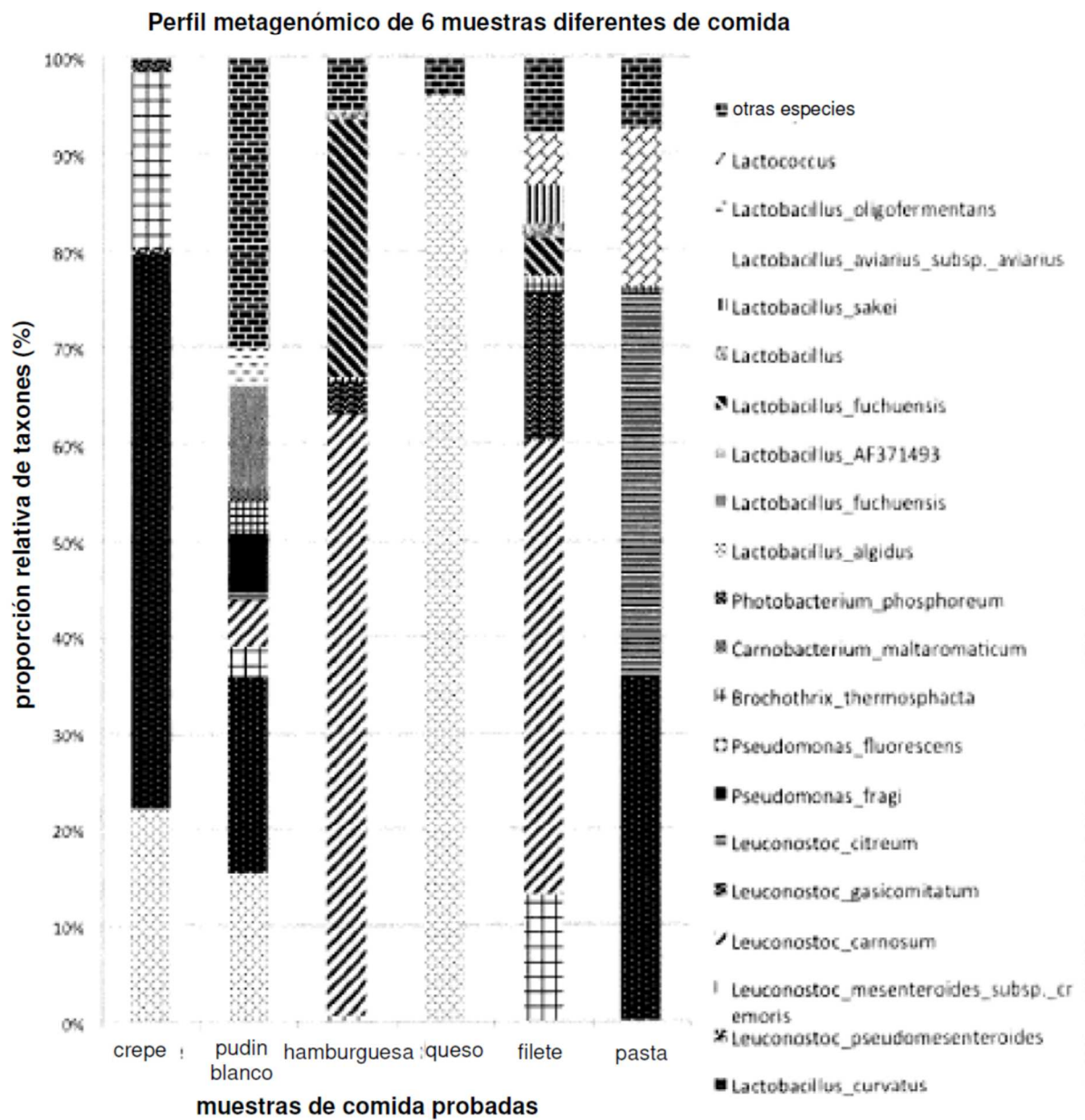


FIGURA 20 (B) (1/6)

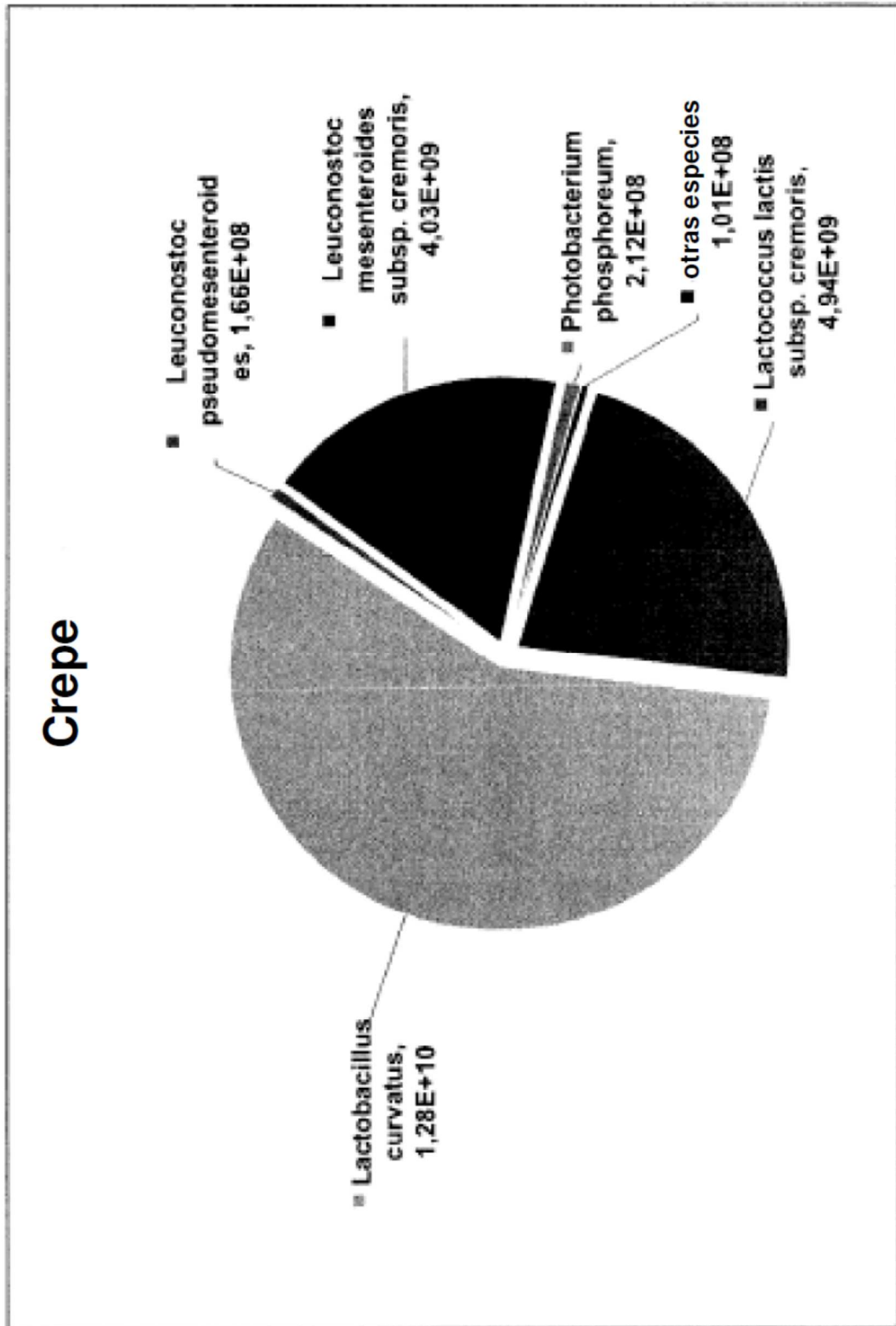


FIGURA 20 (B) (2/6)

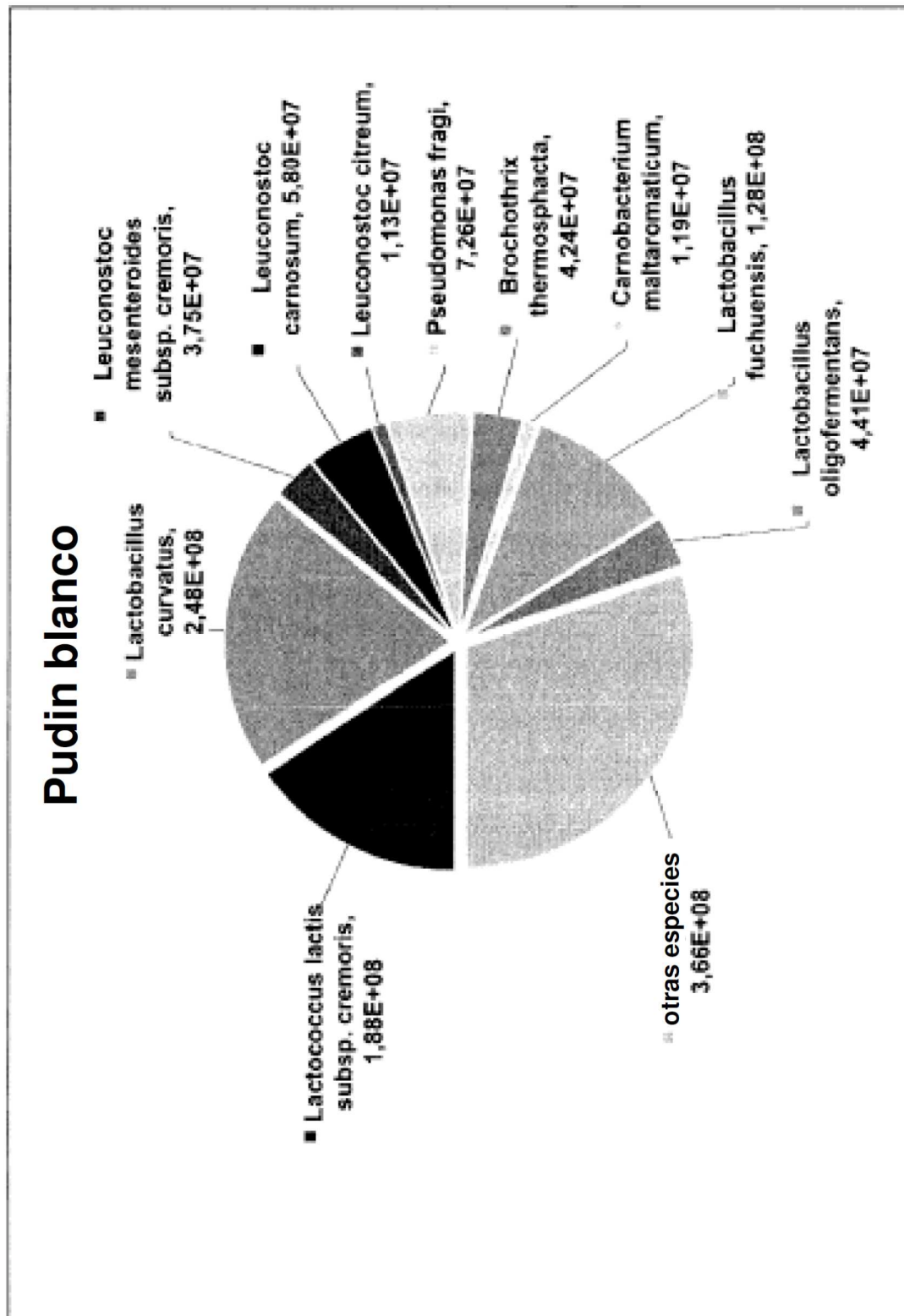


FIGURA 20 (B) (3/6)

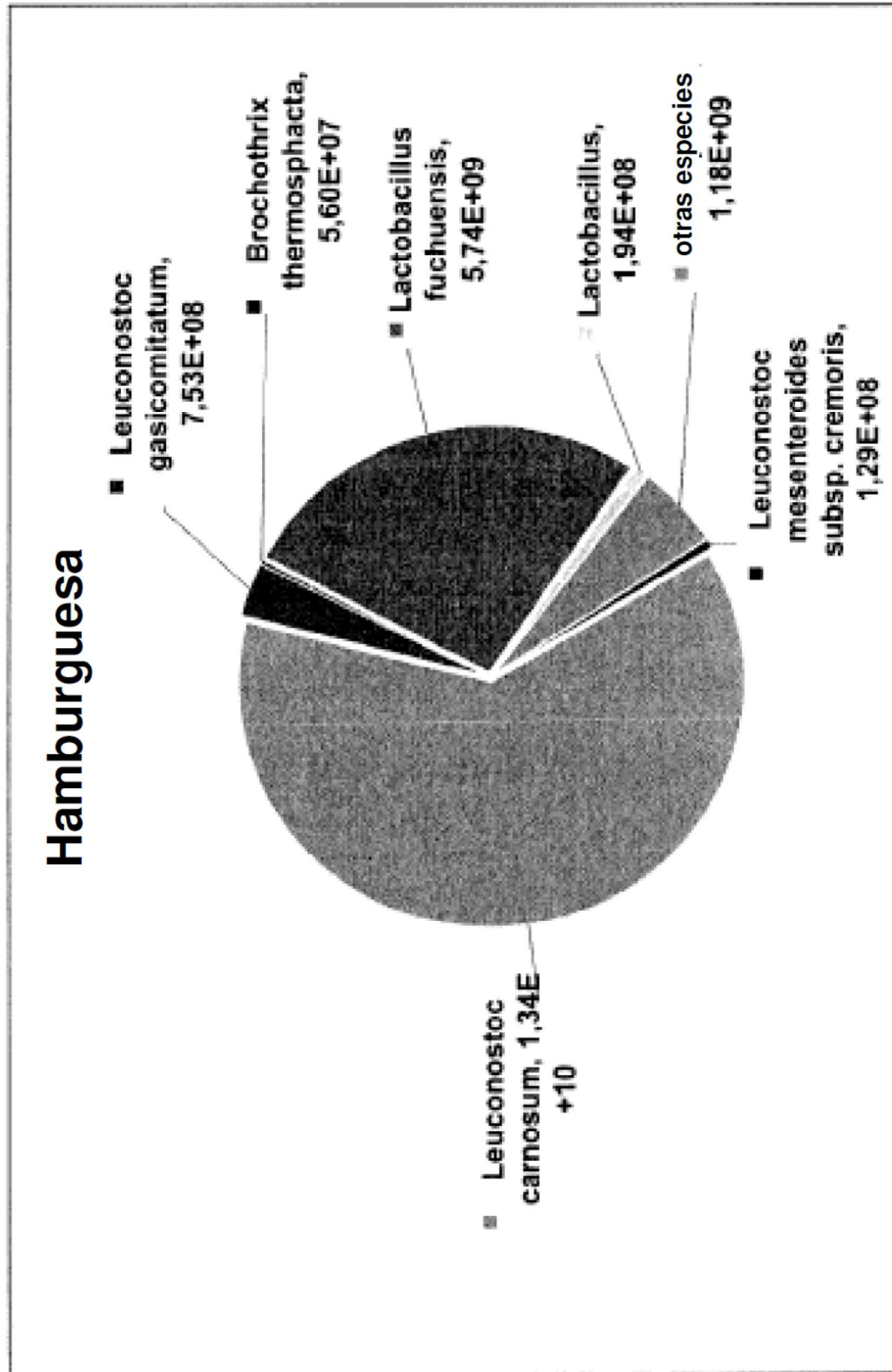


FIGURA 20 (B) (4/6)

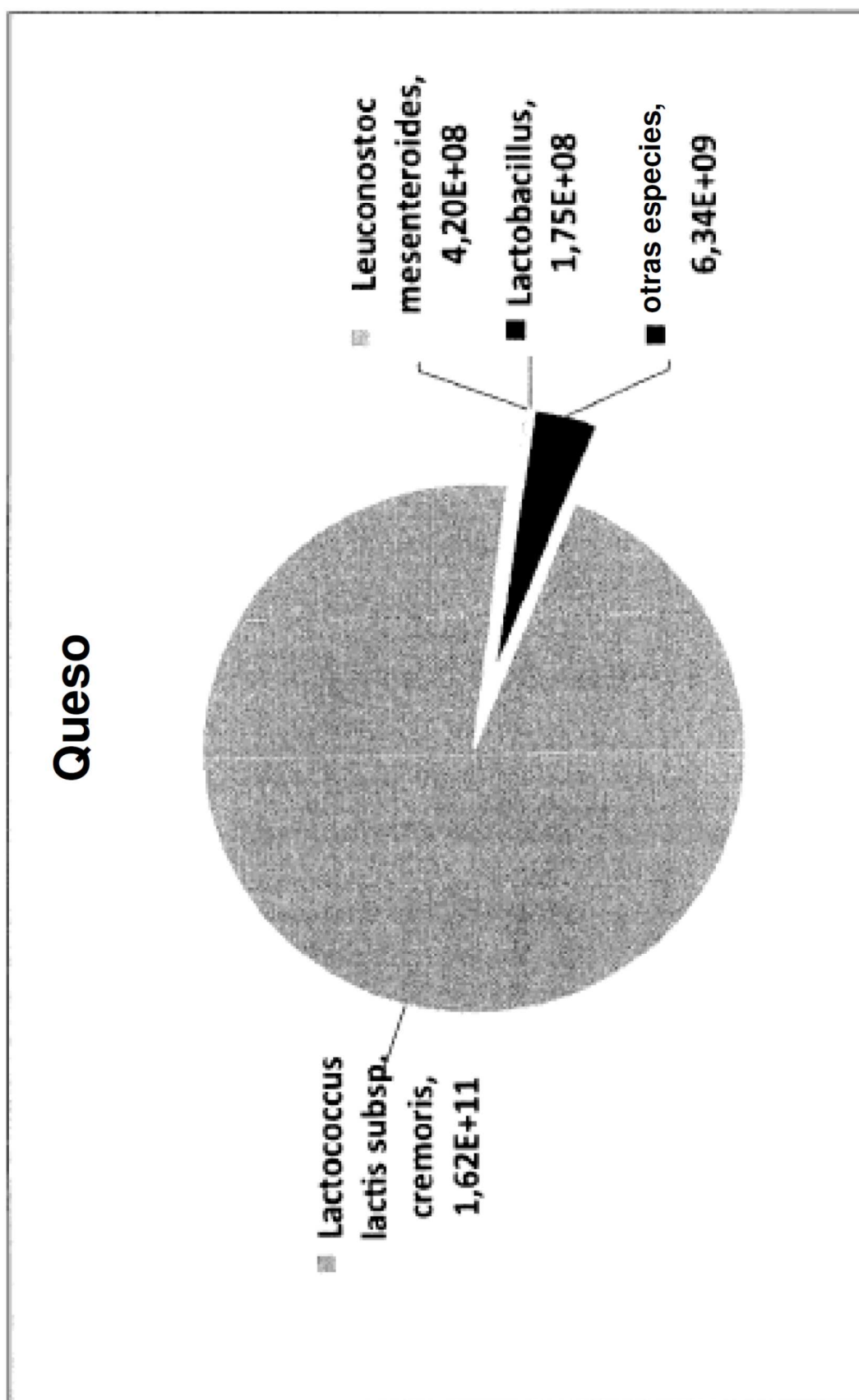


FIGURA 20 (B) (5/6)

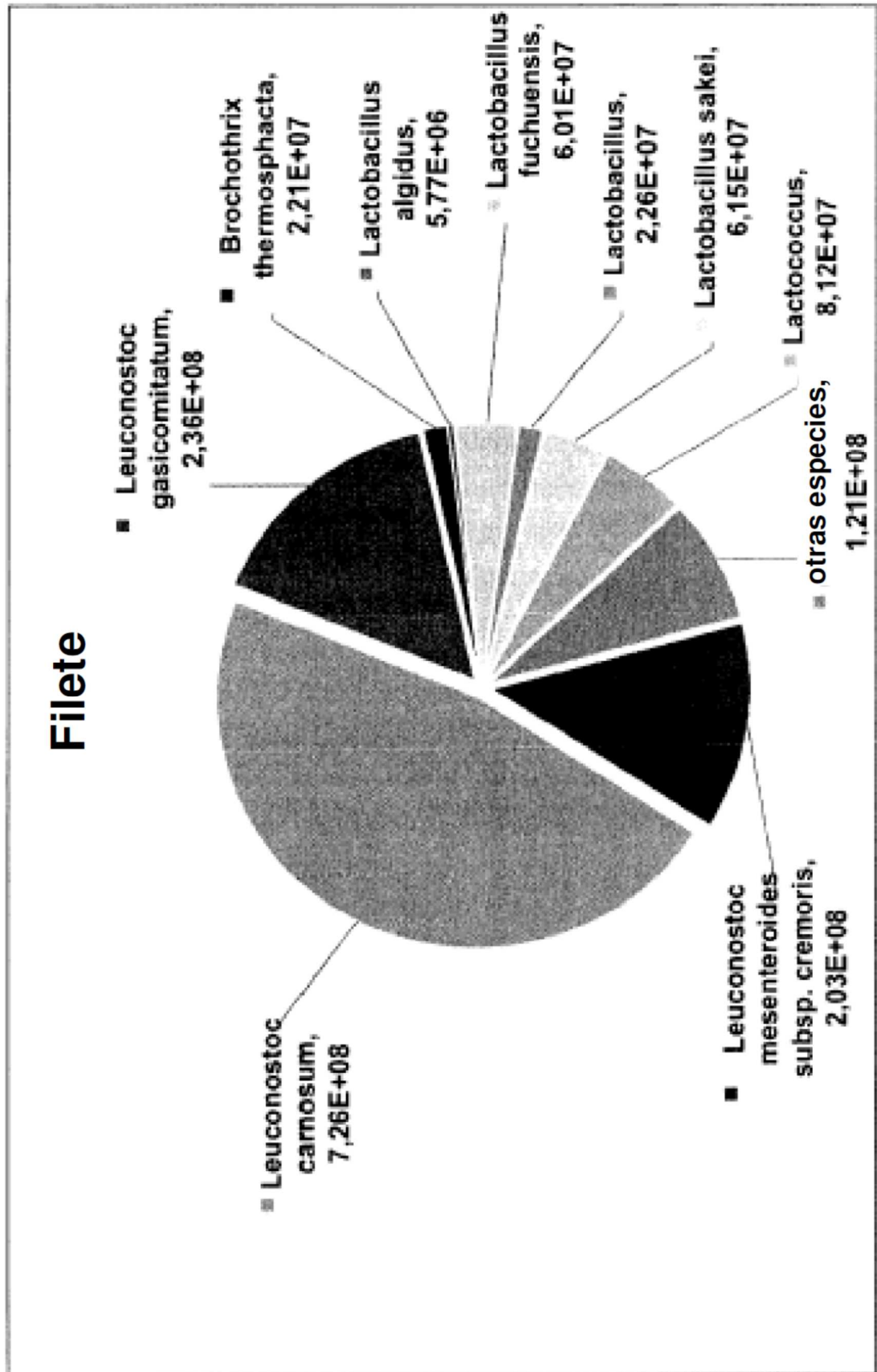


FIGURA 20 (B) (6/6)

