

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGROECOSISTEMA DE MELÓN  
(*Cucumis melo L.*) E IMPLEMENTACIÓN DE TECNOLOGÍA PARA  
SECUENCIACIÓN METAGENÓMICA.

Por

L.B.G. CARLOS JESÚS RUÍZ AMARO

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Diciembre 2021

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGROECOSISTEMA DE MELÓN  
(*Cucumis melo L.*) E IMPLEMENTACIÓN DE TECNOLOGÍA PARA  
SECUENCIACIÓN METAGENÓMICA.

Comité de Tesis



---

**Dr. José Santos García Alvarado**  
Presidente



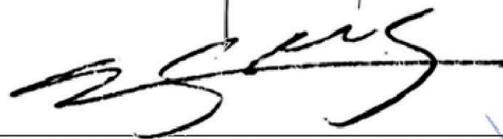
---

**Dra. Norma L. Heredia Rojas**  
Secretaria



---

**Dr. José Ángel Merino Mascorro**  
Vocal



---

**Dr. Eduardo Franco Frías**  
Vocal



---

**Dr. Jorge Esteban de Jesús Dávila Aviña**  
Vocal



---

**Dra. Katiushka Arévalo Niño**  
Subdirectora de Posgrado



ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGROECOSISTEMA DE MELÓN  
(*Cucumis melo L.*) E IMPLEMENTACIÓN DE TECNOLOGÍA PARA  
SECUENCIACIÓN METAGENÓMICA.

Dirección de tesis



---

**Dr. José Santos García Alvarado**

Presidente

DERECHOS RESERVADOS©  
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante todo el programa lo cual me permitió continuar con mis estudios de maestría.

A Dios por darme la fuerza, el aliento y la determinación para poder superar cualquier reto o adversidad durante mi camino profesional.

A mi familia, en especial a mis amados padres; que cada día me muestran y dan ejemplo de amor y entrega por los ideales más nobles; así como protección, soporte y ayuda durante cada etapa de mi vida.

A los Doctores Santos y Norma; por ser un gran ejemplo en la labor de la investigación para cada uno de sus estudiantes y por tener fe en mí para lograr mis objetivos.

Al laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos, por brindarme apoyo e infraestructura para poder realizar mis experimentos, además de un excelente ambiente de trabajo.

A mis profesores de la UANL; que siempre con calidad en el posgrado de microbiología nos aportan su conocimiento con pasión.

A mi hermana, que desde lejos siempre buscó la manera de apoyarme.

## **DEDICATORIAS**

A Dios por mostrarme un camino digno con mayor significado.

A mis amados padres y hermanos; por el núcleo de afecto.

A los doctores Santos y Norma por su inmensa confianza.

# ÍNDICE

Sección	Página
Portada.....	I
Hoja de firmas.....	II
Agradecimientos.....	V
Dedicatorias.....	VI
Índice.....	VII
Índice de tablas.....	X
Índice de figuras.....	XII
Lista de símbolos y abreviaturas.....	XIV
Resumen.....	XI
Abstract.....	XVII
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 ANTECEDENTES.....	3
2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) y microorganismos indicadores de contaminación.....	3
2.2 La contaminación de productos frescos y relación con ETAs.....	4
2.3 La contaminación en el melón.....	5
2.3.1 Calidad del agua de riego.....	6
2.3.2 Fertilizantes orgánicos.....	7
2.3.3 El suelo y sus microorganismos contaminantes.....	8
2.3.4 Contaminación por contacto de los trabajadores.....	8
2.4 Microorganismos contaminantes en el agroecosistema del melón.....	8
2.4.1 <i>E. coli</i> patógena.....	9
2.4.2 <i>Salmonella</i> spp.....	10
2.4.3 <i>Enterococcus</i> spp.....	10

2.4.4	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	11
2.5	La resistencia a compuestos antimicrobianos o RAM.....	11
2.5.1	Mecanismos de adquisición de la RAM.....	12
2.5.2	El resistoma en la producción de alimentos.....	13
2.6	Tecnologías basadas en la secuenciación genética de siguiente generación. ....	14
2.7	Bioinformática para el análisis de la secuenciación genética.....	19
2.7.1	Debian como sistema operativo.....	20
3	JUSTIFICACIÓN.....	22
4	HIPOTESIS.....	23
5	OBJETIVO GENERAL.....	24
6	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	24
7	MATERIALES Y METODOS.....	25
7.1	Área de trabajo.....	25
7.2	Recolección de las muestras.....	25
7.2.1	Recolección de muestras: agroecosistema del melón.....	25
7.2.2	Lavado de melones.....	25
7.2.3	Recolección de muestras de manos de los trabajadores.....	26
7.2.4	Recolección de muestras de agua.....	26
7.2.5	Recolección de muestras de suelo.....	27
7.3	Procesamiento de las muestras.....	27
7.3.1	Análisis de las muestras, determinación de microorganismos indicadores de contaminación.....	28
7.3.2	Determinación de microorganismos patógenos presuntivos.....	30
7.3.3	Extracción de ADN de alto peso molecular de las muestras filtradas.....	32
7.3.4	Preparación del ADN para la generación de librerías ONT.....	35

7.4	Bioinformática.....	37
7.5	Análisis estadísticos.....	37
8	RESULTADOS .....	38
8.1	Determinación de microorganismos indicadores de contaminación. ....	38
8.1.1	Conteo de UFC de microorganismos indicadores de contaminación. ....	39
8.1.2	Determinación estadística del marco muestral para la secuenciación metagenómica. ....	44
8.1.3	Determinación de cepas presuntivas de microorganismos patógenos. ....	49
8.2	Evaluación de los métodos de extracción de ADN de alto peso molecular proveniente del microbioma presente en el agroecosistema del melón.....	51
8.2.1	Comparativa de los métodos analíticos de la concentración de ADN de alto peso molecular. ....	54
8.2.2	Consideraciones en la generación de librerías para secuenciación metagenómica con ONT. ....	56
8.3	Implementación de tecnologías de la información para la ejecución y análisis de la secuenciación metagenómica para MinION de ONT.....	57
9	DISCUSIÓN .....	59
10	CONCLUSIONES.....	65
11	PERSPECTIVAS.....	66
12	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67

## INDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Muestras recolectadas por cada campo en diferentes puntos del agroecosistema del melón. ....	27
<b>Tabla 2.</b> Genes constitutivos para la determinación del microbioma bacteriano asociado al ambiente agrícola de melón. ....	31
<b>Tabla 3.</b> Artículos más representativos de la revisión para determinación de protocolo de extracción de ADN de alto peso molecular utilizado en secuenciación metagenómica. ....	32
<b>Tabla 4.</b> Muestras recolectadas por cada campo en diferentes puntos del agroecosistema del melón. ....	38
<b>Tabla 5.</b> Concentraciones log <sub>10</sub> de UFC/ml de principales microorganismos indicadores de contaminación en campo 1 visita 1. ....	40
<b>Tabla 6.</b> Concentraciones log <sub>10</sub> de UFC/ml de principales microorganismos indicadores de contaminación en campo 2 visita 1 y 2. ....	42
<b>Tabla 7.</b> Resultados de las pruebas estadísticas para el conteo de UFC/ml de coliformes presentes en el campo 1 en la visita 1 y 2. ....	44
<b>Tabla 8.</b> Resultados de las pruebas estadísticas para el conteo de UFC/ml de coliformes presentes en el campo 2 en la visita 1 y 2. ....	45
<b>Tabla 9.</b> Resultados de las pruebas estadísticas para el conteo de UFC/ml de <i>Enterococcus</i> spp. presentes en el campo 1 en la visita 1 y 2. ....	46
<b>Tabla 10.</b> Resultados de las pruebas estadísticas para el conteo de UFC/ml de <i>Enterococcus</i> spp presentes en el campo 2 en la visita 1 y 2. ....	47
<b>Tabla 11.</b> Resultados de las pruebas estadísticas para el conteo de UFC/ml de <i>E. coli</i> presentes en el campo 1 en la visita 1 y 2. ....	48

<b>Tabla 12.</b> Resultados de las pruebas estadísticas para el conteo de UFC/ml de <i>E. coli</i> presentes en el campo 2 en la visita 1 y 2. ....	48
<b>Tabla 13.</b> Visita 1 para ambos campos. Colección de cepas presuntivas preservadas en glicerol al 20% y -80 oC Clave: H= muestra de manos, M=melón, A= agua de irrigación y S= suelo. #1=campo, #2 = muestra, #3 = colonia. En negritas las cepas presuntivas analizadas .....	50
<b>Tabla 14.</b> Resultados de la determinación por PCR punto final de microorganismos patógenos contaminantes en el agroecosistema del melón. R: Resultado de la prueba. ....	50
<b>Tabla 15.</b> Numero de membranas obtenidas y preservadas a -80 oC por tipo de muestra recolectada y campo visitado en la región de Paila Coah. México. ....	51
<b>Tabla 16.</b> Extracciones de ADN de muestras filtradas correspondientes a diferentes puntos del agroecosistema de melón. A corresponde al campo 1 y B corresponde al campo 2. La pureza y concentración fueron determinadas por Nanodrop 2000 (Thermo Fisher).....	52
<b>Tabla 17.</b> Concentraciones de ADN de las muestras representativas en el agroecosistema del melón. ....	54
<b>Tabla 18.</b> ADN de alto peso molecular mezclado entre cada uno de los tipos de muestras, para la generación de las librerías de secuenciación separadas por códigos de barras para lograr la secuenciación metagenómica múltiple.....	56
<b>Tabla 19.</b> Software y herramientas utilizadas en el análisis de secuencias genéticas obtenidas con Oxford Nanopore Technologies. ....	58

## INDICE DE FIGURAS.

<b>Fig. 1.</b> Diagrama representativo del procesamiento de las muestras por medio de filtración en membrana.....	28
<b>Fig. 2.</b> Procesamiento de las muestras para obtención de microorganismos patógenos de interés.....	30
<b>Fig. 3.</b> Representación esquemática del protocolo para cuantificación de ADN por método fluorométrico utilizando Qubit™ dsDNA HS Assay Kit de Invitrogen.....	35
<b>Fig. 4.</b> Representación gráfica de generación de librerías con Rapid Sequencing (SQK-RAD004) ONT 2021. ....	36
<b>Fig. 5.</b> Representación gráfica adición código de barras con Rapid Barcoding (SQK -RBK004) ONT 2021. ....	36
<b>Fig. 6.</b> Crecimiento de colonias características de microorganismos indicadores en sus respectivos medios selectivos.....	39
<b>Fig. 7.</b> Concentraciones log <sub>10</sub> de UFC/ml de microorganismos indicadores, concentración media y desviación estándar de la repetición del conteo para Campo 1 visita 1.....	41
<b>Fig. 8.</b> Concentraciones log <sub>10</sub> de UFC/ml de microorganismos indicadores, concentración media y desviación estándar de la repetición del conteo para Campo 1 visita 2.....	41
<b>Fig. 9.</b> Concentraciones log <sub>10</sub> de UFC/ml de microorganismos indicadores, concentración media y desviación estándar de la repetición del conteo para Campo 2 visita 1.....	43
<b>Fig. 10.</b> Concentraciones log <sub>10</sub> de UFC/ml de microorganismos indicadores, concentración media y desviación estándar de la repetición del conteo para Campo 2 visita 2.....	43
<b>Fig. 11.</b> Estimación y comparación de las medias de la concentración de UFC/ml para coliformes en el campo 1 visita 1 y 2. ....	45

<b>Fig. 12.</b> Estimación y comparación de las medias de la concentración de UFC/ml para coliformes en el campo 2 visita 1 y 2. ....	45
<b>Fig. 13.</b> Estimación y comparación de las medias de la concentración de UFC/ml para <i>Enterococcus</i> spp en el campo 1 visita 1 y 2. ....	46
<b>Fig. 14.</b> Estimación y comparación de las medias de la concentración de UFC/ml para <i>Enterococcus</i> spp en el campo 2 visita 1 y 2. ....	47
<b>Fig. 15.</b> Estimación y comparación de las medias de la concentración de UFC/ml para <i>E. coli</i> en el campo 1 visita 1 y 2. ....	48
<b>Fig. 16.</b> Estimación y comparación de las medias de la concentración de UFC/ml para <i>E. coli</i> en el campo 2 visita 1 y 2. ....	49
<b>Fig. 17.</b> Aislados de microorganismos patógenos presuntivos con su respectivo medio de cultivo selectivo. ....	50
<b>Fig. 18.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1%, muestras de ADN obtenidas con el kit comercial DNeasy Power Water kit (Qiagen). Comparativa contra el método de extracción Fenol-cloroformo. ....	53
<b>Fig. 19.</b> Análisis de las concentraciones de ADN por los dos principales métodos de cuantificación, se incluye el grafico de las medias de los valores de absorbancia para determinación de pureza y calidad de las muestras. ....	55
<b>Fig. 20.</b> Diferencia de medias entre las concentraciones de ADN determinadas por los dos principales métodos de cuantificación. Alfa =0.05, P= 0.0315, t=2.285 y gl=24 ...	55

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

<b>Símbolo</b>	<b>Definición</b>
%.....	Porcentaje
μl.....	Microlitros
μm.....	Micrómetros
ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
ARM.....	Resistencia antimicrobianos
CDC.....	Centro de Control de Enfermedades
EDTA.....	Ácido etilendiaminotetraacético
ETAs.....	Enfermedades transmitidas por alimentos
GRAs.....	Genes de Resistencia a antibióticos
M.....	Molar
MAGs.....	Metagenomas ensamblados
MAFFT.....	Algoritmo de secuencias múltiples
ml.....	Mililitros
mM.....	Milimolar
NaCl.....	Cloruro de sodio
OMS.....	Organización Mundial de la Salud
ONT.....	Oxford Nanopore Technologies

OTUs	Unidades Taxonoómicas Operativas
oz	onzas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa <i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga
SAGARPA	Secretaría de agricultura y desarrollo rural pesca y alimentación
SIAP	Servicio de información agroalimentaria y pesquera.
THG	Transferencia Genética Horizontal
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
UFC/g	Unidades Formadoras de Colonia por gramo
UFC/ml	Unidades Formadoras de Colonia por mililitro
UV	Luz ultravioleta

## RESUMEN.

La seguridad alimentaria es una preocupación mundial y los consumidores tienen derecho a alimentos inocuos y nutritivos. Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) tienen su origen debido al consumo de alimentos contaminados con microorganismos en suficiente cantidad para afectar la salud del consumidor; esta contaminación puede provenir de diversas fuentes dentro de un agroecosistema, tales como el suelo, uso de abonos, la presencia de animales en huertos, la manipulación o el agua de riego, en productos frescos, frutos y hortalizas. Dentro de los patógenos asociados a contaminación destacan *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Enterococcus* spp, y *Listeria monocytogenes* entre otros. En la actualidad se estudia con gran interés la presencia de antibióticos en agricultura y ganadería, ya que conlleva un riesgo en la adquisición de resistencia a los antimicrobianos (RAM) por bacterias adaptadas a estos ambientes, las cuales, aun siendo comensales o no patógenas, actúan como reservorios y probables diseminadores de genes de resistencia a antibióticos (GRAs) a microorganismos patógenos. La determinación del microbioma, resistoma y otros elementos asociados a la adquisición de RAM es fundamental para la evaluación de riesgos a la salud causados por microorganismos patógenos contaminantes dentro de un agroecosistema. En el presente trabajo se determinó por técnicas de cultivo microbiológico el conteo de microorganismos indicadores de contaminación, así como la presencia de microorganismos patógenos de importancia clínica, y se analizaron estadísticamente las concentraciones de UFC/ml para cada uno de los agroecosistemas visitados en la región de Paila Coah, de Zaragoza, México. Adicionalmente se obtuvo ADN del metagenoma del ambiente agrícola para una posterior secuenciación. Gracias a los resultados, el presente trabajo propuso la implementación de un método molecular de análisis de última generación, en particular de la técnica de secuenciación del ADN de lecturas largas de última generación Oxford Nanopore technologies (ONT). Esto para su futura utilización en aspectos de inocuidad alimentaria que permitirá identificar microorganismos patógenos contaminantes además de determinantes asociados a la adquisición de RAM en una muestra compleja como es el agroecosistema del melón.

## ABSTRACT

Food safety is a global concern and consumers have a right to safe and nutritious food. Foodborne diseases (FBDs) originate from the consumption of food contaminated with microorganisms in sufficient quantity to affect the health of the consumer; this contamination can come from various sources within an agroecosystem, such as the soil, use of fertilizers, the presence of animals in farms, handling or irrigation water, among others. Pathogens associated with contamination include *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Enterococcus* spp, and *Listeria monocytogenes*, and others. Currently, the presence of antibiotics in agriculture and livestock is being studied with great interest, since it entails a risk in the acquisition of antimicrobial resistance (AMR) by bacteria adapted to these environments, which, even if they are commensal or non-pathogenic, act as reservoirs and probable disseminators of antibiotic resistance genes (ARGs) to pathogenic microorganisms. The determination of the microbiome, resistome and other elements associated with the acquisition of AMR is fundamental for the evaluation of health risks caused by contaminating pathogenic microorganisms within an agroecosystem. In the present study, microbiological culture techniques were used to determine the presence of microbes indicators of bacterial contamination as well as the presence of pathogenic microorganisms of clinical importance. The concentrations of CFU/ml were statistically analyzed for each of the agroecosystems visited in the region of Paila Coah, Zaragoza, Mexico. Additionally, we obtained DNA from the melon agroecosystem for future metagenomic analyses. These actions prompted us to implement a next-generation molecular method of analysis, in particular, the next-generation long-read DNA sequencing technique Oxford Nanopore technologies (ONT) was developed. This procedure will be used in future analyses that will allow the identification of contaminating pathogenic microorganisms as well as determinants associated with the acquisition of AMR in a complex sample such as the melon agroecosystem.

# 1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) se consideran como una importante carga para los sistemas de salud en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que, en países menos desarrollados, las ETAs son la principal causa de morbilidad y mortalidad asociadas a una carga socioeconómica significativa. Las causas más frecuentes de enfermedades transmitidas por alimentos son producidas por agentes de enfermedades diarreicas, especialmente: *Norovirus*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella enterica*, *Taenia solium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli O157:H7*, y *Shigella sp.* Alrededor de 70% de las diarreas se originan por la ingestión de alimentos contaminados con estos microorganismos y/o sus toxinas (González y Rojas, 2005). Se han descrito aproximadamente 250 agentes causantes de ETAs, entre los que se incluyen bacterias, virus, hongos, parásitos, priones, toxinas y metales pesados.

Los productos frescos, como frutas y vegetales, son susceptibles a la contaminación por patógenos durante toda la cadena de producción hasta su distribución, por lo que su consumo es considerando como de riesgo (Althaus *et al.*, 2012). El melón (*Cucumis melo L.*), es un producto que durante su cosecha se encuentra en contacto directo con agua superficial de riego, suelo y manos de trabajadores, siendo estas las principales vías de contaminación por bacterias patógenas como *Salmonella*, *E. coli O157:H7*, *L. monocytogenes*, *Enterococcus* entre otros (Heredia *et al.*, 2016). Existe la posibilidad de que el melón sufra contaminación por especies patógenas del género *Salmonella* o cualquier otro microorganismo patogénico, como *Shigella spp.* o *E. coli O157:H7*, es debido a su exposición a una serie de factores durante su cultivo, desarrollo, cosecha y manejo postcosecha. Por ejemplo, el sembrar en suelos que están contaminados y la utilización de abonos orgánicos mal compostados o agua de riego contaminada, así como los animales en campo y una falta de higiene por parte de los trabajadores, durante cualquier etapa en la cadena de producción, distribución y comercialización, son algunos de los factores que comprometen la calidad sanitaria del melón (Ailes *et al.*, 2008).

Los antibióticos son un tipo de fármacos utilizados para el tratamiento y prevención de infecciones bacterianas mediante la eliminación o inhibición del crecimiento de bacterias (Butaye *et al.*, 2003). Se han encontrado o sintetizado numerosos tipos diferentes de

antibióticos, que suelen clasificarse en relación con su función y sus mecanismos de acción, estructura química o espectro de actividad (Calderón y Sabundayo, 2007). Según la clasificación por su mecanismo de acción, los antibióticos más comunes son:  $\beta$ -lactámicos, sulfonamidas, monobactamas, carbapenémicos, aminoglucósidos, glicopéptidos, lincomicina, macrólidos, polipéptidos, polienos, rifamicina, tetraciclinas, cloranfenicol, quinolonas y fluoroquinolonas (Gothwal *et al*, 2015). En la actualidad, es habitual el uso de antibióticos en el ambiente agropecuario, sin embargo, esto permite la selección natural de bacterias no patógenas y patógenas, que son resistentes a estos antibióticos, convirtiéndose en reservorios de estos genes, y transfiriéndolos a bacterias del microbioma del suelo y hortalizas, por procesos como la transferencia horizontal de genes (Tong *et al*. 2020).

La resistencia a los antimicrobianos es un importante desafío para la salud mundial. La metagenómica permite analizar el microbioma, el resistoma y determinantes asociados a la adquisición de RAM en ecosistemas microbianos dispares y complejos (Bengtsson-Palme *et al*, 2017) como es el agroecosistema de melón. Frecuentemente, algunos microorganismos que están presentes en muestras ambientales no pueden ser aislados por técnicas microbiológicas convencionales, por lo cual se propone el uso de técnicas moleculares y bioinformáticas para su análisis y determinación (Kunin *et al*, 2008), dando lugar a la era de la secuenciación metagenómica (Handelsman *et al*, 1998), la cual ha permitido analizar diferentes ecosistemas para buscar genes de interés como son los de resistencia a antimicrobianos, productos metabólicos y enzimas (Pérez y Mercado, 2018). La secuenciación metagenómica del ADN se ha utilizado para detectar factores de virulencia y genes de resistencia a diferentes antibióticos en abono (Pérez y Mercado, 2018), suelos y plantas provenientes de diferentes agroecosistemas (Popowska *et al*. 2011; Belda-Ferre *et al*. 2011). Utilizando tecnología de secuenciación de última generación Oxford Nanopore Technologies, y análisis bioinformático de microbiomas y determinantes asociados a la adquisición de RAM, se puede establecer el riesgo potencial de diseminación o adquisición de GRAs entre los microorganismos patógenos y no patógenos presentes en muestras complejas como es el agroecosistema de melón, dando como resultado una mayor amplitud en cuanto al análisis de la muestra, a diferencia de los métodos microbiológicos convencionales.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) y microorganismos indicadores de contaminación.

En acuerdo con la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA), las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son aquellas originadas por el consumo de alimentos o bebidas contaminadas con microorganismos patógenos tales como virus, bacterias, hongos, parásitos y/o toxinas derivadas de éstos (Kirk *et al.* 2015). Respecto a la sintomatología provocada por estas enfermedades es caracterizada principalmente por náusea, vómito, diarrea, dolor abdominal y fiebre (Soto Varela *et al.* 2016).

Las ETAs son originadas principalmente por la contaminación de productos alimenticios y de consumo agrícola durante su producción y/o proceso, donde los microorganismos patógenos no son eliminados por mediante control de calidad o prácticas de inocuidad (Bartz *et al.* 2017). Esto ha conllevado a una gran cantidad de enfermedades, contabilizándose tan solo en Estados Unidos entre los años 2001 y 2010, alrededor de 25,000 enfermedades y 600 brotes por consumo de frutas y verduras contaminadas (Heredía *et al.* 2016).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que, en países menos desarrollados, las ETAs son la principal causa de enfermedad y muerte, asociadas a una carga socioeconómica significativa. En los países desarrollados, las ETAs son responsables de altos niveles de pérdida de productividad, costos asociados al uso de los servicios de salud y a la implementación y monitoreo de políticas de inocuidad alimentaria (Fabiszewski de Aceituno *et al.* 2016). Como estadística el 70% de las diarreas se originan por el consumo de alimentos contaminados con microorganismos y/o sus toxinas. La OMS ha estimado que, en el mundo, la incidencia anual de diarreas es de aproximadamente 1 500 millones de casos, y de ellos 3 millones de niños menores de cinco años fallecen anualmente (Olea *et al.* 2012).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que la carga mundial de ETAs es comparable con las principales enfermedades infecciosas: VIH/sida, paludismo y tuberculosis (Havelaar *et al.* 2010). Frecuentemente las enfermedades transmitidas por

alimentos son producidas por microorganismos, especialmente: Norovirus, *Campylobacter* spp., *Salmonella entérica*, *T. solium*, *S. aureus*, *C. perfringens*, *E. coli O157:H7*, *Shigella* spp., siendo *L. monocytogenes* y el virus de la hepatitis A responsables de una alta mortalidad (Cárdenas *et al.* 2013). Anualmente, las enfermedades de transmisión alimentaria afectan a 1 de cada 10 personas a pesar de ser prevenibles; por año 77 millones de personas enferman y de ellas 31 millones son menores de 5 años y más de 9.000 personas fallecen en las Américas a causa de ETAs. Así también las enfermedades diarreicas representan el 95% de las enfermedades de transmisión alimentaria en la región de las Américas (OMS, 2015).

## **2.2 La contaminación de productos frescos y relación con ETAs.**

Los productos frescos son parte de una dieta rica y saludable, y su consumo ha aumentado a través de los últimos años. En definición, la International Fresh-cut Produce Association (IFPA por sus siglas en inglés) dice que los productos frescos son aquellos como las frutas o verduras que han sido precortadas, peladas y/o cortadas como un producto 100% consumible que es embolsado o preenvasado para ofrecer a los comensales la conveniencia, del mantenimiento y la frescura (Cardenas *et al.* 2013). Sin embargo, al ser consumidos regularmente crudos, pueden conllevar un riesgo para la salud pública. Los microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos pueden tener contacto con frutas y verduras frescas en cualquier momento durante su línea de producción, por ejemplo, en el nivel de la pre-cosecha pueden estar en contacto con agua de riego contaminada, tierra, estiércol o materia fecal de animales salvajes provocando su posible contaminación (Zoellner *et al.* 2016).

Entre los frutos que han mostrado mayor incidencia como causantes de brotes importantes de ETAs, dentro de Estados Unidos, Canadá y México, se incluye al melón, que al ser consumido generalmente crudo o sin una limpieza exhaustiva, se reportan como uno de los principales vehículos de transmisión y agentes causales de estas enfermedades (Heredía *et al.* 2016).

### 2.3 La contaminación en el melón

El melón cantaloupe (*Cucumis melo* L.) proveniente de algunos estados de México, ha sido asociado anteriormente con brotes de salmonelosis en Estados Unidos de América (E.U.A) y Canadá en el 2001. Debido a que estos brotes que fueron causantes de numerosas enfermedades y decesos, todas las exportaciones del melón mexicano a EUA y otras del mundo se afectaron, inclusive al grado del cierre de fronteras, con la autoridad de organismos de vigilancia alimentaria como es la Administración Federal de Drogas y Alimentos (FDA) (FDA, 2002). En otro ejemplo en Septiembre del 2011, quince personas murieron y 84 enfermaron en Estados Unidos después de comer melones infectados con *Listeria* provenientes de una granja de Colorado (oeste), el brote fue atribuido a la firma Jensen Farms, un emprendimiento familiar, que llamó a un retiro del mercado de los melones contaminados a mediados de septiembre de ese mismo año, los casos fueron reportados en 19 estados, según el CDC (CDC, 2011).

El melón es una fruta consumida en grandes cantidades (Bowen *et al.* 2006; Walsh *et al.* 2015; Zoellner *et al.* 2016), que desafortunadamente se relaciona con brotes importantes, como fue el causado por *Salmonella* entérica serotipo *Poona*, entre 2000 y 2002 (Bowen *et al.* 2006; Walsh *et al.* 2015) y *L. monocytogenes* en el 2011 (Walsh *et al.* 2015; Dolan *et al.* 2018). Debido a la alta incidencia de diferentes serotipos de *Salmonella spp.* en estos frutos, se han reconocido a los melones como naturalmente contaminados con este microorganismo (FDA 2015). Generalmente, los microorganismos no son capaces de proliferar favorablemente en la superficie de frutas y vegetales, ya que la mayoría no cuentan con las enzimas necesarias, para la degradación de barreras externas que las protegen, sin embargo, existe una excepción para productos como el melón, esto debido a características morfológicas propias de la fruta como son su cáscara rugosa, por lo tanto la mayoría de los brotes e infecciones reportados por el consumo de este producto, se han producido por contaminación superficial (FDA 2015). Existe la posibilidad de que el melón se contamine por especies del género *Salmonella* o cualquier otro microorganismo patogénico para humanos, como *Shigella spp.* o *E. coli* O157:H7, es debido a su exposición a una serie de factores durante su cultivo, desarrollo, cosecha y manejo postcosecha.

La siembra en suelos contaminados con abonos orgánicos mal compostados o agua de uso agrícola contaminada, así como tener animales de granja en el campo y una falta de higiene

de los trabajadores, durante cualquier etapa de la cadena de producción, distribución y comercialización, son algunos de los factores que llegan a comprometer la calidad alimentaria del melón (FDA, 2003). Si se quiere garantizar la inocuidad de este alimento, se propone el establecimiento de controles para identificar y evitar la contaminación, propagación y desarrollo de microorganismos patógenos y/o sus toxinas en el agroecosistema del melón.

En cuanto a la producción de melón, México exportó a nivel internacional más de 603 mil toneladas de producto anuales, principalmente a Estados Unidos y Japón (SAGARPA, 2016) siendo la métrica más alta en los últimos años, además la superficie cultivada con melón en México asciende a 19,076 hectáreas anuales, con una producción de 627,135 toneladas (SIAP, 2019); por lo cual surge la necesidad de determinar e identificar microorganismos potencialmente patógenos presentes en su agroecosistema para así evitar la propagación de éstos ocasionando pérdidas y repercusiones monetarias a nivel de producción y pérdida del producto así como también en el uso del sistema de salud, y la capacidad y fuerza laboral de los trabajadores del país (Castillo *et al*, 2004).

La presencia de microorganismos contaminantes en la superficie del melón se ha relacionado principalmente con su agroecosistema, en donde se han identificado las siguientes fuentes de contaminación:

### **2.3.1 Calidad del agua de riego**

La calidad del agua de riego puede ser drásticamente afectada debido a varios factores; por ejemplo, la materia fecal, el suelo, el desbordamiento de aguas residuales pueden introducir enteropatógenos directamente a los cursos del agua que se utiliza para el riego de cultivos. Debido a la ausencia de agua limpia para uso en agricultura, en varios países se ha incrementado del uso de aguas residuales para irrigación de cultivos de frutas y vegetales (Balkhair 2016), debido a que no son tratadas adecuadamente, se puede encontrar la presencia de bacterias entéricas, virus, protozoarios y helmintos (Marine 2015). *S. entérica* y *E. coli* son las principales bacterias patógenas reportadas en aguas llegando a representar hasta un 15% respecto a otros microorganismos patógenos.

Otro aspecto en cuanto al agua que influye en la contaminación del cultivo, es el intervalo de tiempo entre el riego y la cosecha, ya que puede afectar la probabilidad de que bacterias patógenas se desarrollen hasta llegar al consumidor. Como un ejemplo tenemos que se realizó una encuesta en el Reino Unido a los productos que son base en ensalada de verduras demostró que más del 50% de ellos se cosecharon dentro de las 24 h del último riego (Tyrell *et al.*, 2006). Debido a que el agua de riego utilizada durante el cultivo agrícola puede provenir de diversas fuentes, por ende, con respectiva diversidad microbiana, ésta representa una ruta de contaminación muy frecuente en los productos agrícolas. Las aguas pueden provenir de lluvia, subterráneas o poco profundas, superficiales (incluyendo estanques, lagos, ríos y arroyos) y residuales, sin tratar o tratadas de forma inadecuada. La contaminación puede ser con microorganismos provenientes de heces, desechos de hospitales, desechos de hogares, etc. (Alegbeleye *et al.* 2018; Antwi-Agyei *et al.* 2015). El uso de aguas residuales no tratadas predice un gran riesgo, ya que, al tener bacterias patógenas provenientes de animales de granja o desechos humanos, pueden poseer genes de virulencia y resistencia a ciertos antibióticos los cuales pudieran transferirse a otras bacterias mediante transferencia horizontal de genes y elementos móviles (Servais y Passerat 2009).

### **2.3.2 Fertilizantes orgánicos**

Existe un actual uso de fertilizantes hechos a base de estiércol de animales y que son aplicados al suelo de frutos orgánicos y cultivos vegetales, lo cual ha desencadenado una gran preocupación sobre el incremento de contaminación aumentando la posibilidad de que enteropatógenos entren a los agroecosistemas de alimentos altamente consumidos (Cardenas *et al.* 2013). Los fertilizantes orgánicos basados en estiércol de animales son considerados reservorios de bacterias resistentes a antibióticos, genes de resistencia y virulencia, los cuales pueden afectar directamente al humano por el consumo de frutas y vegetales contaminados (Udikovic-Kolic *et al.* 2014).

### **2.3.3 El suelo y sus microorganismos contaminantes.**

Los patógenos presentes en el suelo pueden ser nativos, por ejemplo, *Listeria* spp., o incorporados al suelo a partir de desechos añadidos como fertilizantes orgánicos. Los patógenos dentro del suelo pueden contaminar los cultivos directamente por contacto o bien debido al riego, la lluvia o salpicaduras de agua hacia a las hojas (Pérez-Montano *et al.* 2012).

El suelo es uno de los reservorios principales de bacterias patógenas, así como de compuestos antimicrobianos y genes asociados a resistencia y virulencia. Así mismo, se han reportado que patógenos como *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *S. entérica* que pueden sobrevivir en esta matriz durante 3, 8 y 23 semanas, respectivamente (FAO 2011) dependiendo de las condiciones ambientales que se presenten, así como las prácticas de higiene y saneamiento que se practiquen en el área de trabajo (Wang *et al.* 2014).

### **2.3.4 Contaminación por contacto de los trabajadores.**

La mala higiene personal de los trabajadores de servicios de producción de alimentos es un factor importante a considerar, especialmente el lavarse correctamente las manos, ya que puede contribuir significativamente al riesgo de transmisión de enfermedades utilizando los alimentos (Pérez Garza *et al.* 2018).

## **2.4 Microorganismos contaminantes en el agroecosistema del melón**

La microbiota en definición es el grupo de microorganismos viviendo en un entorno específico, los cuales pueden ser hongos, bacterias, virus y protistas (Peterson *et al.* 2009; Geisen 2016). Estos microorganismos tienen un papel importante en la producción, regulación y ciclo de nutrientes en sus diversos ambientes o nichos (Li *et al.* 2016), resaltando la interacciones simbióticas o patógenas con hospederos vegetales (Bulgarelli *et al.* 2016) o animales (Kostic *et al.* 2013) así como procesos de fermentativos en alimentos (Sánchez *et al.* 2018).

Los patógenos son agentes infecciosos que pueden provocar enfermedades a su huésped. Este término se emplea normalmente para describir microorganismos como los virus,

bacterias y hongos, entre otros. Estos agentes pueden perturbar la fisiología normal de plantas, animales y humano; estos pueden contaminar los productos frescos en cualquier punto del agroecosistema hasta que llega al consumidor, se ha observado que en el campo esto puede ocurrir a diferentes niveles; los desechos fecales de los animales salvajes y de granja, el agua que se utiliza en la ganadería, la utilización de abonos mal compostados, el aire (polvo), insectos, y agua utilizada de riego o residual (Buchholz *et al.*, 2012). Se considera también que, en post cosecha, los microorganismos patógenos pueden tener contacto con productos agrícolas a través de los trabajadores del campo, al utilizar equipo para la cosecha, los manipuladores del producto fresco y el agua utilizada para procesos de enfriamiento y lavado, así como la utilización de cajas sucias, bolsas de almacenamiento y los vehículos utilizados para toda la cadena de transporte (Pérez-Garza *et al.* 2017).

Después de reportada la asociación de ETAs con productos frescos, los melones han sido ligados a los brotes de infecciones por *Salmonella* Spp. en los Estados Unidos y Canadá. La FDA realizó estudios epidemiológicos de melones importados, para determinar que 8 de 1,003 (0.8%) muestras fueron positivas para *Salmonella*, lo cual representó la segunda materia prima más frecuentemente contaminada por este microorganismo patógeno.

La estructura en forma de malla o red y su textura rugosa, son de los principales factores asociados a la persistencia y crecimiento bacteriano en la superficie de este fruto (Ukuku *et al.* 2015). Adicionalmente, la presencia de estructuras de superficie celular en la bacteria como flagelos, fimbrias y la producción de exopolisacárido, aumentan su adhesión (Ukuku *et al.* 2016).

Entre los principales microorganismos patógenos que podemos encontrar en el cultivo de melón y su cadena de producción, tenemos los siguientes:

#### **2.4.1 *E. coli* patógena.**

*E. coli* es un género bacteriano presente naturalmente en el intestino de humanos y animales. La mayoría de las cepas de *E. coli* no son dañinas para la salud humana, pero algunas cepas patógenas entéricas de *E. coli* pueden causar diarrea aguda. Estas cepas patógenas de *E. coli* se clasifican según la diferencia de sus factores de virulencia en diferentes clases, incluyendo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica

(ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* enterohemorrágica EHEC, también conocido como *E. coli* productora de toxinas Shiga (STEC), la cual es la más asociada con los brotes importantes transmitidos por los alimentos en los Estados Unidos (Corzo *et al.* 2019). *E. coli* O157:H7 es una cepa bien conocida de EHEC, con más de trescientos brotes reportados en Estados Unidos en 2003 - 2012 (Heiman *et al.* 2015). La infección de *E. coli* O157:H7 puede conducir a síntomas que van desde diarrea leve a muy sangrienta, hacia alguna infección que puede conducir a síndrome urémico hemolítico, o incluso la muerte (Fakhouri *et al.* 2017).

#### **2.4.2 *Salmonella* spp.**

*Salmonella* spp., incluyendo *S. enterica* y *S. bongori*, son bacilos motiles, Gram-negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Las infecciones de *Salmonella* ocurren con mayor frecuencia entre las personas que viven en países en desarrollo o después de viajar a ellos, debido al saneamiento deficiente o después de la ingestión de alimentos y agua contaminados con materia fecal (Pérez-Montano *et al.* 2012). Las infecciones por *Salmonella* generalmente causan fiebre tifoidea, también llamada fiebre entérica, además de gastroenteritis (diarrea, náuseas y vómitos). La infección por *Salmonella* fue la más frecuente en los Estados Unidos, con 17,6 enfermedades por cada 100.000 personas en 2010 (CDC 2010).

*Salmonella* spp. es el agente etiológico más comúnmente identificado asociado con los productos frescos relacionados con infecciones.

#### **2.4.3 *Enterococcus* spp.**

Estos microorganismos son cocos Gram-positivos no productores de catalasa, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, con crecimiento en un amplio rango de temperaturas (10-45°C) y de pH (4.6-9.9) así como en presencia de cloruro de sodio y sales biliares, lo cual le confiere la capacidad de sobrevivir en ambientes marinos por su capacidad de tolerar las altas concentraciones de sal (Alipour *et al.* 2014).

A pesar de formar parte del microbiota de humanos y animales, pueden dar lugar a enfermedades graves sobre todo nosocomiales, para lo cual, la especie *E. faecalis* (Ordaz *et al.* 2019) es la asociada, ya que su incidencia es de 1-2 episodios por cada 1000 pacientes hospitalizados (Fernández *et al.* 2004).

#### **2.4.4 *Listeria monocytogenes.***

*Listeria monocytogenes*, es una bacteria considerada como patógeno facultativo intracelular por su habilidad de internalizarse y replicarse dentro de células no fagocíticas, las cuales permiten su paso a través del epitelio intestinal, circulación sanguínea y placenta, en mujeres embarazadas (Carvalho *et al.* 2014). Se conoce como el agente causal de la listeriosis en humanos, encontrándose ampliamente distribuida en el ambiente, como en suelo, vegetación, aguas residuales, fertilizantes y animales, en donde puede llegar a sobrevivir por varios días o años (Hadjilouka *et al.* 2015). *Listeria monocytogenes*, es considerado uno de los principales patógenos causantes de enfermedades severas en el humano, asociándose a la acción de la toxina listeriolisina O (Maury *et al.* 2017), estas bacterias patógenas han causado gran preocupación en la producción de hortalizas como melones, ya que además de asociarse a la superficie de este fruto, se relaciona con el equipo y maquinaria utilizada durante su empaquetamiento (Webb *et al.* 2015; Dolan *et al.* 2018).

### **2.5 La resistencia a compuestos antimicrobianos o RAM.**

Los antibióticos son un tipo de medicamentos antimicrobianos utilizados en el tratamiento y la prevención de infecciones bacterianas mediante la eliminación o inhibición del crecimiento de bacterias. Los antibióticos se utilizan ampliamente para fines médicos en humanos y animales y también se utilizan como aditivo alimentario para promover el crecimiento del ganado (Butaye, 2003). En la actualidad, hay numerosos y diferentes tipos de antibióticos que se han encontrado o sintetizado, que por lo general se clasifican en función de sus mecanismos de acción, estructura química, o espectro de actividad (Pérez-Garza *et al.* 2021). Sobre la base de la clasificación con mecanismo de acción, los antibióticos más comunes son: Beta-lactámicos, sulfonamidas, monobactamicos,

carbapenemas, aminoglucósidos, glucopéptidos, lincomicina, macrólidos, polipéptidos, rifamicina, tetraciclinas, cloramianicol, quinolonas y fluoroquinolonas (Gothwal, 2015). La resistencia a los antibióticos es la capacidad de un microbio para resistir los efectos del antibiótico utilizado en la cura de infecciones bacterianas. La resistencia a los antibióticos conduce a mayores costos médicos, estancias prolongadas en el hospital y aumento de la mortalidad (Arias, 2009). La aparición y la rápida propagación de bacterias resistentes a los antibióticos ha dado lugar a una creciente preocupación por los posibles riesgos para el medio ambiente y la salud pública. Según un informe del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), cada año en los Estados Unidos, al menos 2 millones de personas se infectan con bacterias resistentes a los antibióticos y al menos 23.000 personas fallecen como resultado directo de estas infecciones (CDC, 2019).

### **2.5.1 Mecanismos de adquisición de la RAM**

De acuerdo con sus diferentes mecanismos funcionales, los genes de resistencia a antibióticos (GRAs) pueden clasificarse en cuatro tipos: mutación del receptor celular, modificación del antibiótico, impermeabilidad de la bacteria y expulsión del antibiótico (Wright, 2011). La resistencia a los antibióticos puede ser inherente (característica de todos los aislados de esa especie) o adquirida. La resistencia adquirida se produce cuando las bacterias naturalmente susceptibles ganan los genes que codifican un mecanismo de resistencia a través de mutación o transferencia horizontal de genes (THG) de otras bacterias, de la misma o de una especie diferente.

Existen tres vías principales de la THG, incluyendo la transformación, la transducción y la conjugación (Pérez-Garza *et al.* 2021). Varios elementos genéticos móviles (EGMs), incluidos plásmidos, transposones e inserciones vía bacteriófagos pueden conferir también la resistencia a los antimicrobianos (RA). La transformación es la captura de ADN extracelular del medio, que puede integrarse en el genoma y expresarse. La transducción es la transferencia de material genético de una bacteria a otra mediante un virus que infecta bacterias (bacteriófago). Este virus puede integrarse en el genoma bacteriano y al

transferirse a otra célula puede llevar parte del genoma de esta bacteria y así transferir genes, entre ellos genes de resistencia antimicrobiana (Sun *et al.* 2019).

La conjugación es el proceso mediado por plásmidos, elementos conjugativos, que tienen la propiedad de transferirse de una célula a otra gracias a un contacto cercano entre ambas células mediante un poro de conjugación o pili sexual. Los plásmidos son elementos genéticos móviles, de forma circular, poseen replicación propia, es decir, independiente de la duplicación bacteriana. Dentro de su información poseen cassetes génicos que codifican para resistencia bacteriana (Frazao *et al.* 2019).

La resistencia a antimicrobianos se está convirtiendo en una crisis sanitaria mundial, amenazando la eficacia de los antibióticos para tratar infecciones importantes y potencialmente mortales. Al menos 700.000 personas mueren anualmente a causa de infecciones farmacorresistentes (CDC, 2019). El desafío empeorará si no actuamos inmediatamente para cambiar el rumbo contra la propagación epidémica de microorganismos resistentes a antibióticos. Por lo tanto, la mitigación de la resistencia es un desafío crítico para la seguridad de la salud de este siglo, ya que sólo se han logrado progresos limitados (WHO, 2011). De hecho, los estudios para determinar la resistencia a los antibióticos por parte de microorganismos se han ampliado sustancialmente más allá de los entornos médicos para incluir estudios en cuestiones ambientales pertinentes (Heiman *et al.* 2015), y de producción de alimentos.

### **2.5.2 El resistoma en la producción de alimentos.**

La cadena de producción de alimentos es considerada como una ruta de dispersión de bacterias resistentes y de genes de resistencia antibióticos, lo cual permite que bacterias adaptadas al ambiente adquieran fácilmente y compartan diversos genes de resistencia mediante su transferencia horizontal (Bengtsson-Palme 2018). En cuanto a las frutas y vegetales que se han encontrado implicados en la diseminación de bacterias resistentes y genes de resistencia, estas presentan características de cultivo asociadas al uso de fertilizantes basados en estiércol de animales tratados con antibióticos principalmente (Tien *et al.* 2017; Bengtsson-Palme, 2018).

Hablando del microbioma y resistoma propio del melón, puede ser modificado durante la cadena de producción gracias a múltiples factores que tienen que ver con su localización y distribución, ya que se encuentra en contacto con sistemas de riego, agricultores, animales y maquinaria; sin embargo, durante el proceso de recolección se realiza la limpieza superficial del melón, removiendo partículas de tierra, siendo también un proceso crítico para su contaminación; ya que cuando este proceso se realiza por lavado con agua fría se permite que patógenos como *Salmonella* y enterobacterias puedan alojarse dentro de la cáscara y las cicatrices del tallo del melón (Corzo *et al.* 2019). El uso de las técnicas de última generación de secuenciación implementadas en aspectos de inocuidad alimentaria ha permitido identificar a los microorganismos nativos y poder detectar contaminación con patógenos durante el proceso cultivo y su cadena de producción (Corzo *et al.* 2019), por lo que su implementación es necesaria para tener un mejor control en la inocuidad en el melón y otros productos que se consumen principalmente frescos.

## **2.6 Tecnologías basadas en la secuenciación genética de siguiente generación.**

El término secuenciación de siguiente generación (NGS) representa una clase de secuenciadores de mayor rendimiento desarrollados después de la secuenciación de Sanger (Frey y Bishop 2015). NGS (Next generation sequencing) por sus siglas en inglés, es un área con un enfoque emergente y prometedor para la detección de alto rendimiento de patógenos y genes de resistencia a antibióticos. El desarrollo avanzado de la secuenciación de siguiente generación (NGS) permite el acceso a cantidades paralelas y masivas de datos de secuenciación en una sola ejecución, y se ofrece como una herramienta rentable para la secuenciación del ADN en muestras complejas como son las de un agroecosistema (Shokralla *et al.* 2012). El dispositivo de secuenciación de última generación Oxford Nanopore Technologies, permite la obtención de lecturas de secuencias de ADN largas, lo cual da una ventaja en el ensamblaje y análisis bioinformático de una muestra metagenómica; proporcionando información robusta sobre la composición genética de una muestra específica (Batovska *et al.* 2017).

### 2.6.1 La Secuenciación metagenómica como herramienta de análisis.

La metagenómica es el estudio de material genético recuperado directamente de muestras ambientales, basado en la secuenciación y anotación del ADN. A diferencia de la secuenciación basada en amplicones a través de la utilización de PCR y primers o cebadores, la secuenciación metagenómica está libre de cebadores específicos y no se limita a un gen elegido a priori, sino que busca la información genética a través de la secuenciación del ADN de la comunidad total (Xu *et al* 2020). Estas características de la secuenciación metagenómica permiten analizar grupos de genes específicos, por ejemplo, el resistoma (genes que proveen resistencia a antibióticos) en las muestras. La detección de genes de resistencia a antibióticos mediante secuenciación metagenómica se basa en la anotación y búsqueda de similitudes de la información genética obtenida, y contrastada en una base de datos de GRAs bien construida (Bengtsson-Palme, 2017). En los últimos años, se ha empleado la secuenciación metagenómica para estudiar el perfil de GRAs en diversas muestras de ambientes, incluyendo aguas residuales, lodos activados, suelo agrícola y demás (Nesme *et al.*, 2014; Chen *et al.* 2016). En comparación con otros métodos, la secuenciación metagenómica ilustra un rendimiento mucho mayor en una investigación, ya que cientos de GRAs se pueden detectar en un experimento. Algunos estudios también detectaron 71 especies (Li *et al.* 2015) y 32 especies (Lu *et al.* 2015) de patógenos bacterianos en plantas de tratamiento de aguas residuales a través de secuenciación metagenómica.

La metagenómica ha sido empleada en la detección de patógenos alimentarios utilizándose como herramienta analítica. En un estudio, se usó la inoculación de espinacas con *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) siguiendo un protocolo de cultivo establecido por la FDA junto con la secuenciación metagenómica "shotgun" para determinar los límites de detección, niveles de sensibilidad y especificidad y obtener información sobre la microbiología del protocolo. Se demostró que un nivel esperado de contaminación (10 UFC / 100 g) se pudo detectar adecuadamente (incluidos los factores clave de virulencia y la especificidad a nivel de cepa) dentro de las 8 h posteriores al enriquecimiento a una profundidad de secuenciación de 10,000,000 lecturas. Además, el enfoque metagenómico fue informativo con respecto a la dinámica de comunidades microbianas durante el proceso

de enriquecimiento, incluidos los datos iniciales de las cargas microbianas asociadas con espinacas; los microbios encontrados incluyeron géneros clave como *Pseudomonas*, *Pantoea* y *Exiguobacterium* (Susan *et al.* 2015). La metagenómica se adapta para su uso en el control de calidad e inocuidad alimentaria, y se presenta como una herramienta útil y de mayor cobertura en la resolución de este tipo de prácticas (Alkema *et al.* 2016).

### **2.6.2 Oxford Nanopore Technologies (ONT) para secuenciación metagenómica de lecturas largas.**

El MinION de ONT utiliza nanoporos para secuenciar ácidos nucleicos. No utiliza ni amplificación ni reacciones químicas. Como tal, la secuenciación por nanoporos ofrece secuencias de lectura largas e imparciales (Watson *et al.*, 2021). Los nanoporos tienen muchas aplicaciones importantes para el ensamblaje *de novo* y la identificación de la variación estructural en muestras agroambientales (Wang *et al.*, 2021). La actual secuenciación de nueva generación utiliza lecturas cortas para construir genomas. La interpretación descendente de las secuencias de lecturas cortas genera desajustes, errores de alineación y hace que los elementos altamente repetitivos sean difíciles de procesar (Li *et al.*, 2021). Las lecturas largas dan lugar a ensamblajes contiguos de alta calidad que mejoran el mapeo de las secuencias repetitivas, los elementos transponibles, los genes de alta copia, las duplicaciones y las repeticiones centroméricas/teloméricas, que son particularmente difíciles de resolver con lecturas cortas (Wang *et al.*, 2021). La mejora de la contigüidad del genoma permite el estudio detallado del contenido y las funciones biológicas. Además, genomas contiguos contendrán a menudo secuencias de flanco para estudiar a profundidad la expresión y la regulación de genes implicados en eventos de THG (Latorre-Perez *et al.*, 2020).

La secuenciación del ADN y la bioinformática han dado acceso a la exploración de las comunidades bacterianas presentes en todo tipo de muestra y como es que ellas pueden interactuar con el ambiente en diferentes regiones del mundo con condiciones extremas como altas temperaturas, pH extremos, y con alta concentración de sales, permitiendo el descubrimiento de múltiples microorganismos (Mirete *et al.* 2016). El uso del MinION es relativamente sencillo, en la preparación de librerías de ácidos nucleicos, se añade una

enzima guía y un adaptador de horquilla a los ácidos nucleicos extraídos. La enzima guía, añadida al extremo 5', facilita la alimentación unidireccional a través del nanoporo y controla el flujo de nucleótidos (Chen *et al.*, 2021). El adaptador opcional en forma de horquilla asegura la lectura de ambas cadenas al unir las. Ambos adaptadores reúnen las lecturas cerca de la superficie de la membrana, mejorando la tasa de captura en varios miles de veces (Jain *et al.*, 2015). Los ácidos nucleicos que fluyen a través de los nanoporos tienen una precisión de un solo nucleótido (Jain *et al.*, 2015). Al hacerlo, la interrupción de la corriente iónica varía de una base a otra. Es esta interrupción la que se mide. Las bases se pueden llamar desde el software ONT MinKNOW con herramientas Guppy incorporadas (Software ONT).

El MinION ya se ha utilizado para la secuenciación del genoma completo de múltiples hongos, bacterias y virus (Ashton *et al.*, 2015; Judge, *et al.*, 2016; Karamitros *et al.*, 2016), así como para identificar especies (Greninger *et al.*, 2015; Faria, *et al.*, 2017; Lee y Pai, 2017) y caracterizar genes RAM tanto en muestras metagenómicas como en aislados (Ashton *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2016; Schmidt, *et al.*, 2017). Se puede utilizar el MinION en diferentes entornos o agroecosistemas. Al sortear los problemas asociados al ensamblaje de lecturas cortas, la secuenciación de lecturas largas ofrece una solución convincente para el ideal de reconstruir genomas completos a partir de metagenomas (Driscoll *et al.* 2017; White *et al.* 2016). La secuenciación por nanoporos (Wang, Yang y Wang 2014), en particular, ha ganado popularidad entre los investigadores, ya que esta estrategia no plantea ningún límite teórico en cuanto a la longitud de las lecturas, ofrece nuevas oportunidades analíticas con secuencias ultralargas (Rand *et al.* 2017; Simpson *et al.* 2017), y es accesible a través de dispositivos de secuenciación asequibles y fáciles de manejar, como minION de Oxford Nanopore Technologies ("The Long View o Sequencing" 2018).

### **2.6.3 Importancia de la extracción de ADN de alto peso molecular para secuenciación de lecturas largas.**

La secuenciación por nanoporos se distingue de otras plataformas de secuenciación en que los nucleótidos se leen directamente sin proceso de síntesis de ADN.

Dirigido por un motor enzimático, un ADN/ARN se desenrolla y pasa por un poro proteico de tamaño nanométrico (nanoporo) a una velocidad determinada en una membrana eléctricamente resistente (Florian *et al.*, 2020).

Debido a las diferentes propiedades químicas de los distintos nucleótidos, se generará una fluctuación en la corriente cuando un solo nucleótido pase por el nanoporo, que puede ser capturado y transferido a la secuencia de bases. La tecnología Nanopore requiere segmentos largos de ADN para la generación de las librerías. Al atravesar los poros, en la secuenciación, se cotejan segmentos de ADN de alto peso molecular, que conlleva a un mejor aprovechamiento del poro, para así generar segmentos largos de secuenciación (long term readings). Los segmentos largos de secuenciación, es la característica que le confiere ventajas a la tecnología ONT, al momento del ensamblaje y análisis de secuencias con diversos softwares bioinformáticos (Djurhuus *et al.* 2018).

La secuenciación metagenómica ofrece una visión sin precedentes de la diversidad y el acervo genético de los microbios y virus naturales que ocupan los suelos (Nesme *et al.* 2016), los hábitats marinos (Sunagawa *et al.* 2015; Gregory, Zayed, *et al.* 2019) y agroecosistemas (Zablocki, *et al.* 2019). La gran precisión y el alto rendimiento de las plataformas de secuenciación modernas se ven desfavorecidos por las longitudes de las lecturas que suelen ser inferiores a 250 bases. Estas lecturas relativamente cortas suponen importantes limitaciones en la utilidad de los datos, especialmente en metagenómica (Wommack, Bhavsar y Ravel 2008). La tecnología ONT de secuenciación, necesita una extracción de alto peso molecular, para capturar información sobre la sintenia genética dentro de una muestra compleja; la eficacia de la secuenciación de lectura larga depende en gran medida de la integridad estructural del ADN de entrada (Schalamun *et al.* 2019), lo que plantea un nuevo e importante desafío. Los kits comerciales de extracción de ADN que surgieron durante la era de la secuenciación de lectura corta suelen incluir pasos que alteran físicamente las células mediante lisis mecánica y generan moléculas de ADN muy fragmentadas. Aunque estos kits comerciales mejoran los resultados de la secuenciación de lectura corta, ya que garantizan el máximo rendimiento y cobertura del ADN en una muestra, establecen un límite crítico para los resultados de la secuenciación de lectura larga; por lo tanto, establecer estrategias de extracción de ADN que permitan preservar las moléculas de alto peso molecular (HMW), un alto grado de pureza de la muestra, y un

mayor rendimiento general del ADN se ha convertido en una consideración crítica para el éxito de las aplicaciones de secuenciación de lectura larga (Xu *et al.*, 2020).

Las extracciones de ADN con fenol-cloroformo, que se popularizaron por primera vez en 1989, han resurgido como método de referencia para la extracción de ADN HMW (Maghini *et al.* 2020). Aunque estudios recientes han utilizado este método para recuperar fragmentos de ADN ultra largos (por ejemplo, >100 kbp) de organismos cultivados (Kinoshita *et al.* 2020; Cicha *et al.* 2020; Hosoe *et al.* 2020; Takeshita, Jang y Kikuchi 2020; Tippelt *et al.* 2020).

## **2.7 Bioinformática para el análisis de la secuenciación genética.**

La secuenciación metagenómica ha permitido analizar genomas microbianos hasta ahora inexplorados. Mientras que las plataformas de secuenciación de lectura corta suelen dar lugar a metagenomas muy fragmentados, los secuenciadores basados en nanoporos podrían dar lugar a ensamblajes más contiguos debido a su potencial para generar lecturas largas (Wang *et al.* 2021) Sin embargo, faltan estudios actualizados y sistemáticos que evalúen el rendimiento de diferentes herramientas de ensamblaje en datos de nanoporos. En este trabajo se realizaron pruebas con diferentes ensambladores para reconstruir comunidades microbianas que han sido secuenciadas en artículos reportados utilizando la plataforma de Oxford Nanopore Technologies con la finalidad de evaluar dichas herramientas. Entre las utilizadas, tenemos a metaFlye, Raven y Canu. Estas herramientas permiten ensamblar genomas altamente contiguos (o incluso genomas completos) directamente de los datos metagenómicos (Adriel *et al.*, 2020). A pesar del elevado error intrínseco de la secuenciación por nanoporos, los ensamblajes finales pueden alcanzar una elevada precisión (entre el 99,5 y el 99,8% de la precisión de consenso).

Las estrategias de pulido demostraron ser necesarias para reducir el número de inserciones y deleciones de bases nitrogenadas, y esto tuvo un impacto en la predicción de los grupos de genes biosintéticos. La corrección con lecturas cortas de alta calidad no siempre da lugar a borradores de ensamblaje de mayor calidad. En general, los datos de secuenciación metagenómica de nanoporos -adaptados al rendimiento actual de MinION- demostraron ser suficientes para ensamblar y caracterizar comunidades microbianas de baja

complejidad. El desafío de lograr una identificación sensible y específica de genes que influyen en la resistencia a los antibióticos en un complejo fondo metagenómico, es paralelo a las dificultades encontradas por los científicos que estudian enfermedades de herencia humana hace años (Martínez *et al.* 2015). El uso de estrategias de secuenciación basadas o dirigidas en las regiones que codifican para proteínas (exones), reducen el número de secuencias que se deben examinar y, por lo tanto, representan una alternativa rentable, eficaz en el tiempo y de alto rendimiento a las tecnologías metagenómicas para analizar los exones (Olson 2007; Tennessen 2012). La tecnología ONT aplicada en microbiología bacteriana ofrece un enorme potencial para impulsar los avances en estudios ambientales y ecológicos que requieren el aislamiento de secuencias de interés de una mezcla de ADN en una compleja comunidad de microorganismos (Jones y Good, 2016), dando como resultado la generación de análisis bioinformáticos específicos que pueden detectar amplicones importantes, como son los GRAs, ayudándonos a obtener información relacionada con el riesgo probable de diseminación de estos genes entre microorganismos patógenos y no patógenos en un agroecosistema (Adriel *et al.* 2020).

### **2.7.1 Debian como sistema operativo.**

El proyecto Debian es una sociedad abierta de entusiastas de todo el mundo que colaboran en el mantenimiento de un sistema operativo basado en los núcleos de Linux y FreeBSD de Linux y FreeBSD. Los programas se distribuyen como paquetes binarios listos para su uso, contruidos en la red de máquinas de autoconstrucción de Debian, a partir de un código fuente que es anotado y subido como paquetes por individuos (Douglas *et al.*, 2005). Debian es compatible con las plataformas más importantes de hoy en día, lo que hace que disponibles desde los móviles hasta los superordenadores y para todos los procesadores comunes (Tiwari *et al.*, 2005). Los paquetes invitan a recibir comentarios de usuarios con el sistema de seguimiento de errores. En cuanto al enfoque del software para medicina y bioinformática Debian Med ofrece 83 paquetes para bioinformática de acuerdo con las exigencias de las Directrices de Software Libre de Debian sobre software libre, otros 13 no cumplen este criterio. Otros 18 paquetes son co-mantenidos y pueden ser contruidos localmente, pero nunca han sido solicitados como parte integral de la distribución (Holland *et al.*, 2008). Estos paquetes preliminares se ponen a disposición de la comunidad para

ayudarla a trabajar con programas con una licencia que no permite la redistribución de su código fuente, o para los que el empaquetado aún no está terminado (Goble *et al*, 2010). Aunque la atención se centra en los paquetes de bioinformática, empaquetar un software concreto a menudo significa empaquetar primero muchas más bibliotecas generales que se necesitan como dependencia de construcción o de ejecución. Estos paquetes adicionales no aparecen en la lista de Debian Med, pero se convertirán en uno de los otros 60.000 paquetes regulares de Debian. El desarrollo y la adopción de estaciones de trabajo informáticas configuradas por expertos y cargadas con software libre y de código abierto pueden ayudar a superar estos retos (Hengyun *et al* 2016). Estos sistemas ofrecen soluciones listas para aquellos que no saben cómo obtener el software adecuado ni los conocimientos necesarios para aprovecharlo al máximo; esto es especialmente relevante en entornos en los que los grupos de tecnología de la información están orientados a apoyar sistemas científicos genéricos, en lugar de especializados (Li H; 2018). Estos sistemas también anuncian nuevas formas de facilitar las actividades de investigación y gestión de datos que tienen lugar en sitios distribuidos geográficamente, un fenómeno cada vez más común en las ciencias de la vida.

### 3 JUSTIFICACIÓN

Dado que la inocuidad alimentaria es un asunto de primera importancia para la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos en el mundo, sobre todo en países en desarrollo donde la cantidad de brotes de infecciones entéricas representa un desequilibrio económico en el sistema de salud y en la fuerza laboral; es importante desarrollar nuevos protocolos y herramientas de análisis de contaminación en primera instancia, en cadenas de producción agrícola y de alimentos. Los microorganismos patógenos, han desarrollado a través del tiempo y de la exposición a agentes antimicrobianos una resistencia, que, en consecuencia, de mecanismos de adquisición de material genético en su ambiente, les ha permitido establecerse y desarrollar brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, difíciles de tratar y de gran riesgo para las poblaciones humanas.

Existen bacterias asociadas al ambiente agrícola de frutas y vegetales que son principales reservorios de genes de resistencia a antibióticos y responsables de su diseminación. En particular, en el agroecosistema de melón, gracias a la estructura de su cubierta externa en forma de red, permite la adhesión de microorganismos como *E. coli*, *Salmonella entérica* y *L. monocytogenes* principalmente; siendo a su vez causantes de los diversos brotes asociados al consumo de este importante cultivo de exportación para el país; sin embargo, la detección de estos microorganismos representa un reto para los métodos dependientes de cultivo microbiano. Por otro lado, los avances en las tecnologías de secuenciación permiten que los estudios para determinar poblaciones microbianas sean económicos y rápidos, con mayor capacidad de detección genética presente en una muestra compleja, y así poder identificar proporciones poblacionales bacterianas y genes de resistencia a antibióticos. De acuerdo con lo anterior el presente trabajo se centra en la implementación de estudios metagenómicos en sistemas y laboratorios de inocuidad alimentaria, permitiendo a los investigadores disponer de una entrada de información más robusta y clara en el campo de su desarrollo, así como evaluar el uso de herramientas bioinformáticas y estadísticas para estudios del microbioma, el resistoma, y otras determinantes asociadas a la adquisición de resistencia a antimicrobianos dentro de un agroecosistema de melón.

## 4 HIPOTESIS

Dentro del agroecosistema del melón (*C. melo L.*), se localiza una microbiota diversa en la cual encontramos bacterias patógenas causantes de enfermedades gastrointestinales, y se puede implementar un sistema de programas bioinformáticos y capacitación para la operación del dispositivo de secuenciación Mini Ion de Oxford Nanopore Technologies para futuros análisis del resistoma y otras determinantes genéticas en el metagenoma.

## **5 OBJETIVO GENERAL**

Analizar la presencia de patógenos bacterianos y obtener ADN de alto peso molecular para el análisis del microbioma del agroecosistema del melón, e implementar el sistema de programas bioinformáticos y capacitación para la operación del dispositivo de secuenciación Mini Ion de Oxford Nanopore Technologies.

## **6 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Obtener muestras microbiológicas provenientes de diferentes fuentes dentro del agroecosistema del melón, como son suelo, producto, manos de los manipuladores y agua de irrigación.
- Determinar la presencia de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación en muestras provenientes de diferentes puntos del agroecosistema del melón.
- Extraer el ADN de alto peso molecular correspondiente al microbioma presente en el agroecosistema del melón y preparar las muestras de ADN, generar librerías genéticas para la secuenciación de prueba con Oxford Nanopore technologies.
- Implementar el uso de la tecnología de secuenciación de nanoporos incluyendo la instalación de los sistemas de software en equipos IT, así como la capacitación en el uso y análisis de datos por parte de la plataforma de Oxford Nanopore Technologies y herramientas bioinformáticas externas.

## **7 MATERIALES Y METODOS**

### **7.1 Área de trabajo.**

El proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### **7.2 Recolección de las muestras.**

El área de estudio abarcó dos huertas de melón en la región de Paila, Coahuila de Zaragoza, México. La recolección de las muestras se realizó, en base a diferentes puntos de la cadena de producción de melón; la primera el 30 de Julio entre 8 am y 2 pm, (25°37'50"N 101°49'59" O General Cepeda, Coah. 1200 metros de altitud), temperatura promedio 19°C; y la segunda el 12 de Octubre entre 8 am y 2 pm (25°37'36"N 101°49'47" O General Cepeda, Coah. 1200 metros de altitud) 18°C; cubriendo así dos visitas a cada huerta. Las muestras compuestas recolectadas se trasladaron a alrededor de 5°C dentro de hieleras, al Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, en donde se les realizaron los procedimientos necesarios para su análisis.

#### **7.2.1 Recolección de muestras: agroecosistema del melón**

Se colectaron en total 12 muestras compuestas de melón (3 melones por muestra); 6 muestras compuestas en la visita 1, 6 muestras compuestas en la visita 2. Cada muestra compuesta consistió en el lavado de tres melones, los cuales fueron proporcionados por los pizcadores, además se recolectaron muestras de las manos de los trabajadores, suelo en 3 diferentes puntos geográficos dentro de la huerta y 3 diferentes puntos de fuente de agua.

#### **7.2.2 Lavado de melones**

Las muestras de melón se obtuvieron mediante lavado, para lo cual, tres melones se colocaron uno a uno en bolsas estériles (Nasco Whirl-Pak de 184 oz, 5441 ml) con 500 ml de agua peptonada estéril al 0.15% (Heredia *et al.* 2016). La superficie de los melones fue tallada a través de la bolsa durante 30 segundos por agitación, 30 segundos de masaje y 30

segundos de agitación extra. Este método se repitió con cada uno de los tres melones colocándolos en la misma bolsa con guantes estériles para generar la muestra. Posterior al lavado, se retiraron los melones de la bolsa y el agua de enjuague de los tres melones quedara mezclada en un volumen final de 500 ml (muestra compuesta). Las muestras compuestas recolectadas se trasladaron dentro de hieleras, al Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, en donde fueron almacenadas a refrigeración de 4°C para la posterior realización de los procedimientos necesarios para su análisis.

### **7.2.3 Recolección de muestras de manos de los trabajadores.**

Se colectaron en total 20 muestras de enjuague de manos; 10 en la visita 1, 10 en la visita. Todas las muestras de enjuagues de manos de pizzadores se tomaron del personal que se encontraba trabajando dentro del área de muestreo. Cada muestra se tomó siguiendo el método establecido por Heredia *et al.* (2016) el cual consiste en introducir un mano en una bolsa Nasco Whirl-Pak de 92 oz (2721 ml) conteniendo 750 ml de agua peptonada estéril al 0.15%. Cada mano se agitó durante 30 segundos y se frotó por el personal del laboratorio desde el exterior de la bolsa durante 30 segundos extra. Este procedimiento fue realizado de la misma manera para cada mano.

### **7.2.4 Recolección de muestras de agua.**

Previo a la recolección de las muestras, las bombas y mangueras conectadas se desinfectaron con hipoclorito 200 ppm y se dejó correr agua durante 30 s. La recolección comprendió dos puntos diferentes de suministro; agua de irrigación y agua de fuente (o grifo). Se tomaron muestras para cada uno de los puntos de suministro, las cuales consistieron de medio galón (1890 ml) de recolección, en tres puntos de suministro diferentes, incluyendo el de agua de irrigación o cintilla. Posteriormente, estos recipientes individuales fueron homogenizados manualmente y se transportaron en hieleras para su cadena de frío, al Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, en donde se les realizaron los procedimientos necesarios para su análisis.

### 7.2.5 Recolección de muestras de suelo.

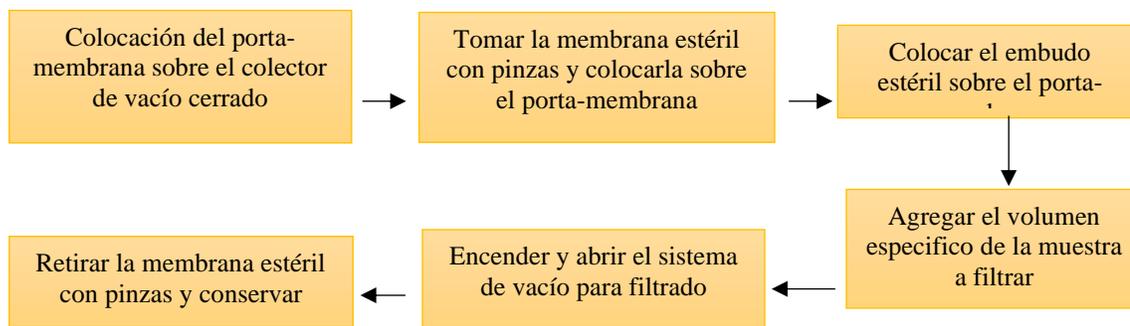
Una muestra de suelo consistió en aproximadamente 100 g de suelo, para lo cual se utilizó una cuchara estéril en un ángulo de 45° a una profundidad aproximada de 5 cm. La muestra fue transferida a una bolsa Nasco Whirl-Pak® (18 oz.); se repitió el procedimiento en tres diferentes puntos aleatorios de muestreo para cada uno de los campos, utilizando cucharas estériles y siguiendo un patrón circular dentro de 30 cm del tallo de las plantas a muestrear. Las bolsas con muestra se colocaron en una hielera conteniendo geles fríos para su posterior transporte a laboratorio.

**Tabla 1.** Muestras recolectadas por cada campo en diferentes puntos del agroecosistema del melón.

<b>Muestreo</b>	<b>Campo 1/ San José (# de muestras recolectadas)</b>	<b>Campo 2/ Sta. Paulina (# de muestras recolectadas)</b>
Lavado de melón	3 (compuesta 3 productos)	3 (compuesta 3 productos)
Manos de los trabajadores	5	5
Agua de fuente e irrigación	3	3
Suelo	1 (compuesta 3 puntos)	1 (compuesta 3 puntos)
<b>TOTAL</b>	<b>12</b>	<b>12</b>

### 7.3 Procesamiento de las muestras.

Todas las muestras compuestas recolectadas, fueron transportadas al Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL y procesadas preferentemente en las primeras 48 horas, para el aislamiento genómico y la búsqueda de bacterias patógenas e indicadores de contaminación (*coliformes*, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes*, y *Enterococcus spp.*) siguiendo el método de filtración por membrana (Heredia *et al.* 2016), para lo cual se utilizaron membranas (Millipore) estériles de 47 mm de diámetro y con un tamaño de poro de 0.45µm en base al siguiente diagrama:



**Fig. 1.** Diagrama representativo del procesamiento de las muestras por medio de filtración en membrana.

Una vez obtenidas las membranas, estas fueron conservadas en bolsas estériles Nasco Whirl-Pak de 100 ml a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización en análisis genéticos.

### **7.3.1 Análisis de las muestras, determinación de microorganismos indicadores de contaminación.**

Para el análisis se utilizó un sistema de filtración con vacío (Pall Corporation) y membranas de nitrocelulosa con poro de  $0.45\ \mu\text{m}$  (S-PAK, Millipore Corporation) como se mencionó previamente. Los análisis de las muestras consistieron en aquellas provenientes de diferentes puntos del agroecosistema del melón, en el caso de las muestras de suelo, se realizó una dilución 1:10 en agua peptonada al 0.1%

*Enterococcus spp.* Se realizó una filtración con volúmenes de cada muestra provenientes de suelo, lavado del producto, enjuague de manos de los trabajadores y agua de diferentes fuentes. Los volúmenes filtrados fueron  $100\ \mu\text{l}$  y  $1\ \text{ml}$ . Respecto a las muestras de agua los volúmenes de filtración fueron de:  $10\ \text{ml}$  y  $25\ \text{ml}$  para lograr una mayor concentración de microorganismos ya que según lo reportado en agua los niveles de estos microorganismos generalmente son bajos.

Una vez que se finalizó con la filtración del volumen, las membranas se retiraron del sistema de filtración utilizando pinzas estériles, para después ser colocadas sobre la superficie de un agar KF *Streptococcus* (BD) para su posterior incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 h. Una vez que pasó el tiempo de incubación se seleccionaron las colonias que son características de *Enterococcus* según el crecimiento en el mencionado agar y se tipificaron por ser de color café a marrón para su posterior cuantificación. Se tomó la decisión de duplicar cada uno de los ensayos.

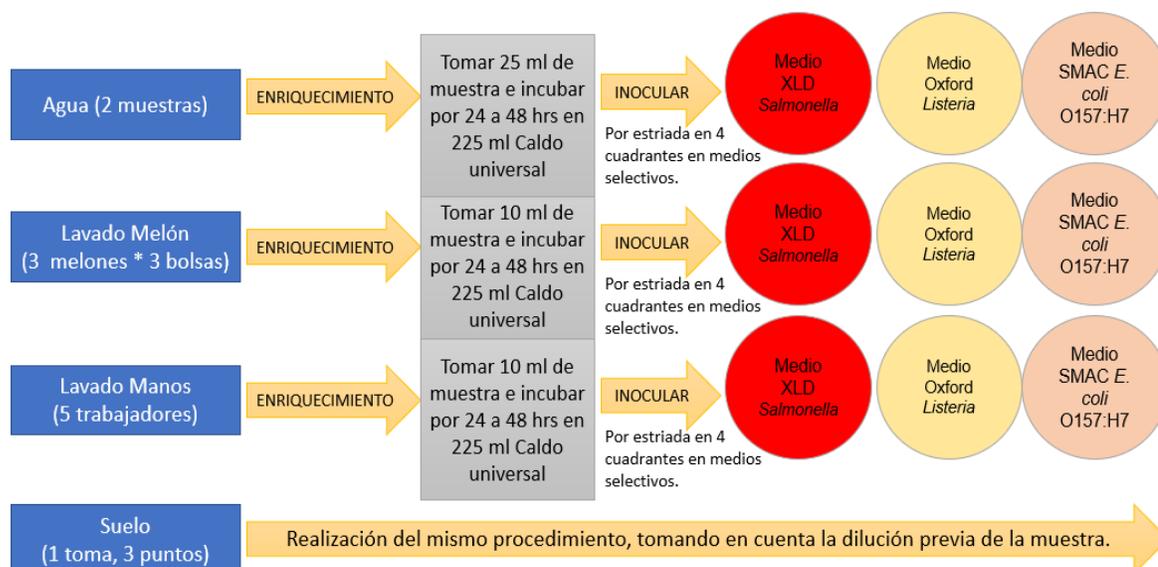
### *Escherichia coli* y *Coliformes fecales*.

Para el ensayo se filtraron volúmenes de cada muestra provenientes de suelo, lavado del producto, enjuague de manos de los trabajadores y agua de diferentes fuentes de 100 µl y 1 ml. De igual manera para el caso de muestras de agua los volúmenes filtrados fueron de 10 ml y 25 ml para poder obtener un mejor conteo de las unidades formadoras de colonias. El mismo procedimiento especificado en el punto anterior fue repetido con la diferencia de que la membrana fue colocada sobre una placa de Petri con agar Rapid *E. coli* 2 (BIO-RAD) y la incubación fue a 44.5°C por 24 h para la posterior cuantificación de las unidades formadoras de colonias. Esto fue caracterizado por el color morado correspondiente a *E. coli* debido al sustrato cromogénico que en contacto con la enzima β-D-Glucuronidasa presente en *E. coli*, produce la señalada tinción; esto nos permitió diferenciar de las colonias color azul a verdes la cuales corresponden a coliformes fecales.

*Identificación de UFC por extensión en superficie.* Así también para la cuantificación, fueron inoculados 100 µl por extensión en superficie en placas Petri de 13mm x 60 mm de diámetro, con sus respectivos agares selectivos anteriormente mencionados para la identificación tanto de *E. coli*, coliformes fecales y *Enterococcus* respectivamente, y correspondiendo a diluciones de la muestra de 10<sup>2</sup> y 10<sup>3</sup>; factor que fue considerado para el cálculo del conteo de UFC/ml.

*Determinación de microorganismos patógenos por medios de cultivo selectivos.* Para el enriquecimiento general de las muestras, fueron tomados 25 ml de cada una de las muestras, y fueron enriquecidos con 225 ml de caldo de enriquecimiento universal (DIFCO) contenidos en bolsa estéril Whirl pak de 390 ml, para su posterior y respectiva incubación a 37°C por 24 h para *Salmonella spp.*, *E. coli* O157:H7 y STEC y a 30°C por 48 h para *Listeria monocytogenes*. Para la determinación de los microorganismos patógenos se realizaron una serie de inoculaciones por estriada en 4 cuadrantes para poder obtener colonias presuntivas para los diferentes microorganismos aislados por su particular medio selectivo y las características morfológicas de las colonias presuntivas debido a su metabolismo y crecimiento. Para poder obtener las colonias de interés se realizó el procesamiento de las muestras en base al siguiente esquema, en el cual se aprecian los volúmenes tomados de las muestras y los medios utilizados.

## Procesamiento de las muestras Microorganismos Patógenos



**Fig. 2.** Procesamiento de las muestras para obtención de microorganismos patógenos de interés.

Después se realizó la preservación de microorganismos presuntivos, los cuales fueron conservados en glicerol, previamente enriqueciendo las colonias de referencia en 5 ml de caldo ICC para después incubar de 24 a 48 hrs respectivo a la cepa de interés y después utilizar 200 µl del cultivo enriquecido para agregarlos a un crio vial de 1.5 ml con 800 µl de glicerol estéril; teniendo un volumen total de 1 ml por cepa conservada, las cuales serán coleccionadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso o análisis genético.

### 7.3.2 Determinación de microorganismos patógenos presuntivos.

Para el análisis fueron utilizadas cepas de referencia como controles positivos, los cuales comprendieron a *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *L. monocytogenes* ATCC 19114.

Para la extracción de ADN por colonia para cada una de las cepas presuntivas, así como de las que se usaron como controles se tomó una asada y se inocularon en tubos con 5 ml de caldo ICC para su previo enriquecimiento, después fueron incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 a 48 h respectivamente al microorganismo presuntivo. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se tomó una alícuota de 0.5 ml y se homogenizó con 1 ml de amortiguador salino fosfatado (PBS, 0.05 M a pH 7,4). Se centrifugó a  $9000 \times g$  por 3 min en una

microcentrífuga (Eppendorf modelo 5415 C) y el precipitado se lavó dos veces más con PBS. Finalmente se lavó una vez con agua destilada. El precipitado fue resuspendido con 50 µl de agua destilada. Se diluyó 1:10 con Triton X-100 al 1% (SIGMA). Esta mezcla se sometió a ebullición por 5 minutos, e inmediatamente después se enfrió en baño de hielo. Finalmente se utilizaron 2 µl como templado para realizar la determinación por medio de la técnica de PCR punto final. Para la confirmación de cepas presuntivas para *Salmonella*, *E. coli* y *L. monocytogenes*, se siguió la metodología propuesta por Wang *et al.*, 1997 que consistió en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde se utilizaron oligonucleótidos para realizar la amplificación de diferentes genes cuyos oligonucleótidos, secuencias y el tamaño del fragmento amplificado son representados en la siguiente tabla.

**Tabla 2.** Genes constitutivos para la determinación del microbioma bacteriano asociado al ambiente agrícola de melón.

Gen constitutivo	Oligonucleótidos	Secuencia (5' - 3')	Referencia
16S ARNr universal	16S rRNA	CAGGCCTAACACATGCAAGTC GGGCGGWGTGTACAAGGC	Marchesi <i>et al.</i> 1998
<i>Escherichia coli</i>	16S rRNA	CCCCCTGGACGAAGACTGAC ACCGCTGGCAACAAAGGATA	Ferreira <i>et al.</i> 2015
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	TATCGCCACGTTCCGGGCAA TCGCACCGTCAAAGGAACC	Wang <i>et al.</i> 1997
<i>Listeria monocytogene</i>	<i>hylA</i>	GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG	Soni y Dubey 2014

Para las condiciones de la PCR para cada uno de los genes fueron determinadas de acuerdo con lo recomendado para cada uno de los oligonucleótidos a analizar, utilizando un termociclador Thermo Hybaid (Modelo HBPX110). Posterior a su amplificación, los genes se visualizaron mediante un gel de agarosa 1% con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (1X), utilizando un fotodocumentador de luz UV (Gel Logic 200 Imaging System, Kodak); no todas las muestras y cepas se analizaron ya que en este punto se enfocó el proyecto hacia obtener resultados con secuenciación metagenómica.

### 7.3.3 Extracción de ADN de alto peso molecular de las muestras filtradas.

Las plataformas de secuenciación ONT se han introducido recientemente en los estudios metagenómicos. Su excelente rendimiento en cuanto a longitud de lectura ha mejorado en gran medida el análisis metagenómico en términos de identificación de especies y análisis de genes funcionales. Para la determinación del protocolo de extracción se realizó una revisión de literatura científica de artículos relacionados para la obtención de ADN de alto peso molecular, con la finalidad de establecer una metodología válida y estandarizada para el aislamiento de las muestras correspondientes al microbioma del agroecosistema del melón. Los artículos más representativos se encuentran en la siguiente tabla:

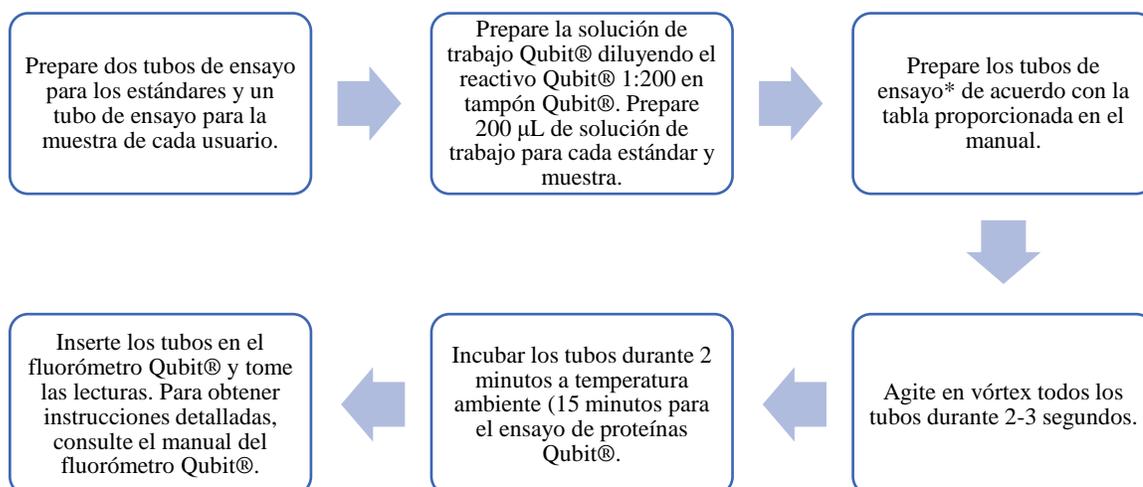
**Tabla 3.** Artículos más representativos de la revisión para determinación de protocolo de extracción de ADN de alto peso molecular utilizado en secuenciación metagenómica.

Título y autor	Método de extracción de ADN	Concentración ADN reportada
Nanopore-based metagenomics analysis reveals prevalence of mobile antibiotic and heavy metal resistome in wastewater (Martin <i>et al.</i> 2021)	100 filtrados utilizando membranas filtrantes MCE estériles de 0,22 micras (Mem-brane Solutions Corp) y un colector de vacío. Bibliotecas de ADN para la secuenciación multiplex para kit de secuenciación rápida SQK-RBK004 (ONT).	400-500 ng/μl Espectrofotómetro UV-vis NanoDrop 2000
Mobile antibiotic resistome in wastewater treatment plants revealed by Nanopore metagenomic sequencing (Che <i>et al.</i> , 2019)	FastDNA® SpinKit for Soil (MP Biomedicals, USA) Fragmentos de ADN mayores de 8 kb se extrajeron manualmente y se recuperaron utilizando el kit de extracción de ADN en gel Monarch® (NEB Inc., EE.UU.).	1000 ng/μl aprox. Espectrofotómetro UV-vis NanoDrop 2000
Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots	El ADN se extrajo utilizando el kit de aislamiento de ADN PowerWater (Laboratorios	1010 ng/μl aprox. Espectrofotómetro UV-vis NanoDrop

of antibiotic-and biocide-metal resistome and mobilome (Kumar, 2019)	MOBIO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.	2000, gel agarosa 1%
High molecular weight DNA extraction strategies for long-read sequencing of complex metagenomes (Florian, 2021)	Considera tamaño de las lecturas, rendimiento del ensamblaje y número de elementos circularizados encontrados en la secuenciación con Nanopore ONT.	770-1100 ng/μl aprox. UV-vis NanoDrop 2000

De las muestras compuestas de lavados de melones, lavado de manos de trabajadores, agua de fuente e irrigación, se realizaron una serie de filtrados a través de membranas (Millipore) estériles de 47 mm diámetro (0.45 μm poro) con la ayuda de un equipo de filtración al vacío. Después la membrana fue cortada a la mitad, una mitad se colocó dentro de un tubo de perlas (Qiagen) de 5 ml y se adicionaron 1 ml de buffer TLB (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0, and 100 mM NaCl, 0.5% (w/v) SDS, 20 μg/mL RNase A), para proceder a la implementación del protocolo para la extracción de ADN de alto peso molecular para estudios metagenómicos mediante secuenciación de nanoporos, método modificado basado en la extracción por fenol-cloroformo (Martin *et al.* 2021). Se evitó cualquier tipo de pipeteo sin utilizar una punta de pipeta ancha o cortada, vórtices, agitadores o cualquier otra cosa que genere un gradiente de velocidad que pueda ceder el ADN. Además, se tuvo mucho cuidado de no introducir nucleasas preparando los buffers con agua libre de nucleasas. Se evito calentar y no se congelo, el ADN aislado se almaceno a -20° C (Maghini *et al.* 2020). Para el método modificado basado en extracción por fenol-cloroformo: Se enrolló y colocó gentilmente el filtro dentro del tubo de perlas de 5 mL., Después se añadieron 1mL de buffer TLB (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0, y 100 mM NaCl, 0.5% (p/v) SDS, 20 μg/mL RNasa A; una vez cubiertas las perlas del tubo, se agitaron en vórtex a máxima velocidad durante 5 a 10 segundos; posteriormente se incubo la muestra a 37 °C durante una hora. Después se añadió proteinasa K (Qiagen) a una concentración final de 200 μg/ml y se mezcló la muestra por inversión lenta tres veces. Pasamos a incubación a 50 °C durante 2 horas, mezclando suavemente cada 30 minutos. Se transfirió la muestra a un tubo falcon de 50 ml donde se le añadieron 5 ml de fenol

saturado con TE 1 (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA) a cada tubo Falcon que contenía el lisado. Después se agregaron 2,5 ml de cloroformo-alcohol isoamílico-fenol en una proporción 25:24:1. El ADN fue precipitado añadiendo 4 ml de acetato de amonio 5 M y 30 ml de etanol 96% enfriado a 0 °C. Para finalizar, se realizó una centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos y se lavó dos veces en etanol al 70%. Para después sumergir el pellet visible de ADN en un tubo Falcon de 50 ml con etanol al 70%. Se realizó una centrifugación a 8.000 rpm, y se eliminó el etanol secándolo a temperatura ambiente durante 10 min. Al final, añadimos 100 µl de EB (buffer de elución, 10 mM Tris-HCL, pH 8,5) al ADN y lo dejamos a 4°C durante la noche para resuspender el pellet (Florian *et al*, 2020). Una vez extraído el ADN se tomaron alícuotas de 5 µl de cada muestra en un tubo Eppendorf de 200 µl y el ADN restante fue transferido a otros tubos similares. Las primeras alícuotas de 5 µl fueron utilizadas para medir espectrofotométricamente la concentración de los productos obtenidos (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific). Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% para determinar composición del ADN obtenido. Sin embargo, después de las mediciones se procedió a una comparación con el kit de extracción de ADN DNeasy Power Water kit (Qiagen) de acuerdo las especificaciones del fabricante. Para lo cual se obtuvieron resultados prometedores en cuanto a concentración y visualización del ADN obtenido por el Kit. Gracias a estos resultados, se pudo determinar que la mejor opción para la obtención del ADN provenientes de muestras de membranas filtradas es mediante la utilización del kit DNeasy Power Water (Qiagen) para obtener la mejor calidad y concentración de ADN posible para la secuenciación metagenómica respecto a los parámetros y el control de calidad (QC) de ONT. También se realizó cuantificación con Nanodrop 2000 y mediante un método fluorométrico por medio de Qubit™ dsDNA HS Assay Kit de Invitrogen en base al siguiente diagrama.

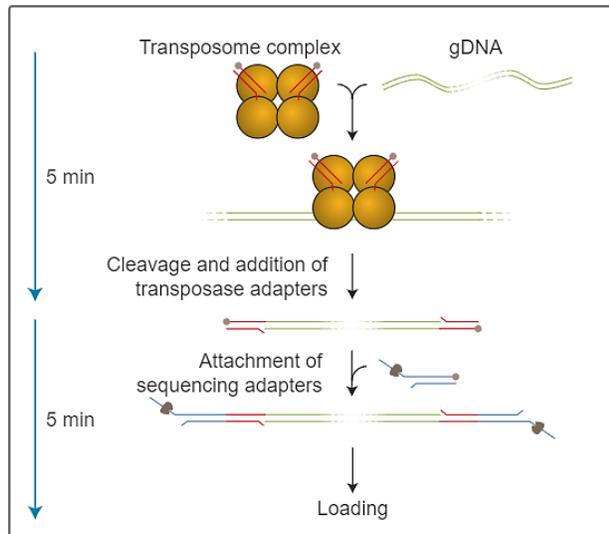


**Fig. 3.** Representación esquemática del protocolo para cuantificación de ADN por método fluorométrico utilizando Qubit™ dsDNA HS Assay Kit de Invitrogen.

Se obtuvieron muestras compuestas de ADN a partir de todas las extracciones, las cuales se mezclaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml obteniendo un total de 24 muestras de ADN provenientes de lavados de melones, lavado de manos de trabajadores, agua de fuente e irrigación, y suelo; esto para formar muestras compuestas que son representativas de los muestreos en cada huerta.

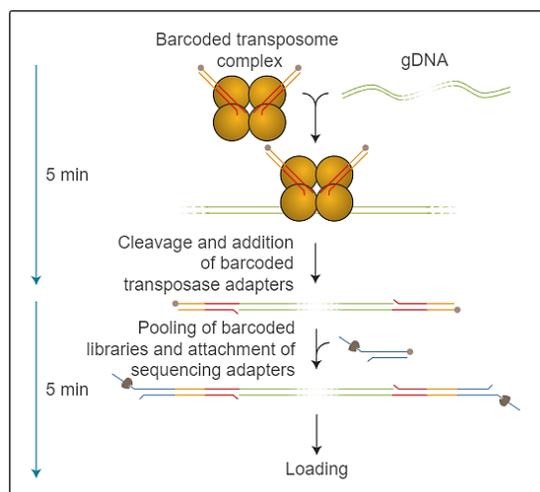
### 7.3.4 Preparación del ADN para la generación de librerías ONT.

Se prepararon bibliotecas para la secuenciación de prueba con el dispositivo Oxford Nanopore MinION (Oxford Nanopore Technologies). ADN de alto peso molecular estandarizado proveniente del fago lamda incluido en kit Rapid Lambda Control Experiment (SQK-RAD004) de ONT fue preparado, para la secuenciación 1D (unidireccional) con el kit de secuenciación rápida (SQK-RAD004). Se realizó una comprobación de la calidad de MinION, tanto del hardware como del estado de la celda de flujo. Se activaron ~1200 poros para la secuenciación sin embargo el software de interfaz de usuario determino la celda en calidad de garantía por lo cual las librerías para la secuenciación genética se preservaron a -20 °C en un ultra congelador para su posterior utilización.



**Fig. 4.** Representación gráfica de generación de librerías con Rapid Sequencing (SQK-RAD004) ONT 2021.

La extracción de ADN de alto peso molecular estandarizado proveniente del fago lamda se preparó con el kit Rapid Sequencing (SQK-RAD004) de ONT, se agrupó y se preparó para la secuenciación 1D (unidireccional) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Sin embargo, si se requiere secuenciar múltiples muestras será necesaria la inclusión del kit Rapid Barcoding (SQK -RBK004) de ONT.



**Fig. 5.** Representación gráfica adición código de barras con Rapid Barcoding (SQK -RBK004) ONT 2021.

#### **7.4 Bioinformática.**

Se realizaron capacitaciones en Linux Bash, cursos y entrenamientos para ensamblaje de secuencias como "Bioinformatics for Biologists: An Introduction to Linux, Bash Scripting, and R", "Design Genomics and Bioinformatics Training" y "Bioinformatics for Biologists" de la plataforma future learning y CISCO, se realizó la instalación, configuración y prueba del software de ONT MiniKNOW y EPI2ME así como se probaron diferentes herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias como: Methricor, Canu, Minimap, Miniasm, Nanopolish, Racon, etc. Utilizando un equipo de cómputo de última generación.

#### **7.5 Análisis estadísticos.**

Se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba de Fisher para la significancia y la prueba de T de Student con el software Graphpad Prism 9 y una corroboración con el software SPSS Statistics 17.0 para la comparación del muestreo de cada visita en cada campo; con la finalidad de determinar la diferencia significativa de las medias de las concentraciones de UFC/ml de cada microorganismo de interés por visita y muestra. En el caso de la comparación de medias de las concentraciones de ADN provenientes de las muestras representativas obtenidas por cada uno de los métodos de cuantificación se realizó una comparación de medias con la prueba pareada de T de Student con un alfa de 0.5 y un valor  $P=0.05$  utilizando el software Graphpad Prism 9 y una corroboración con el software SPSS Statistics 17.0 para determinar si existen diferencias significativas entre las mediciones de los dos métodos de cuantificación.

## 8 RESULTADOS

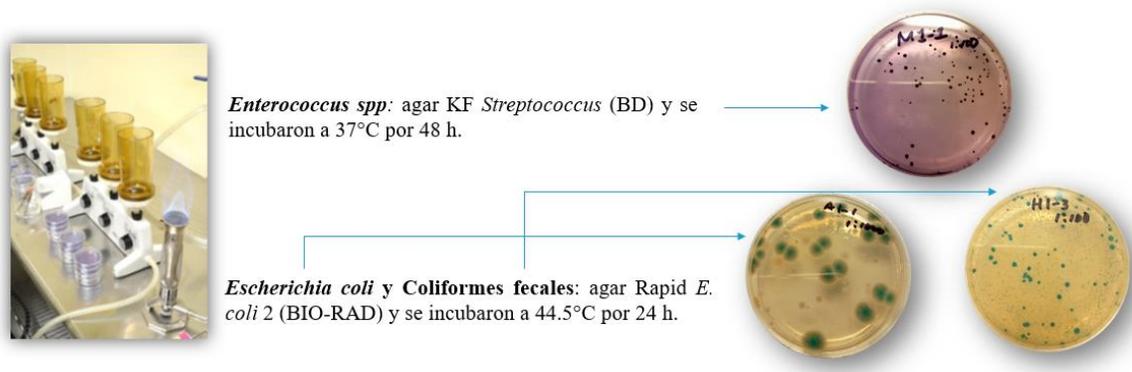
### 8.1 Determinación de microorganismos indicadores de contaminación.

Los muestreos se realizaron durante el periodo de primavera-verano del año 2020. La visita se realizó el 30 de julio del 2020 entre 8 am y 2 pm, (25037'50"N 101049'59" O General Cepeda, Coah. 1200 metros de altitud), temperatura promedio 19<sup>0</sup>C; y la segunda el 12 de octubre entre 8 am y 2 pm (25037'36"N 101049'47" O General Cepeda, Coah. 1200 metros de altitud) 18<sup>0</sup>C, La disposición geográfica de las huertas visitadas y tipo de muestra tomada se reportan en la siguiente tabla.

**Tabla 4.** Muestras recolectadas por cada campo en diferentes puntos del agroecosistema del melón.

Huerta	Ubicación de la huerta (Coordenadas)	Numero de muestras			
		Muestras Compuestas lavado de melón	Manos de trabajadores	Agua de Fuente e irrigación	Suelo
1 v1	25037'50"N 101049'59"	3	5	3	1
1 v2	25037'50"N 101049'59"	3	5	3	1
2 v1	25037'36"N 101049'47"	3	5	3	1
2 v2	25037'36"N 101049'47"	3	5	3	1

En cuanto al procesamiento de las muestras, se realizó un conteo de los microorganismos indicadores obtenidos por la técnica de filtración en membrana y el método de inoculación por extensión en superficie con los agares selectivos para dicho propósito. De tal manera que se pudieron apreciar diversas características en el crecimiento de los microorganismos; ayudando a diferenciarlos y cuantificarlos adecuadamente tomando en cuenta su factor de dilución. Los principales indicadores se apreciaron en su crecimiento como se representa en la siguiente figura.



**Fig. 6.** Crecimiento de colonias características de microorganismos indicadores en sus respectivos medios selectivos.

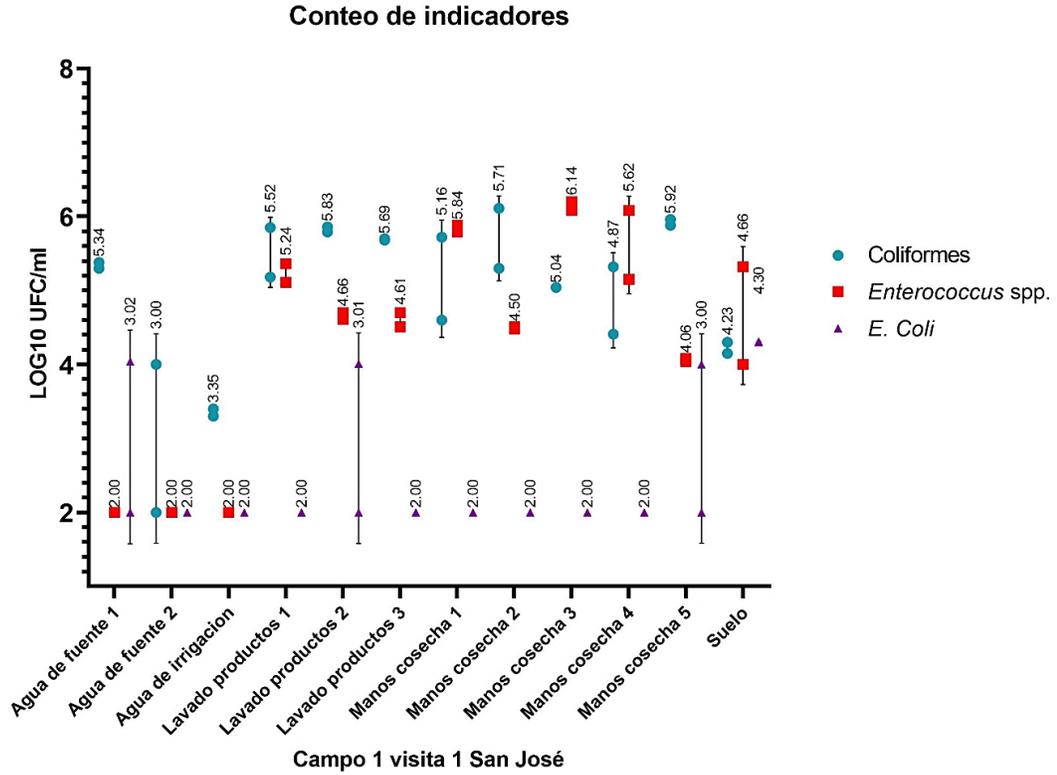
### 8.1.1 Conteo de UFC de microorganismos indicadores de contaminación.

En los medios selectivos mencionados se determinaron las colonias representativas para cada uno de ellos: *Enterococcus spp.* en agar KF *Streptococcus* (BD), *Escherichia coli* y Coliformes fecales: agar Rapid *E. coli* 2 (BIO-RAD), realizando el cálculo por el factor de dilución en este caso  $10^2$  y  $10^3$  para cada una de las muestras, así obteniendo los valores aproximados de UFC/ml para cada muestra. Una vez realizado el conteo de indicadores de contaminación se obtuvieron diversos valores para las concentraciones de estos microorganismos, poniendo en evidencia las diferencias entre los valores medios para cada una de las muestras, así también para cada una de las visitas a los dos campos.

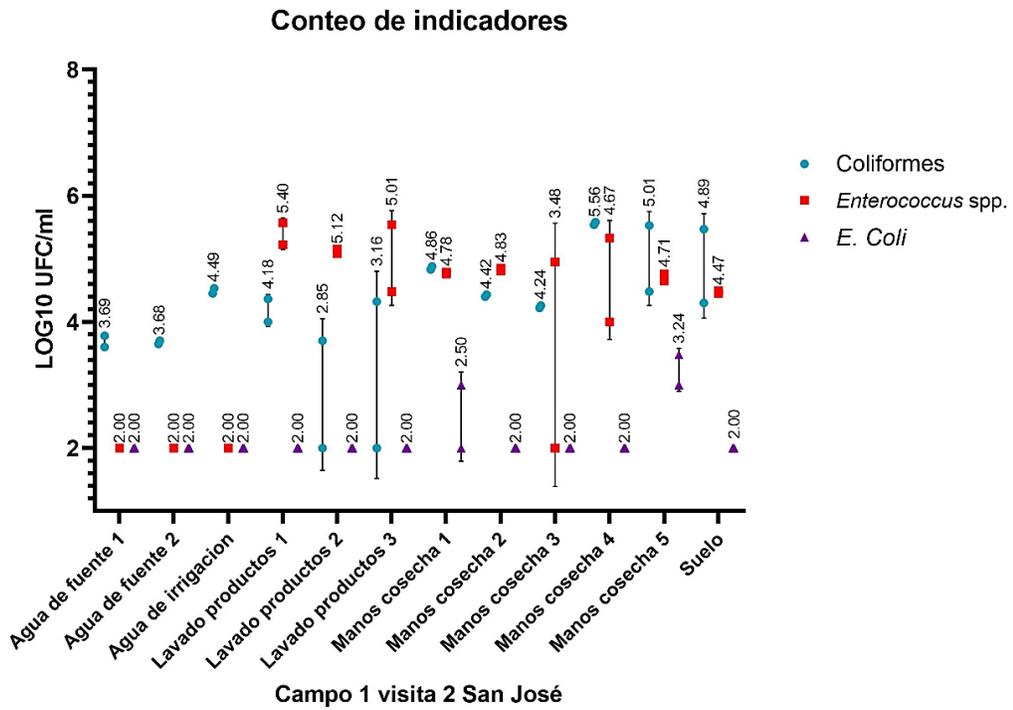
Se observaron las diversas concentraciones en cada una de las muestras, por ejemplo, para el campo 1 y visita 1 podemos apreciar la variación en el conteo de UFC de microorganismos indicadores de contaminación; lo cual manifiesta que las poblaciones microbianas presentes difieren respecto al nicho en el que fueron aisladas, inclusive en un mismo agroecosistema. En el caso del campo 1 en su respectiva visita 1 y visita 2, se observó una proporción particularmente alta para los coliformes fecales en cada una de las muestras, siendo los valores más dominantes respecto a los de *Enterococcus spp* y *E. coli*, la cual presentó las menores concentraciones en todo el análisis. Los valores de las concentraciones medias de las repeticiones son representados a continuación.

**Tabla 5.** Concentraciones log10 de UFC/ml de principales microorganismos indicadores de contaminación en campo 1 visita 1.

<b>Campo1 v1</b>	<b>Coliformes</b>	<b>Coliformes R</b>	<b><i>Enterococcus</i></b>	<b><i>Enterococcus R</i></b>	<b><i>E. Coli</i></b>	<b><i>E. Coli R</i></b>
<b>A1-1</b>	5.30	5.38	2.00	2.00	2.00	4.04
<b>A1-2</b>	4.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
<b>A1-3</b>	3.30	3.40	2.00	2.00	2.00	2.00
<b>M1-1</b>	5.85	5.18	5.11	5.36	2.00	2.00
<b>M1-2</b>	5.86	5.79	4.70	4.61	2.00	4.01
<b>M1-3</b>	5.68	5.70	4.70	4.51	2.00	2.00
<b>H1-1</b>	5.72	4.60	5.88	5.79	2.00	2.00
<b>H1-2</b>	6.11	5.30	4.48	4.51	2.00	2.00
<b>H1-3</b>	5.04	5.04	6.20	6.08	2.00	2.00
<b>H1-4</b>	4.41	5.32	6.08	5.15	2.00	2.00
<b>H1-5</b>	5.96	5.88	4.08	4.04	2.00	4.00
<b>S1-1</b>	4.30	4.15	4.00	5.32	4.30	4.32
<b>Campo1 v2</b>	<b>Coliformes</b>	<b>Coliformes R</b>	<b><i>Enterococcus</i></b>	<b><i>Enterococcus R</i></b>	<b><i>E. Coli</i></b>	<b><i>E. Coli R</i></b>
<b>A1-1</b>	3.78	3.60	2.00	2.00	2.00	2.00
<b>A1-2</b>	3.70	3.65	2.00	2.00	2.00	2.00
<b>A1-3</b>	4.53	4.45	2.00	2.00	2.00	2.00
<b>M1-1</b>	4.36	4.00	5.57	5.22	2.00	2.00
<b>M1-2</b>	3.70	2.00	5.15	5.08	2.00	2.00
<b>M1-3</b>	4.32	2.00	5.54	4.48	2.00	2.00
<b>H1-1</b>	4.88	4.83	4.79	4.76	3.00	2.00
<b>H1-2</b>	4.43	4.40	4.85	4.81	2.00	2.00
<b>H1-3</b>	4.26	4.22	4.95	2.00	2.00	2.00
<b>H1-4</b>	5.58	5.54	5.33	4.00	2.00	2.00
<b>H1-5</b>	5.53	4.48	4.76	4.65	3.48	3.00
<b>S1-1</b>	5.47	4.30	4.49	4.45	2.00	2.00



**Fig. 7.** Concentraciones log<sub>10</sub> de UFC/ml de microorganismos indicadores, concentración media y desviación estándar de la repetición del conteo para Campo 1 visita 1.



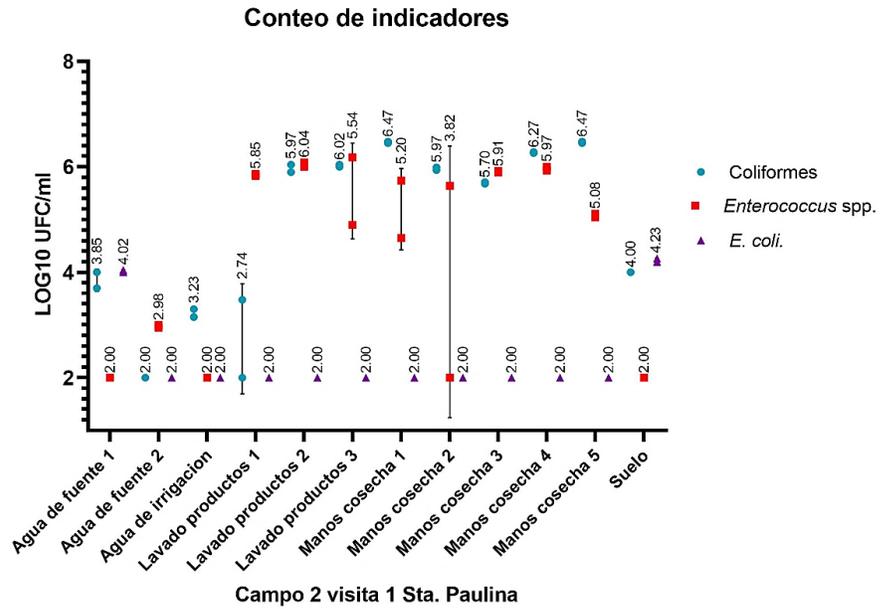
**Fig. 8.** Concentraciones log<sub>10</sub> de UFC/ml de microorganismos indicadores, concentración media y desviación estándar de la repetición del conteo para Campo 1 visita 2.

Respecto a las concentraciones observadas por el conteo de microorganismos indicadores para el Campo 2, en sus respectivas visitas 1 y 2, podemos observar una variación en los valores de cada uno de los microorganismos de interés; por ejemplo, para la visita uno, tenemos que de igual manera la proporción de UFC/ml de coliformes es un poco más alta respecto a los de *Enterococcus* spp y *E. coli*, sin embargo al observar las gráficas, vemos que las concentraciones de UFC/ml varían respecto a cada visita, poniendo en evidencia que la visita 1 para el caso del conteo en ambos campos, es la que presenta mayor concentración de UFC/ml en general. Los valores de las concentraciones medias de las repeticiones son representados a continuación.

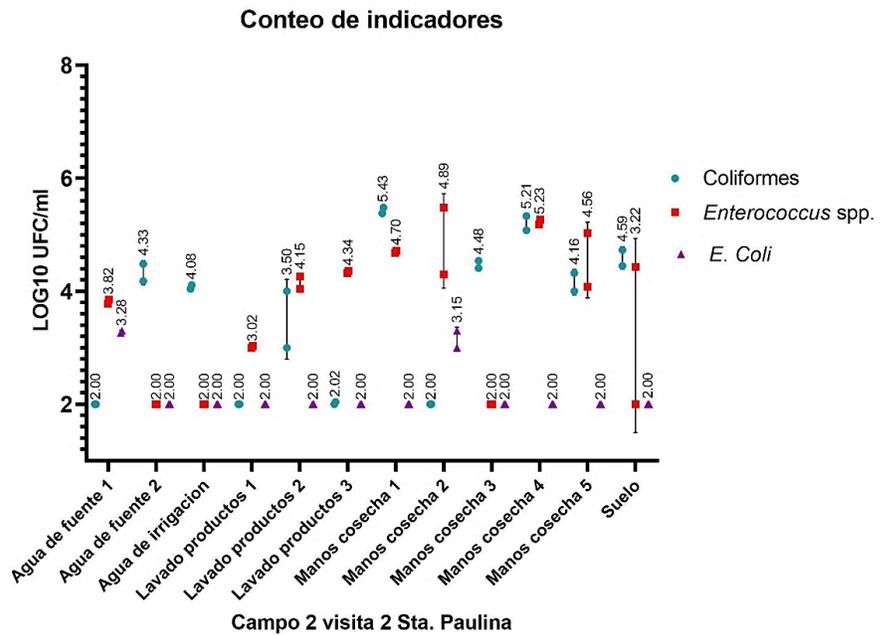
**Tabla 6.** Concentraciones log<sub>10</sub> de UFC/ml de principales microorganismos indicadores de contaminación en campo 2 visita 1 y 2.

<b>Campo2 V1</b>	<b>Coliformes</b>	<b>Coliformes R</b>	<b><i>Enterococcus</i></b>	<b><i>Enterococcus</i> R</b>	<b><i>E. Coli</i></b>	<b><i>E. Coli</i> R</b>
A2-1	4.00	3.70	2.00	2.00	4.00	4.04
A2-2	2.00	2.00	3.00	2.95	2.00	2.00
A2-3	3.30	3.15	2.00	2.00	2.00	2.00
M2-1	3.48	2.00	5.87	5.83	2.00	2.00
M2-2	6.04	5.90	6.08	6.00	2.00	2.00
M2-3	6.04	6.00	6.18	4.90	2.00	2.00
H2-1	6.48	6.45	5.74	4.65	2.00	2.00
H2-2	5.99	5.94	5.64	2.00	2.00	2.00
H2-3	5.71	5.68	5.92	5.89	2.00	2.00
H2-4	6.28	6.26	6.00	5.93	2.00	2.00
H2-5	6.48	6.45	5.11	5.04	2.00	2.00
S2-1	4.00	4.00	2.00	2.00	4.26	4.20
<b>Campo2 v2</b>	<b>Coliformes</b>	<b>Coliformes R</b>	<b><i>Enterococcus</i></b>	<b><i>Enterococcus</i> R</b>	<b><i>E. Coli</i></b>	<b><i>E. Coli</i> R</b>
A2-1	2.00	2.00	3.85	3.78	3.30	3.26
A2-2	4.48	4.18	2.00	2.00	2.00	2.00
A2-3	4.11	4.04	2.00	2.00	2.00	2.00
M2-1	2.00	2.00	3.03	3.00	2.00	2.00
M2-2	4.00	3.00	4.04	4.26	2.00	2.00
M2-3	2.04	2.00	4.36	4.32	2.00	2.00
H2-1	5.48	5.38	4.72	4.68	2.00	2.00
H2-2	2.00	2.00	5.48	4.30	3.30	3.00
H2-3	4.54	4.41	2.00	2.00	2.00	2.00
H2-4	5.33	5.08	5.27	5.18	2.00	2.00

<b>H2-5</b>	4.32	4.00	5.03	4.08	2.00	2.00
<b>S2-1</b>	4.73	4.45	4.43	2.00	2.00	2.00



**Fig. 9.** Concentraciones log<sub>10</sub> de UFC/ml de microorganismos indicadores, concentración media y desviación estándar de la repetición del conteo para Campo 2 visita 1.



**Fig. 10.** Concentraciones log<sub>10</sub> de UFC/ml de microorganismos indicadores, concentración media y desviación estándar de la repetición del conteo para Campo 2 visita 2.

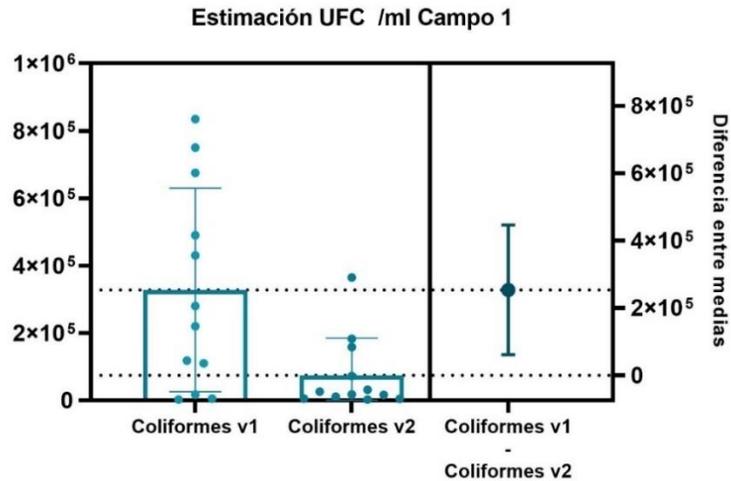
### 8.1.2 Determinación estadística del marco muestral para la secuenciación metagenómica.

Para determinar el marco de análisis por secuenciación metagenómica de la visita que fuera mejor candidata para dicho propósito, se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba de Fisher para la significancia y la prueba de T de Student para la comparación de medias del muestreo de cada visita en cada campo; con la finalidad de determinar la diferencia significativa de las medias de las concentraciones de UFC/ml de cada microorganismo por visita y muestra y así poder escoger la que presente mayor presencia de indicadores de contaminación y por ende, un microbioma con mayor concentración de microorganismos patógenos.

Para el caso de los coliformes fecales presentes en el campo 1 y campo 2, se pudo determinar la diferencia significativa de medias de las concentraciones de UFC/ml, las cuales son mayores en la visita 1 evidentemente respecto a la visita 2, razón por la cual fueron candidatas para ser incluidas las muestras provenientes de la primera visita para el caso de ambos campos como marco muestral. Los resultados se pueden apreciar en las siguientes tablas y gráficas.

**Tabla 7.** Resultados de las pruebas estadísticas para el conteo de UFC/ml de coliformes presentes en el campo 1 en la visita 1 y 2.

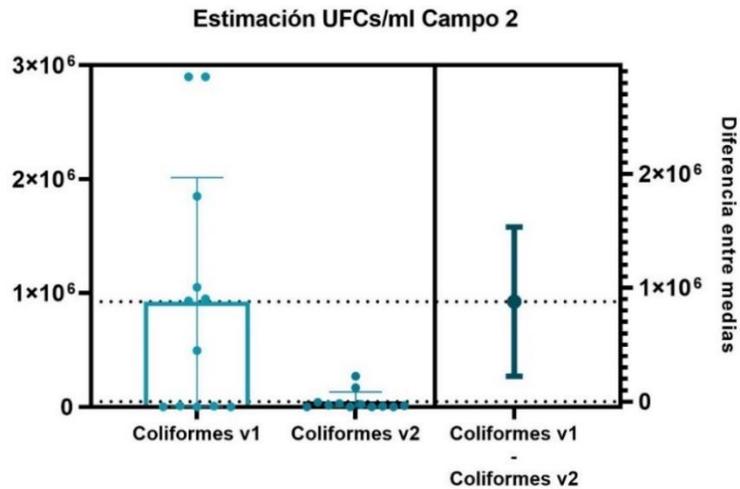
Prueba t no emparejada		Prueba F para comparar varianzas	
Valor de P	0.0122	F, DFn, Dfd (grados de libertad)	7.556, 11, 11
Significativamente diferente (P < 0,05)	Si	Valor de P	0.0023
¿Valor de P de una o dos colas?	Dos colas	Significativamente diferente (P < 0,05)	Si
t, gl	t=2.729, gl=22	N=	48



**Fig. 11.** Estimación y comparación de las medias de la concentración de UFC/ml para coliformes en el campo 1 visita 1 y 2.

**Tabla 8.** Resultados de las pruebas estadísticas para el conteo de UFC/ml de coliformes presentes en el campo 2 en la visita 1 y 2.

Prueba t no emparejada		Prueba F para comparar varianzas	
Valor de P	0.011	F, DF <sub>n</sub> , DF <sub>d</sub>	167.9, 11, 11
Significativamente diferente (P < 0,05)	Si	Valor de P	<0.0001
¿Valor de P de una o dos colas?	Dos colas	Significativamente diferente (P < 0,05)	Si
t, gl	t=2.778, gl=22	N=	48

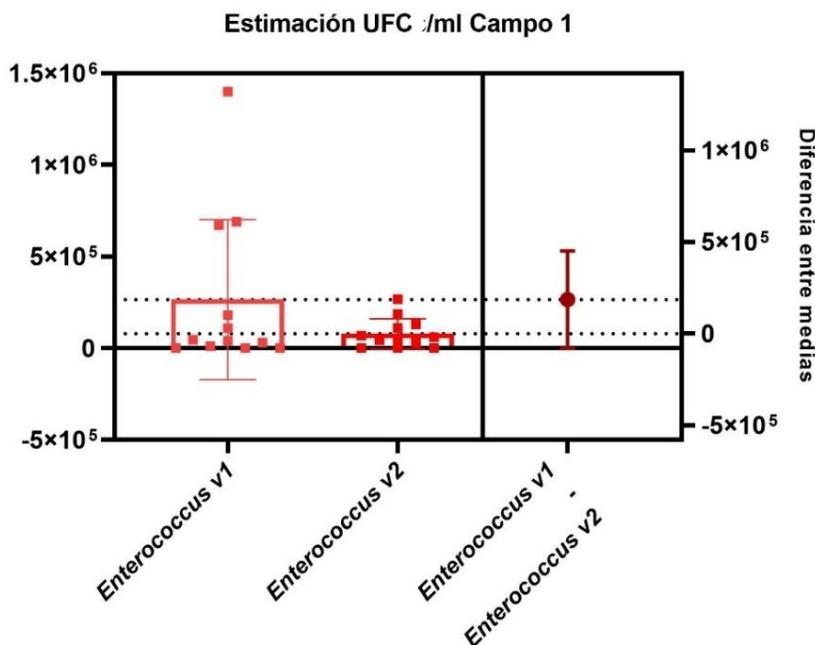


**Fig. 12.** Estimación y comparación de las medias de la concentración de UFC/ml para coliformes en el campo 2 visita 1 y 2.

Respecto a lo observado en las concentraciones de UFC/ml para *Enterococcus* spp tanto del Campo 1 como del Campo 2 se realizó la comprobación estadística, y no se observó diferencia significativa entre de las concentraciones medias de las visitas 1 y 2 del Campo 1, sin embargo, para el Campo 2 fue un caso diferente, en el cual si se observó diferencia significativa de las medias de las concentraciones obtenidas para la visita 1 y 2, siendo la primera la que presento mayor valor y por lo tanto fue incluida en el marco muestral. Los resultados se pueden apreciar en las siguientes tablas y gráficas.

**Tabla 9.** Resultados de las pruebas estadísticas para el conteo de UFC/ml de *Enterococcus* spp. presentes en el campo 1 en la visita 1 y 2.

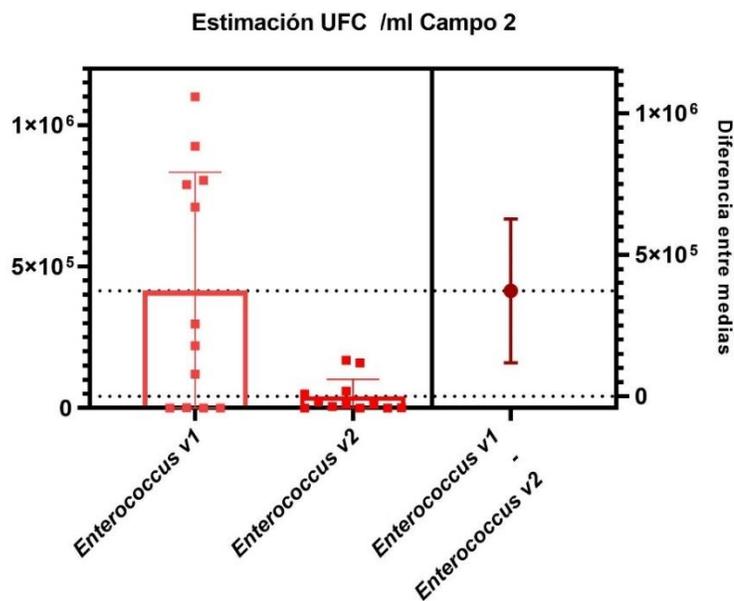
Prueba t no emparejada		Prueba F para comparar varianzas	
Valor de P	0.1607	F, DF <sub>n</sub> , Df <sub>d</sub>	28.26, 11, 11
Significativamente diferente (P < 0,05)	No	Valor de P	<0.0001
¿Valor de P de una o dos colas?	Dos colas	Significativamente diferente (P < 0,05)	Si
t, gl	t=1.452, gl=22	N=	48



**Fig. 13.** Estimación y comparación de las medias de la concentración de UFC/ml para *Enterococcus* spp en el campo 1 visita 1 y 2.

**Tabla 10.** Resultados de las pruebas estadísticas para el conteo de UFC/ml de *Enterococcus* spp presentes en el campo 2 en la visita 1 y 2.

Prueba t no emparejada		Prueba F para comparar varianzas	
Valor de P	0.0059	F, DF <sub>n</sub> , Dfd	47.67, 11, 11
Significativamente diferente (P < 0,05)	Si	Valor de P	<0.0001
¿Valor de P de una o dos colas?	Dos colas	Significativamente diferente (P < 0,05)	Si
t, gl	t=3.046, gl=22	N=	48

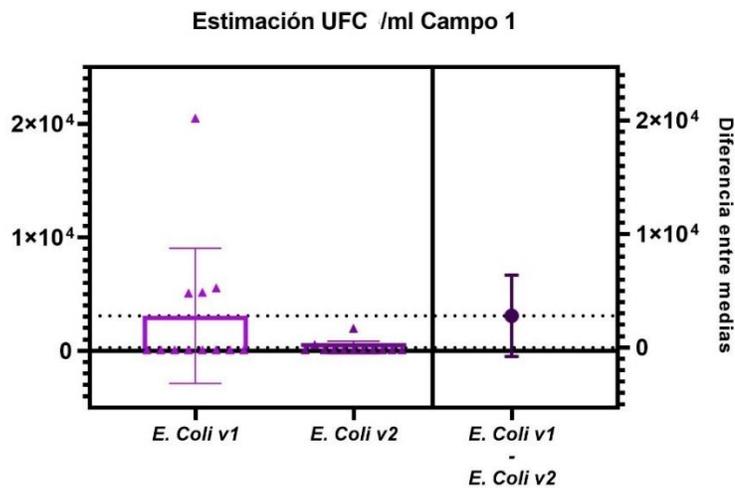


**Fig. 14.** Estimación y comparación de las medias de la concentración de UFC/ml para *Enterococcus* spp en el campo 2 visita 1 y 2.

En cuanto a lo observado estadísticamente para las concentraciones medias de UFC/ml de *E. coli* presentes tanto para el Campo 1 como para el Campo 2, se determinó que en el caso del Campo 1 no existen diferencias significativas respecto a los resultados del muestreo tanto de la visita 1 y visita 2; sin embargo para el caso del Campo 2 fue un caso diferente ya que si se observó diferencia significativa en cuanto a los valores medios de las concentraciones de UFC/ml respecto a la visita 1 y visita 2, siendo la primer visita la que represento un valor más alto y por lo tanto fue incluida en el marco muestral para los análisis de secuenciación metagenómica. Los resultados se pueden apreciar en las siguientes tablas y gráficas.

**Tabla 11.** Resultados de las pruebas estadísticas para el conteo de UFC/ml de *E. coli* presentes en el campo 1 en la visita 1 y 2.

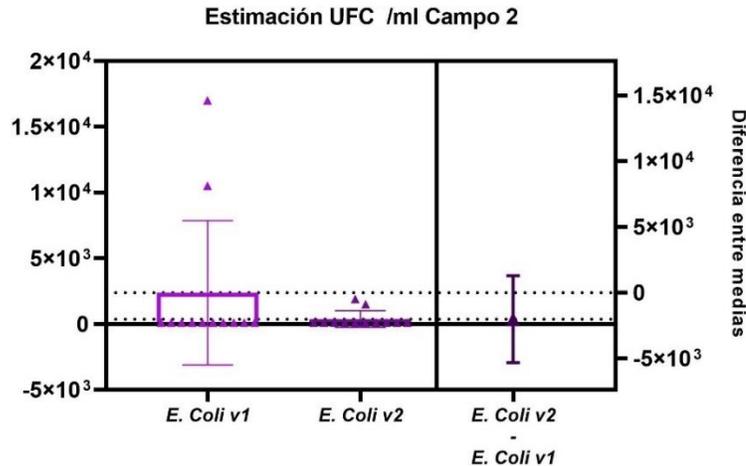
Prueba t no emparejada		Prueba F para comparar varianzas	
Valor de P	0.1191	F, DFn, Dfd	116.0, 11, 11
Significativamente diferente (P < 0,05)	No	Valor de P	<0.0001
¿Valor de P de una o dos colas?	Dos colas	Significativamente diferente (P < 0,05)	Si
t, gl	t=1.622, df=22	N=	48



**Fig. 15.** Estimación y comparación de las medias de la concentración de UFC/ml para *E. coli* en el campo 1 visita 1 y 2.

**Tabla 12.** Resultados de las pruebas estadísticas para el conteo de UFC/ml de *E. coli* presentes en el campo 2 en la visita 1 y 2.

Prueba t no emparejada		Prueba F para comparar varianzas	
Valor de P	0.2213	F, DFn, Dfd	76.30, 11, 11
Significativamente diferente (P < 0,05)	Si	Valor de P	<0.0001
¿Valor de P de una o dos colas?	Dos colas	Significativamente diferente (P < 0,05)	Si
t, gl	t=2.729, gl=22	N=	48



**Fig. 16.** Estimación y comparación de las medias de la concentración de UFC/ml para *E. coli* en el campo 2 visita 1 y 2.

Gracias a los resultados obtenidos y los análisis realizados se tomó la decisión de incluir en el marco muestral para la secuenciación metagenómica solo aquellas muestras provenientes del microbioma presente en las visitas 1 tanto para el Campo 1 como para el Campo 2, a pesar de que no todas las diferencias de medias en las concentraciones de UFC/ml de microorganismos indicadores fueron significativas, en la mayoría de los casos si lo fueron, además complementándolo con lo observado en el conteo de indicadores; se corroboró como la mejor opción de análisis metagenómico la visita 1 para ambos campos.

### 8.1.3 Determinación de cepas presuntivas de microorganismos patógenos.

Los resultados obtenidos de la determinación de microorganismos patógenos por medios de cultivo selectivos mostraron evidencia de la presencia de colonias presuntivas para *Salmonella*, *E. coli* y *L. monocytogenes*, principalmente; gracias a estos aislamientos se pudo corroborar la presencia de estas cepas en las muestras tomadas del agroecosistema del melón, de tal manera que se obtuvo una colección de cepas como se muestra a continuación. Gracias a estos resultados se determinó la presencia de microorganismos de importancia clínica que pueden provocar enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos contaminados; sumando a la justificación para la implementación de un método más robusto de análisis y monitoreo de esta contaminación, como lo es la secuenciación metagenómica del ADN por tecnologías de siguiente generación ONT.

**Tabla 13.** Visita 1 para ambos campos. Colección de cepas presuntivas preservadas en glicerol al 20% y - 80 oC Clave: H= muestra de manos, M=melón, A= agua de irrigación y S= suelo. #1=campo, #2 = muestra, #3 = colonia. En negritas las cepas presuntivas analizadas

<b>A2-1-1 TBX</b>	H2-2-3XLD	H2-2-3	A2-3-3
H2-4-3	H2-2-2	<b>H2-3-2 TBX</b>	H1-2-1 TBX
H2-4-2	<b>H1-3-2 OXA</b>	H2-5(1,2)	H2-1-3
H2-4-1	H2-2-1	H2-1-1	H1-2-2 TBX
H1-4-2	<b>M1-2-5 XLD</b>	H2-3-3TBX	<b>M2-3-4 XLD</b>
H1-5-2	H1-5-2	M1-2-1	H1-5-2
<b>H2-3-2 TBX</b>	<b>M1-2-2 TBX</b>	A1-3-2	H2-3-2
<b>M1-1-5 OXA</b>	A1-3-3	<b>H1-4-3 XLD</b>	<b>S1-1-1 TBX</b>
M1-2-2	<b>M1-2-3 OXA</b>	H2-5-3	A2-1-2
H1-1-1	M1-3-2	M1-3-3	H1-1-3

Para el diagnóstico molecular de microorganismos patógenos por medio de la técnica de PCR punto final, se utilizaron los cebadores para la amplificación de los genes *16S rRNA*, *invA* y *hlyA* para *E. coli*, *Salmonella* spp y *L. monocytogenes* respectivamente.



**Fig. 17.** Aislados de microorganismos patógenos presuntivos con su respectivo medio de cultivo selectivo.

**Tabla 14.** Resultados de la determinación por PCR punto final de microorganismos patógenos contaminantes en el agroecosistema del melón. R: Resultado de la prueba.

<i>E. coli</i>	R	<i>Salmonella</i> spp.	R	<i>L. monocytogenes</i>	R
A2-1-1 TBX	-	M1-2-5 XLD	-	H1-3-2 OXA	-
H2-3-2 TBX	+	M2-3-4 XLD	+	M1-1-5 OXA	-
M1-2-2TBX	-	H1-4-3 XLD	-	M1-2-3 OXA	-
S1-1-1 TBX	+				

## 8.2 Evaluación de los métodos de extracción de ADN de alto peso molecular proveniente del microbioma presente en el agroecosistema del melón.

En cuanto a la obtención del ADN de alto peso molecular correspondiente al microbioma presente en cada una de las muestras del agroecosistema del melón, se realizó una filtración en membranas Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de acuerdo al protocolo descrito (Heredia *et al.* 2016); los resultados de la técnica de filtración de membranas obtenidas por cada una de las muestras y preservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  se representa en la siguiente tabla.

**Tabla 15.** Numero de membranas obtenidas y preservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por tipo de muestra recolectada y campo visitado en la región de Paila Coah. México.

Tipo de muestra recolectada	Cantidad de membranas conservadas a $-80^{\circ}\text{C}$ por campo visitado			
	# muestras Campo 1	# muestras Campo 2	membranas	TOTAL
Lavado de melón	3	3	16	48 - 48
Manos de los trabajadores	5	5	16	80 - 80
Agua de irrigación	2	2	16	32 - 32
Suelo	2	2	16	16 -16

Las membranas fueron preservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , esto para mantener la integridad del microbioma presente y de su ADN, útil para el futuro estudio metagenómico de este trabajo.

Considerando los diferentes protocolos de extracción de alto peso molecular, se realizaron algunas pruebas de extracción de ADN de membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  utilizando una modificación inicial con el kit DNeasy Blood & Tissue de QIAGEN, utilizando tubos de lisis de perlas del kit de ISOLATE Fecal DNA Kit de bioline, esto para comparar la extracción; sin embargo, solo se realizaron 6 extracciones y al ver los resultados, y revisar literatura más reciente de Nanopore, se optó por el método convencional de fenol cloroformo. Las técnicas fueron reproducidas y evaluadas en base a su metodología descrita.

Un bajo rendimiento de ADN puede dar lugar a la pérdida de muestras durante la preparación de bibliotecas o a una baja ocupación de los poros en MinION durante la secuenciación, por lo tanto, se realizó una estandarización del protocolo modificado basado

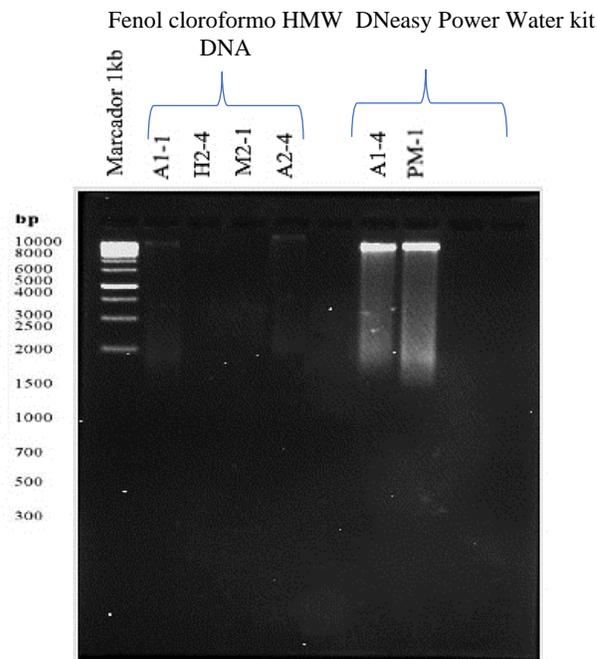
en extracción por fenol-cloroformo para secuenciación metagenómica con ONT. Las concentraciones obtenidas de ADN en diferentes muestras del agroecosistema de melón se listan en la siguiente tabla. En el caso de las membranas provenientes de muestras de agua de irrigación, no se incluyeron en la estandarización ya que para ellas se utilizó un kit de extracción especial para muestras de agua DNeasy Power Water kit (Qiagen) con la finalidad de obtener mayor cantidad de ADN de alto peso molecular.

Las muestras de agua de irrigación que se incluyeron en la estandarización del protocolo modificado basado en extracción por fenol-cloroformo, dieron como resultado bajas concentraciones de ADN revisadas con espectrofotómetro UV-vis NanoDrop 2000, oscilando entre los 50 y 200 ng/μl, siendo descartadas para posteriores estandarizaciones.

**Tabla 16.** Extracciones de ADN de muestras filtradas correspondientes a diferentes puntos del agroecosistema de melón. A corresponde al campo 1 y B corresponde al campo 2. La pureza y concentración fueron determinadas por Nanodrop 2000 (Thermo Fisher).

Muestra	Concentración ADN ng/μl	Pureza A260/A280	Volumen	Muestra	Concentración ADN ng/μl	Pureza A260/A280	Volumen
Melón 1-A	248	1.81	100 μl~	Manos 5-A	302	1.98	100 μl~
Melón 2-A	236	2.07	100 μl~	Manos 1-B	197	1.08	100 μl~
Melón 3-A	198	1.62	100 μl~	Manos 2-B	306	3.05	100 μl~
Melón 1-B	258	1.92	100 μl~	Manos 3-B	289	2.12	100 μl~
Melón 2-B	297	1.68	100 μl~	Manos 4-B	223	2.02	100 μl~
Melón 3-B	301	2.10	100 μl~	Manos 5-B	265	1.99	100 μl~
Manos 1-A	214	1.89	100 μl~	Suelo 1- A	553	1.81	100 μl~
Manos 2-A	195	1.91	100 μl~	Suelo 2- A	628	1.89	100 μl~
Manos 3-A	206	2.30	100 μl~	Suelo 1- B	652	1.79	100 μl~
Manos 4-A	223	2.04	100 μl~	Suelo 2- B	588	1.82	100 μl~

Las muestras de ADN provenientes de suelo resultaron en una mayor concentración, a diferencia de los otros puntos del agroecosistema del melón, esto debido a que contenían aparentemente una mayor concentración de microorganismos atrapados por la membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ , gracias a la eficiencia del protocolo de extracción se obtuvo ADN de calidad y de alto peso molecular. Se realizó también una rectificación de las concentraciones de ADN para determinar cuáles habían sufrido degradación. Además, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% para la visualización de ADN para determinar si cumple con los requisitos necesarios para su utilización. Basado en la baja cantidad de ADN obtenida para las muestras de las membranas provenientes de agua de irrigación, se implementó el protocolo de extracción utilizando el kit DNeasy Power Water kit (Qiagen) de acuerdo las especificaciones del fabricante. Para lo cual se obtuvieron resultados prometedores en cuanto a concentración y visualización del ADN obtenido por el Kit que se pueden apreciar en la siguiente figura.



**Fig. 18.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%, muestras de ADN obtenidas con el kit comercial DNeasy Power Water kit (Qiagen). Comparativa contra el método de extracción Fenol-cloroformo.

Se determinó la integridad del ADN metagenómico con una electroforesis en gel de agarosa al 1% y utilizando un marcador de peso molecular de 10 kb. Gracias a lo observado, se tomó la decisión de realizar la extracción de ADN final para el análisis por secuenciación

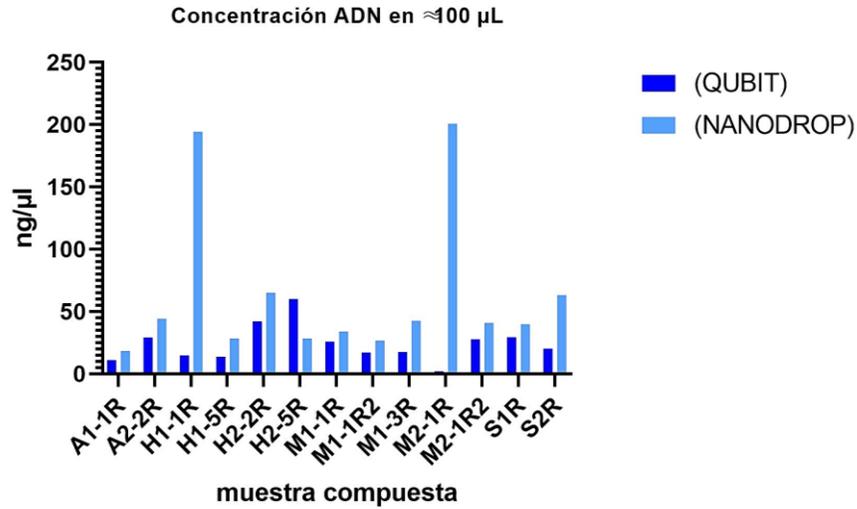
metagenómica de cada una de las muestras por medio del kit DNeasy Power Water kit (Qiagen) y se realizó una comparativa de las concentraciones medias obtenidas por los dos diferentes métodos de cuantificación para cada una de las muestras representativas. Para ello fue de suma importancia tomar en cuenta los parámetros de control de calidad propuestos por la plataforma de ONT para su dispositivo de secuenciación, dichos parámetros fueron comparados para cada una de las muestras representativas y son los siguientes: Pureza medida con Nanodrop - OD 260/280 de 1,8 y OD 260/230 de 2,0-2,2 Masa de entrada, medida por Qubit - 1 µg.

### 8.2.1 Comparativa de los métodos analíticos de la concentración de ADN de alto peso molecular.

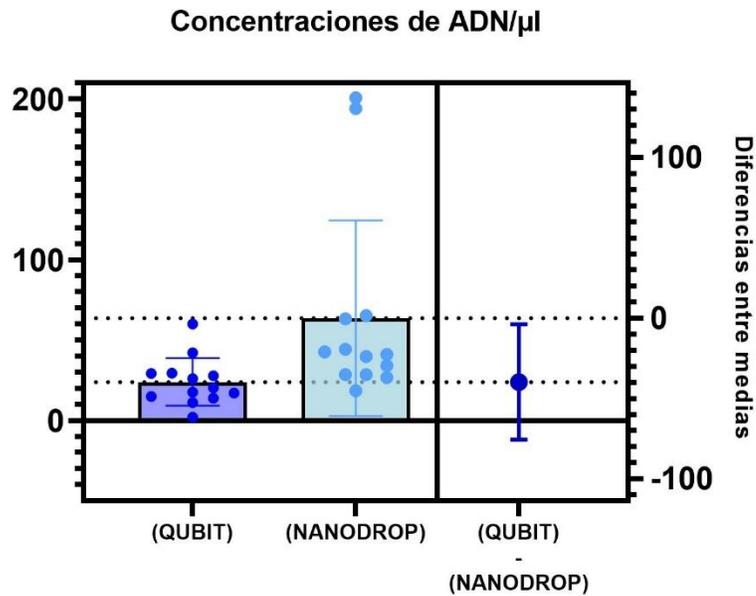
Para la comparación de medias de las concentraciones de ADN provenientes de las muestras representativas obtenidas por cada uno de los métodos de cuantificación se realizó una evaluación de comparación de medias con la prueba pareada de t de Student con un alfa de 0.5 y un valor P=0.0315 para determinar que si existen diferencias significativas entre las mediciones de los dos métodos de cuantificación: método espectroscópico (UV-VIS) Nanodrop 2000 y método fluorométrico por medio de Qubit™ dsDNA HS Assay Kit de Invitrogen. Los resultados obtenidos están representados a continuación.

**Tabla 17.** Concentraciones de ADN de las muestras representativas en el agroecosistema del melón.

<b>Muestras representativas de ADN proveniente del agroecosistema de melón de los 2 campos.</b>					
MUESTRA	(QUBIT)	(NANODROP)	A260/280	A260/230	VOLUME
A1-1R	11.1 ng/µl	18.5 ng/µl	1.9	1.86	≈100 µL
A2-2R	29.2 ng/µl	44.3 ng/µl	1.91	1.82	≈100 µL
H1-1R	14.9 ng/µl	194.2 ng/µl	2.06	2.19	≈100 µL
H1-5R	13.8 ng/µl	28.5 ng/µl	2.05	1.86	≈100 µL
H2-2R	42.1 ng/µl	65.2 ng/µl	1.86	1.84	≈100 µL
H2-5R	60 ng/µl	28.5 ng/µl	2.05	1.96	≈100 µL
M1-1R	26 ng/µl	34.1 ng/µl	1.84	1.88	≈100 µL
M1-1R2	17.1 ng/µl	26.8 ng/µl	1.91	1.66	≈100 µL
M1-3R	17.6 ng/µl	42.7 ng/µl	2.04	1.60	≈100 µL
M2-1R	19.5 ng/µl	200.7 ng/µl	1.86	1.43	≈100 µL
M2-1R2	27.8 ng/µl	41.0 ng/µl	1.90	1.85	≈100 µL
S1R	29.5 ng/µl	39.8 ng/µl	1.89	1.95	≈100 µL
S2R	20.3 ng/µl	63.2 ng/µl	2.05	1.87	≈100 µL



**Fig. 19.** Análisis de las concentraciones de ADN por los dos principales métodos de cuantificación, se incluye el gráfico de las medias de los valores de absorbancia para determinación de pureza y calidad de las muestras.



**Fig. 20.** Diferencia de medias entre las concentraciones de ADN determinadas por los dos principales métodos de cuantificación. Alfa =0.05, P= 0.0315, t=2.285 y gl=24

En base a los resultados se consideró como mejor opción utilizar aquellas muestras que tuvieran los valores de concentración de ADN determinados por Qubit™ dsDNA HS Assay Kit de Invitrogen y que estuvieran dentro de los parámetros de control de calidad para la secuenciación según lo establecido en la plataforma para el dispositivo MinION de ONT

### 8.2.2 Consideraciones en la generación de librerías para secuenciación metagenómica con ONT.

Para la generación de librerías, la cantidad de ADN obtenida por el protocolo DNeasy Power Water kit (Qiagen) resultó ser suficiente para un correcto funcionamiento de la secuenciación y en la generación de códigos de barras, según lo establecido por la plataforma de ONT de acuerdo a los parámetros de calidad y cuantificación por Nanodrop 2000 y Qubit™ dsDNA HS Assay Kit de Invitrogen y fue combinado en base a cada tipo de muestra generando un pool de ADN por muestra el cual se representa en la siguiente tabla (tabla 18). En cuanto al diseño de la secuenciación genética de prueba, para poder analizar las secuencias genéticas en un solo evento de secuenciación con MinION ONT; el ADN de alto peso molecular estandarizado proveniente del fago lamda se preparó con el kit Rapid Sequencing (SQK-RAD004) de ONT. En cuanto a las librerías preparadas para la secuenciación de prueba, se realizó una comprobación de la calidad de MinION, tanto del hardware como del estado de la celda de flujo. Se activaron ~1200 poros para la secuenciación sin embargo el software de interfaz de usuario determino la celda en calidad de garantía por lo cual las librerías para la secuenciación genética se preservaron a -20 °C en un ultra congelador para su posterior utilización.

**Tabla 18.** ADN de alto peso molecular mezclado entre cada uno de los tipos de muestras, para la generación de las librerías de secuenciación separadas por códigos de barras para lograr la secuenciación metagenómica múltiple.

ADN por tipo de muestra	Campo 1 (ADN mezclado)	Campo 2 (ADN mezclado)
Manos de los trabajadores (5)	H1-1R 14.9 ng/μl H1-5R 13.8 ng/μl	H2-2R 42.1 ng/μl H2-5R 60 ng/μl
Lavado de melón (3)	M1-1R 26 ng/μl M1-3R 17.6 ng/μl	M2-1R 19.5 ng/μl M2-1R2 27.8 ng/μl
Agua de irrigación (2)	A1-1R 11.1 ng/μl	A2-2R 29.2 ng/μl
Suelo (2)	S1R 29.5 ng/μl	S2R 20.3 ng/μl

Para el protocolo de separación de muestras por generación de códigos de barras, se necesitan aproximadamente 400 ng/μl en un volumen final de 7.5 μl para la reacción y

utilización del kit de acuerdo al fabricante ONT. La generación de códigos de barras permite la separación de las muestras para realizar una secuenciación múltiple.

Para determinar la composición aproximada del ADN para el éxito en las aplicaciones posteriores, como la secuenciación de lectura larga, se conviene un proceso más fiable y cualitativo si se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Aunque este método no predice directamente ninguna métrica de rendimiento de la secuenciación, ofrece una herramienta para evaluar con mayor precisión la calidad y composición del ADN y como se distribuye su peso molecular antes de la costosa secuenciación o preparación de librerías genómicas.

### **8.3 Implementación de tecnologías de la información para la ejecución y análisis de la secuenciación metagenómica para MinION de ONT.**

En el caso de la Bioinformática, se estructuró un esquema para la implementación de la tecnología de secuenciación genética incluyendo el software para ensamblaje de secuencias y análisis bioinformáticos del microbioma y perfil de GRAs asociado; para ello utilizando un equipo de cómputo adquirido con capacidades recomendadas según la plataforma de ONT para el correcto funcionamiento del dispositivo de secuenciación MinION, se logró la configuración de los sistemas operativos y el software tanto de ensamblaje y análisis de secuencias como para la operatividad del equipo de secuenciación. Se realizaron capacitaciones en Linux Bash, cursos y entrenamientos para ensamblaje de secuencias como "Bioinformatics for Biologists: An Introduction to Linux, Bash Scripting, and R" , "Design Genomics and Bioinformatics Training" y "Bioinformatics for Biologists" de la plataforma Future Learning y CISCO , así como capacitaciones en la construcción de librerías de secuenciación, implementación de códigos de barras; y diversos protocolos de la plataforma de Oxford Nanopore Technologies.

El siguiente software y herramientas de análisis fueron instalados y probados en un sistema de cómputo con las siguientes características: Procesador Intel i7 de 9ª generación con una capacidad de 3.45 GHz y una arquitectura de 8 núcleos con 16 hilos lógicos de procesamiento y 12 MB de L cache; memoria RAM optano de 8 canales de 16 Gb con una frecuencia de 1333 MHz; memoria de video Zogist ZOGT520-2GD3H Gddr5; disco de estado sólido con 500 Gb de almacenamiento. SO LINUX 18.04 y Windows 10.

**Tabla 19.** Software y herramientas utilizadas en el análisis de secuencias genéticas obtenidas con Oxford Nanopore Technologies.

Herramienta	Estrategia	Soporte multi hilo	Servicio	Repositorio
<b>Metrichor</b>	Red neural recurrente	Basado en la nube	Llamado de las bases	<a href="https://metrichor.com/">https://metrichor.com/</a>
<b>Nanonet</b>	Red neural recurrente	Parametros de jobs	Llamado de las bases	<a href="https://github.com/nanoporetech/nanonet">https://github.com/nanoporetech/nanonet</a>
<b>Scrappie</b>	Red neural recurrente	Comandos export OMP	Llamado de las bases	<a href="https://github.com/nanoporetech/scrappie">https://github.com/nanoporetech/scrappie</a>
<b>Nanocall</b>	Modelo Markov escondido	Parámetros Threads	Llamado de las bases	<a href="https://github.com/mateidavid/nanocall">https://github.com/mateidavid/nanocall</a>
<b>GraphMap</b>	Similaridad k-mer	Con el parámetro threads	Ensamblaje MAGs	<a href="https://github.com/isovic/graphmap">https://github.com/isovic/graphmap</a>
<b>Minimap</b>	Minimizador de similaridad	Con el parámetro -t.	Resolución Contigs	<a href="https://github.com/lh3/minimap">https://github.com/lh3/minimap</a>
<b>Canu</b>	OLC corrección de errores	Autoconfiguración	Visualización Ensamblaje	<a href="https://github.com/marbl/canu">https://github.com/marbl/canu</a>
<b>Miniasm</b>	OLC Sin corrección de errores	Sin soporte	Ensamblaje de secuencias	<a href="https://github.com/lh3/miniasm">https://github.com/lh3/miniasm</a>
<b>Nanopolish</b>	Modelos escondidos de Markov	Con el parámetro – threads y -P	Pulir el ensamblaje	<a href="https://github.com/jts/nanopolish">https://github.com/jts/nanopolish</a>
<b>Racon</b>	Gráfico de alineación parcial	Con el parámetro – threads	Pulir el ensamblaje	<a href="https://github.com/isovic/racon">https://github.com/isovic/racon</a>
<b>MiniKNOW</b>	Red neural recurrente	Basado en la nube	Interfaz usuario llamado de bases	Exclusivo Oxford Nanopore Technologies.
<b>EPI2ME</b>	Red neural recurrente	Basado en la nube	Análisis en tiempo real e implementación de pruebas.	Exclusivo Oxford Nanopore Technologies.

## 9 DISCUSIÓN

En este estudio se analizaron las muestras microbiológicas provenientes de dos agroecosistemas del melón de la región de Paila Coah. Zaragoza México. Para poner en contexto, tenemos que considerar que las ETAs y los microorganismos que las generan, guardan una estrecha relación con el agroecosistema donde los productos frescos son desarrollados; esto debido a que la microbiota presente en el ambiente agropecuario interactúa de manera directa con el producto (Pérez y Mercado, 2018), adhiriéndose a este, y llegando hasta la mesa del consumidor. En el caso de los microorganismos patógenos, pueden previamente haber adquirido cualidades específicas debido a la interacción con el microbiota en el agroecosistema, la determinación de estos microorganismos en un nicho específico, puede realizarse por diversas técnicas tanto en la microbiología tradicional como por técnicas de biología molecular; en todo caso, la recuperación de microorganismos de muestras puede ser realizada a través de la filtración en membranas de nitrocelulosa. López Suárez, K. y colaboradores en el 2015 realizaron la validación del método filtración por membrana para análisis microbiológico de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas marinas.

En cuanto a la determinación de microorganismos indicadores de contaminación, se obtuvieron diferentes valores respecto a las medias de las concentraciones de UFC/ml, para los dos campos y las dos visitas, obteniendo un valor máximo de  $2.9^5$  a  $1.3^6$  y  $5.4^4$  a  $3^6$  de UFC/ml de coliformes fecales para el Campo 1 y el Campo 2 respectivamente; correspondiendo las cuentas más elevadas a las muestras de suelo. Similarmente Molina-Loya en el 2012 determinó la calidad microbiológica de un agroecosistema de Chile, en el que las muestras de manos de los trabajadores durante la cosecha arrojaron valores de concentraciones de coliformes fecales mayores a  $10^5$  UFC/ml. De acuerdo a lo observado para el conteo de *E. coli* en el Campo 1 y Campo 2 respectivamente, se obtuvieron valores máximos para las medias de las concentraciones entre  $2.1^4$  y  $1.8^4$  UFC/ml. En el 2012 Maffei y colaboradores analizaron la presencia de *E. coli* en muestras de diversos vegetales tales como lechuga, arugula y acelgas que se venden en Brasil, encontrando que el 40% de las muestras contenían a este microorganismo en niveles de 1 a 2 Log UFC/ml. Respecto a los análisis para el conteo de *Enterococcus* spp se obtuvieron valores máximos de las

medias de las concentraciones de  $1.6^6$  y  $1^6$  de UFC/ml para el Campo 1 y el Campo 2 respectivamente. En el 2012 Molina y colaboradores, encontraron niveles de  $10^2$ - $10^3$  UFC/ml de *Enterococcus* durante la cosecha del chile jalapeño, determinando en el enjuague de producto, y valores de  $10^3$ - $10^4$  UFC/ml para las muestras de manos de los trabajadores, concordando con los resultados de la muestra de este estudio en donde los valores máximos también fueron provenientes de las muestras de manos de trabajadores para cada campo. En este estudio también se evaluaron estadísticamente las diferencias significativas de las concentraciones medias para cada uno de los microorganismos indicadores de contaminación anteriormente mencionados para determinar el marco muestral de los análisis de secuenciación metagenómica, para después contar con un análisis más robusto en cuanto a la presencia de dichos microorganismos. Factores abióticos como el clima, la calidad del suelo, la cantidad de exposición a la luz solar, pueden ser factores que intervienen en la baja concentración de microorganismos indicadores de contaminación en la visita 2 respecto a la visita 1.

Como antesala para la secuenciación metagenómica, el presente trabajo evaluó la presencia o ausencia de microorganismos patógenos de interés clínico, en donde pudimos observar la presencia de *Salmonella* spp en muestra de lavado del producto del Campo 2, la presencia de *E. coli* para muestras de manos de los trabajadores del Campo 2 y en suelo del Campo 1 y la ausencia de *L. monocytogenes* en ambos campos; estas determinaciones fueron realizadas por PCR punto final después de la obtención de cepas presuntivas para los 3 microorganismos patógenos con la utilización de medios selectivos. Sin embargo, los resultados observados pueden diferir de lo que realmente está presente en una muestra tan compleja como lo es el agroecosistema del melón. Se sabe que comprender las características fenotípicas de los aislados tiene límites ambientales, debido a que solo la fracción cultivable representa el 1% del total de microorganismos (Pazda *et al.* 2019), así como las similitudes fenotípicas en el desarrollo en los medios selectivos. Métodos moleculares para el aislamiento de ADN bacteriano son muy eficaces, debido a la detección de las secuencias específicas que codifican ya sea para los genes de virulencia o genes de resistencia a antibióticos, mediante PCR (Pazda *et al.* 2019).

Por otro lado, la aparición de la RAM en los patógenos humanos se ha convertido en una gran amenaza para la medicina moderna (Tong *et al.* 2020). El resultado del tratamiento

con antibióticos puede afectar a la composición del intestino y generar microorganismos multirresistentes que después son distribuidos por diversas vías a través de la estructura pluvial de una población y llegar hasta el agua de irrigación de un agroecosistema, además de las malas prácticas con antibióticos en ganadería y el uso de abonos o fertilizantes contaminados con microorganismos resistentes en una cadena de producción agrícola; son participantes en un potencialmente peligroso aumento exponencial en los perfiles resistoómicos dentro del microbioma en un agroecosistema determinado (Bengtsson-Palme *et al*, 2017). Cada vez se reconoce más que no sólo los genes de resistencia a los antibióticos (GRAs) que se encuentran en los patógenos clínicos son relevantes, sino que todas las bacterias patógenas, comensales y ambientales, así como los elementos genéticos móviles y los bacteriófagos, constituyen un reservorio de GRA del que las bacterias patógenas pueden adquirir resistencia mediante la transferencia horizontal de genes (THG) (Sun *et al*. 2019). La THG ha provocado que la resistencia a los antibióticos se extienda desde las especies comunes y ambientales hasta las patógenas, como se ha demostrado para algunos ARG de importancia clínica (Christian *et al*, 2016).

Gracias a la implementación de la metagenómica se han podido describir microorganismos que son considerados microbiota nativa de un ecosistema. Estas tecnologías también se han implementado en productos alimenticios donde se han enfocado en la identificación de este microbiota presente en productos frescos con la finalidad de observar cómo es que estas poblaciones microbianas interactúan en el agroecosistema, y como son afectadas por condiciones ambientales y la interacción de estas poblaciones con patógenos (Cao *et al*. 2017). Con análisis bioinformáticos de las secuencias metagenómicas se pueden determinar unidades taxonómicas operativas OTU's y con el correcto desarrollo bioinformático, se puede llegar a una resolución de especie entre los aislados virtuales; esto basándose en tecnologías de secuenciación de lecturas largas. La contención de la RAM puede lograrse mediante una comprensión completa de la compleja y diversa estructura y función de la microbiota. Sus entidades taxonómicas sirven como puntos focales para la diseminación de los determinantes genéticos de la resistencia a los antimicrobianos como lo son elementos genéticos móviles (EGM) y participantes implicados en la THG (Martin *et al*, 2021). La metagenómica funcional ha ayudado a identificar posibles reservorios de determinantes de resistencia a los antimicrobianos.

La identificación de los reservorios de GRAs es primordial en las medidas tomadas para resolver la crisis de RAM. Los metagenomas ambientales varían explícitamente entre sí en cuanto a la composición de la microbiota y el patrón del resistoma (Moore *et al.* 2013). La metagenómica ayudó a entender qué nicho ambiental puede ser principalmente una fuente de diseminación y de qué tipo de mecanismo de resistencia antimicrobiana (Pal *et al.* 2016). Un estudio sobre el resistoma del intestino de los bebés sanos demostró que alberga una rica diversidad de GRAs clínicamente relevantes incluso sin exposición previa a la presión de selección de los antibióticos, lo que indica la implicación de los microbios intestinales crípticos como fuentes importantes de GRAs que son transferibles. El estudio destacó la importancia del intestino humano sano como reservorio de GRAs y el papel que juega la secuenciación metagenómica en el análisis de muestras complejas (Fitzpatrick, 2016). La utilización de tecnologías de secuenciación de lecturas largas como es el MinION de ONT, permite a los investigadores con el adecuado enfoque bioinformático determinar todos estos elementos genéticos implícitos en la adquisición de RAM. Además, dilucidar por medio de la sintenia genética los mecanismos y como estos funcionan en la diseminación de los GRAs. Los dispositivos Nanopore de Oxford Technologies podrían proporcionar una secuenciación genómica detallada a una fracción del coste y sin necesidad de conocimientos técnicos de bioinformática.

Este estudio evaluó un esquema de implementación del uso del dispositivo MinION y las herramientas de análisis para sugerir las mejores prácticas utilizando los flujos de trabajo automatizados de EPI2ME y el ensamblaje manual de Novo. Se ha reportado que la inclusión de las lecturas largas de MinION superó los problemas de ensamblaje de las lecturas cortas (Buckley *et al.*, 2015).

Está reportado que utilizando el MinION, se han registrado longitudes de lectura superiores a 100 kb, El MinION ya se ha aplicado para estudiar diversos aspectos relacionados con la resistencia a los antibióticos y la microbiología de las infecciones, incluida la determinación de la estructura y el lugar de inserción cromosómica de una isla de resistencia a los antibióticos en *Salmonella Typhi* (Ashton *et al.*, 2014), la detección de carbapenemasas y genes *ESBL* y su localización genómica en aislados patógenos Gram-negativos (Judge *et al.*, 2015), y la identificación de especies y perfiles de resistencia de aislados de *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium tuberculosis* (Bradley *et al.*, 2015).

Un método exitoso de extracción de ADN de alto peso molecular para estudiar entornos asociados al huésped con baja biomasa microbiana tendría que cumplir: optimizar un perfil de distribución de la longitud de lectura para mejorar los análisis de secuencias posteriores y minimizar la proporción de contaminación del ADN asociado al huésped (Maghini *et al.*, 2021). Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluaron diferentes métodos de extracción de ADN de alto peso molecular proveniente de membranas filtradas que contienen parte del microbioma del agroecosistema del melón; obteniendo diferentes concentraciones de ng/ $\mu$ l para cada uno de ellos; y se determinó la calidad y cuantificación de las extracciones por el método espectroscópico (UV-VIS) Nanodrop 2000 y método fluorométrico de Qubit™ dsDNA HS Assay Kit de Invitrogen; dando valores máximos de 60 ng/ $\mu$ l para la muestra de manos de los trabajadores del campo 2 determinados por Qubit™ y 200.7 ng/ $\mu$ l para la muestra proveniente de lavado del producto del Campo 2; por lo cual se observaron diferencias en cuanto los valores obtenidos cada uno de los métodos; así pues se realizó una prueba estadística de t de Student para determinar que si existe diferencia significativa entre las medias de las concentraciones obtenidas en la utilización de cada uno de los métodos de cuantificación con un Alfa =0.05, un valor P= 0.0315 (t=2.285 y gl=24). Se consideraron los valores determinados por el método fluorométrico de Qubit™ debido a consideraciones de calidad propuestas por la plataforma de Oxford Nanopore Technologies, (Pureza medida con Nanodrop - OD 260/280 de 1,8 y OD 260/230 de 2,0-2,2) y masa de entrada, medida por Qubit de 1  $\mu$ g de ADN por muestra. Goldstein y colaboradores en el 2019 informaron de diferencias en la longitud del ensamblaje que dependen del peso molecular del ADN, un efecto que potencialmente se observa y depende de los protocolos de extracción y generación de librerías genómicas.

Una ventaja única de las plataformas de secuenciación por nanoporos es el acceso en tiempo real al producto que se está secuenciando, lo que promueve nuevos métodos para la identificación basada en la referencia de moléculas de ADN no objetivo y su rechazo en tiempo real de un poro activo para minimizar su impacto en los resultados de la secuenciación (Kovaka *et al.* 2020). La maximización de la calidad del ADN de entrada y el uso de nuevos algoritmos de ensamblaje (Kolmogorov *et al.* 2020; Koren *et al.* 2017; Li 2016; Ruan y Li 2020), las estrategias de pulido eficaces (Loman, Quick y Simpson 2015; Vaser *et al.* 2017; Walker *et al.* 2014; Morisse *et al.* 2021), conducirán a nuevos

conocimientos en metagenómica, especialmente con MAGs circulares completos.

Las lecturas largas de MinION simplifican enormemente el proceso de ensamblaje del genoma al disminuir los requisitos computacionales (Hengyun *et al*, 2016)]. Es pequeño y portátil, MinION es nombrado como el primer dispositivo de secuenciación de ADN utilizado en el espacio exterior para ayudar a la detección de vida en otros lugares del universo con la ayuda de su tamaño y portabilidad (Mohammed-Amin *et al*, 2015). Con la ayuda de continuas actualizaciones del dispositivo MinION y la química de nanoporos, el primer genoma humano de referencia de nanoporos fue generado utilizando sólo dispositivos MinION (Miten *et al*, 2017). La secuenciación MinION no sufre de sesgos conocidos (Krishnakumar *et al.*, 2018) y, por lo tanto, es probable que incluya lecturas perdidas en la secuenciación illumina (Goldstein *et al.*, 2019).

## 10 CONCLUSIONES

- Se analizaron las concentraciones de microorganismos indicadores de contaminación lo cual fue relevante para determinar las diferencias significativas entre cada visita al agroecosistema del melón y se detectó la presencia de patógenos causantes de ETAs como *Salmonella* y *E. coli*, pero no *Listeria*, lo cual es un punto crítico para la mejora en las buenas prácticas agrícolas.
- Es importante la determinación de la composición microbiana en un agroecosistema, la presencia de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación, queda de manifiesto dentro del agroecosistema del melón, lo cual justifica un futuro análisis más robusto por medio de secuenciación metagenómica.
- El conteo de indicadores de contaminación y los análisis estadísticos sobre las medias de las concentraciones de UFC/ml de cada uno de los campos de cultivo y cada una de las visitas, nos indica que el marco muestral para la secuenciación debe ser ubicado en la primera visita a cada campo.
- El ADN de alto peso molecular se obtiene con la modificación de protocolos basados en extracción por fenol-cloroformo sin embargo no cuida factores de calidad como lo hace el kit comercial DNeasy Power Water (Qiagen), obtener ADN de alto peso molecular es importante para el correcto llamado de las bases en el dispositivo MinION y el posterior ensamblaje de secuencias.
- Existe diferencia significativa entre las mediciones realizadas por los dos métodos de cuantificación de ADN: método espectroscópico (UV-VIS) Nanodrop 2000 y método fluorométrico por medio de Qubit™ dsDNA HS Assay Kit de Invitrogen, siendo este último el más sensible para la correcta cuantificación de ADN.
- Se logró implementar el proyecto de secuenciación, considerando las instalaciones de Hardware y Software pertinentes para el correcto funcionamiento del equipo MinION de Oxford Nanopore Technologies; así como los controles de calidad del dispositivo, y del análisis con el software MiniKNOW y EPI2ME.
- La generación de librerías utilizando ADN de alto peso molecular proveniente del fago lambda permite la comprobación de la calidad de la celda de flujo del dispositivo de secuenciación minION ONT a través de softwares de interfaz de usuario antes de la secuenciación de prueba.

## **11 PERSPECTIVAS.**

Efectuar el análisis de secuenciación metagenómica en cultivos de importancia como lo es el del melón; obteniendo datos más robustos sobre la composición de su microbioma, resistoma y elementos involucrados en la adquisición de RAM.

Realizar una comparativa entre los resultados obtenidos por análisis microbiológicos y los obtenidos por una secuenciación metagenómica para determinar las ventajas de realizar un análisis más extenso por medio de esta técnica.

Implementar tecnologías de software y desarrollos bioinformáticos con algoritmos MAFFT de análisis de secuencias múltiples para poder rastrear los eventos de transferencia genética horizontal en una muestra compleja como es la del agroecosistema del melón.

Evaluar la tecnología de secuenciación genética para futuros análisis de agroecosistemas o en muestras de alimentos; así como estandarizar estos análisis para aspectos de inocuidad alimentaria y vigilancia epidemiológica.

## 12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ailes, E. C., Leon, J. S., Jaykus, L. A., Johnston, L. M., Clayton, H. A., Blanding, S., . . . Moe, C. L. (2008). Microbial concentrations on fresh produce are affected by postharvest processing, importation, and season. *J Food Prot*, 71(12), 2389-2397.
- Alegbeleye, Oluwadara Oluwaseun, Ian Singleton, y Anderson S. Sant'Ana. 2018. Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiology* 73 (8): 177-208.
- Alipour, M., Hajiesmaili, R., Talebjannat, M., & Yahyapour, Y. (2014). Identification and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Spp. Isolated from the River and Coastal Waters in Northern Iran. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Althaus D., Hofer E., Corti S., Julmi A., and Stephan R. 2012. Bacteriological Survey of Ready to-Eat Lettuce, Fresh-Cut Fruit, and Sprouts Collected the Swiss Market. *J. Food Prot.* 75:1338–1341.
- Andersen KSS, Kirkegaard RH, Karst SM, Albertsen M. ampvis2: an R package to analyse and visualise 16S rRNA amplicon data. *bioRxiv* (2018)299537. doi:10.1101/299537
- Antwi-Agyei, Prince, Sandy Cairncross, Anne Peasey, Vivien Price, Jane Bruce, Kelly Baker, Christine Moe, Joseph Ampofo, George Armah, y Jeroen Ensink. 2015. A Farm to Fork Risk Assessment for the Use of Wastewater in Agriculture in Accra, Ghana. *PLOS ONE* 10 (11): e0142346.
- Arias, C.A. and B.E. Murray, Antibiotic-resistant bugs in the 21st century—a clinical super-challenge. *New England Journal of Medicine*, 2009. 360(5): pp. 439-443.
- Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, Wishart DS. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* (2016) 44: W16–W21. doi:10.1093/nar/gkw387
- Ashton,P., Nair,S., Dallman,T., Rubino,S., Rabsch,W., Mwaigwisya,S.,Wain,J. and O’Grady,J. (2014) MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island. *Nat. Biotechnol.*, 33, 296–300.

- Balkhair, S. K. 2016. Microbial contamination of vegetable crop and soil profile in arid regions under controlled application of domestic wastewater. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 23: S83-S92.
- Bartz, F. E., Lickness, J. S., Heredia, N., Fabiszewski de Aceituno, A., Newman, K. L., Hodge, D. W., . . . Leon, J. S. (2017). Contamination of Fresh Produce by Microbial Indicators on Farms and in Packing Facilities: Elucidation of Environmental Routes. *Appl Environ Microbiol*, 83(11). doi:10.1128/AEM.02984-16
- Bartz, Faith E., Jacquelyn Sunshine Lickness, Norma Heredia, Anna Fabiszewski de Aceituno, Kira L. Newman, Domonique Watson Hodge, Lee-Ann Jaykus, Santos García, y Juan S. Leon. 2017. Contamination of Fresh Produce by Microbial Indicators on Farms and in Packing Facilities: Elucidation of Environmental Routes. *Applied and Environmental Microbiology* 83 (11).
- Batovska, J., Lynch, S. E., Rodoni, B. C., Sawbridge, T. I., & Cogan, N. O. (2017). Metagenomic arbovirus detection using MinION nanopore sequencing. *J Virol Methods*, 249, 79-84. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.08.019
- Bengtsson-Palme, J., D.J. Larsson, and E. Kristiansson. Using metagenomics to investigate human and environmental resistomes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2017. 72(10): pp. 2690-2703.
- Blackburn, C., P. McClure. In: En: Blackburn, C y P. McClure. *Foodborne pathogens. Hazards, risk analysis and control*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2002: 3-12.
- Boti, M. A., Adamopoulos, P. G., Tsiakanikas, P., & Scorilas, A. (2021). Nanopore Sequencing Unveils Diverse Transcript Variants of the Epithelial Cell-Specific Transcription Factor Elf-3 in Human Malignancies. *Genes (Basel)*, 12(6). doi:10.3390/genes12060839
- Bowen A, Fry A, Richards G, Beauchat L. 2006. Infections associated with cantaloupe consumption: a public health concern. *Epidemiology and Infection* 134(4): 675-685.
- Bradley,P., Gordon,N.C., Walker,T.M., Dunn,L., Heys,S., Huang,B., Earle,S., Pankhurst,L.J., Anson,L., de Cesare,M. *et al.* (2015) Rapid antibiotic resistance predictions from genome sequence data for *S. aureus* and *M. tuberculosis*. *Nat. Commun.*, 6, 018564.

- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, van Themaat EVL, Schulze-Lefert P. 2016. Structure and functions of the bacterial microbiota 64:807-838.
- Butaye, P., L.A. Devriese, and F. Haesebrouck, Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well-known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clinical microbiology reviews*, 2003. 16(2): pp. 175-188.
- Calderón, C.B. and B.P. Sabundayo, Antimicrobial classifications: drugs for bugs. *Antimicrobial susceptibility testing protocols*, 2007. 7.
- Cao, Y., *et al.*, A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. *Frontiers in microbiology*, 2017. 8: pp. 1829.
- Cardenas, C., Molina, K., Heredia, N., & Garcia, S. (2013). Evaluation of microbial contamination of tomatoes and peppers at retail markets in Monterrey, Mexico. *J Food Prot*, 76(8), 1475-1479. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-561
- Cárdenas, Carmen, Karina Molina, Norma Heredia, y Santos García. 2013. Evaluation of Microbial Contamination of Tomatoes and Peppers at Retail Markets in Monterrey, Mexico. *Journal of Food Protection* 76 (8): 1475-79.
- Carr, C. E., Bryan, N. C., Saboda, K. N., Bhattaru, S. A., Ruvkun, G., & Zuber, M. T. (2020). Nanopore sequencing at Mars, Europa, and microgravity conditions. *NPJ Microgravity*, 6(1), 24. doi:10.1038/s41526-020-00113-9
- Carvalho, F., Sousa, S., and Cabanes, D. 2014. How *Listeria monocytogenes* organizes its surface for virulence. *Cellular and Infection Microbiology*. 4:22.
- Castillo, A., Mercado, I., Lucia, L. M., Martinez-Ruiz, Y., Ponce de Leon, J., Murano, E. A., & Acuff, G. R. (2004). *Salmonella* contamination during production of cantaloupe: a binational study. *J Food Prot*, 67(4), 713-720.
- CDC, Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water and other nonrecreational water - United States, 2009-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2013. 62(35): p. 714-720.
- Centers for Disease, C., & Prevention. (2002). Multistate outbreaks of *Salmonella* serotype Poona infections associated with eating cantaloupe from Mexico--United States and Canada, 2000-2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 51(46), 1044-1047.

- Che, Y., Xia, Y., Liu, L., Li, A. D., Yang, Y., & Zhang, T. (2019). Mobile antibiotic resistome in wastewater treatment plants revealed by Nanopore metagenomic sequencing. *Microbiome*, 7(1), 44. doi:10.1186/s40168-019-0663-0
- Chen, B., *et al.*, Metagenomic analysis revealing antibiotic resistance genes (ARGs) and their genetic compartments in the Tibetan environment. *Environmental science & technology*, 2016. 50(13): pp. 6670-6679.
- Chen, B., *et al.*, Metagenomic profiles of antibiotic resistance genes (ARGs) between human impacted estuary and deep ocean sediments. *Environmental science & technology*, 2013. 47(22): pp. 12753-12760.
- Chen, X., Dong, Y., Huang, Y., Fan, J., Yang, M., & Zhang, J. (2021). Whole-genome resequencing using next-generation and Nanopore sequencing for molecular characterization of T-DNA integration in transgenic poplar 741. *BMC Genomics*, 22(1), 329. doi:10.1186/s12864-021-07625-y
- Cicha, Calvin, Jodi Hedges, Ian Novak, Deann Snyder, Mark Jutila, and Blake Wiedenheft. 2020. "Complete Genome Sequence of Brucella Abortus Phage EF4, Determined Using Long-Read Sequencing." *Microbiology Resource Announcements* 9 (18). <https://doi.org/10.1128/MRA.00212-20>.
- Control, C.f.D. and Prevention, *Antibiotic Resistance Threats in the United States 2019*, Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2019.
- Control, C.f.D. and Prevention, *Vital signs: incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food--foodborne diseases active surveillance network, 10 US sites, 1996-2010*. *MMWR. Morbidity and mortality*.
- Corzo-Ariyama, H. A., Garcia-Heredia, A., Heredia, N., Garcia, S., Leon, J., Jaykus, L., & Solis-Soto, L. (2019). Phylogroups, pathotypes, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates in farms and packing facilities of tomato, jalapeno pepper and cantaloupe from Northern Mexico. *Int J Food Microbiol*, 290, 96-104. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.006
- Cuscó A, Catozzi C, Viñes J, Sanchez A, Francino O. Microbiota profiling with long amplicons using Nanopore sequencing: full-length 16S rRNA gene and whole *rrn* operon. *F1000Research* (2018) 7:1755. doi:10.12688/f1000research.16817.1

- Daniel R. 2004. The soil metagenome – a rich resource for the discovery of novel natural products. *Current opinions in Bacteriology* 15:199-204.
- Dolan, L. H., Bastarrachea, J. L., and Tikekar, V. R. 2018. Inactivation of *Listeria innocua* by a combined treatment of low-frequency ultrasound and zinc oxide. *Food Science and Technology*. 88:146-151.
- Douglas, T., Todd, T. & Miron, L. Concurrency and computation: practice and experience 17, 323–356 (2005).
- Ercolini D. 2013. High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology* 79(10): pp.3148-3155.
- Fabiszewski de Aceituno, A., Heredia, N., Stern, A., Bartz, F. E., Venegas, F., Solís-Soto, L., . . . García, S. (2016). Efficacy of two hygiene methods to reduce soil and microbial contamination on farmworker hands during harvest. *Food Control*, 59, 787-792. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.06.059
- Fakhouri, F., *et al.*, Haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet*, 2017. 390(10095): pp. 681-696.
- Fan, H., Q. Wu, and X. Kou, Co-detection of five species of water-borne bacteria by multiplex PCR. *Life Sci. J*, 2008. 5(4): pp. 47-54.
- Fang, H., *et al.*, Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in long-term manured greenhouse soils as revealed by metagenomic survey. *Environmental science & technology*, 2014. 49(2): pp. 1095-1104.
- Fernández, Fernández, F. J, J. de la Fuente Aguado, M. Rubianes González, S. Pérez Fernández, M. Álvarez Fernández, A. Nodar Germiñas, B. Sopeña Pérez-Argüelles, y C. Martínez Vázquez. 2004. Bacteriemia por *Enterococcus faecalis*. *Spanish Clinical Journal* 204 (5): 244-50.
- Fitzpatrick D, Walsh F. Antibiotic resistance genes across a wide variety of metagenomes. *FEMS Microbiol Ecol*. 2016;92:2.
- Foster, I. *The Grid: Blueprint for a New Computing Infrastructure*, edn. 2 (Morgan Kaufmann, San Francisco 2004).

- Frazao, N., Sousa, A., Lassig, M., & Gordo, I. (2019). Horizontal gene transfer overrides mutation in *Escherichia coli* colonizing the mammalian gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(36), 17906-17915.
- Frey, K.G. and K.A. Bishop-Lilly, Next-generation sequencing for pathogen detection and identification, in *Methods in microbiology*. 2015, Elsevier. pp. 525-554.
- Goble CA, Baghat J, Aleksejevs S, Cruickshank D, Michaelides D, Newman D, Borkum M, Bechhofer S, Roos M, Li P, De Roure D: myExperiment: a repository and social network for the sharing of bioinformatics workflows. *Nucleic Acids Res* 2010, 38: W677-W682.
- Gómez-Govea, M., Solís-Soto, L., Heredia, N., García, S., Moreno, G., Tovar, O., and Isunza, G. 2012. Analysis of microbial contamination levels of fruits and vegetables at retail in Monterrey, Mexico. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 10(1):152-156.
- González, F.T. y Rojas, H.R., *Foodborne diseases and pcr: prevention and diagnosis, public health México*, 2005, 47 (5): 388-391.
- Goodwin, S., J.D. McPherson, and W.R. McCombie, Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 2016. 17(6): pp. 333.
- Gothwal, R. and T. Shashidhar, Antibiotic pollution in the environment: a review. *Clean—Soil, Air, Water*, 2015. 43(4): pp. 479-489.
- Guan, T.Y. and Holley, R.A. (2003) Pathogen survival in Swine manure environments and transmission of human enteric illness – a review. *J Environ Qual* 32, 383–392.
- Guerin E, Shkoporov A, Stockdale SR, Gonzalez-Tortuero E, Ross RP, Hill C. Biology and Taxonomy of crAss-like Bacteriophages, the Most Abundant Virus in the Human Gut. *Cell Host Microbe* (2018) 24:653–664. doi: 10.1016/j.chom.2018.10.002
- Gutiérrez, G., Case study. *Foodborne Diseases in Nicaragua, and its socioeconomic impact*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, 2019, pp. 159-190.
- Hadjilouka, A., Molfeta, C., Panagiotopoulou, O., Paramithiotis, S., Mataragas, M., and Drosinos, H. E. 2015. Expression of *Listeria monocytogenes* key virulence genes

- during growth in liquid medium, on rocket and melon at 4, 10 and 30 °C. *Food Microbiology*. 55:7-15.
- Havelaar, A.H., Kirk, M.D., Torgerson, P.R., Gibb, H.J., Hald, T. *et al.*, “World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010”, *plos Med*, 2015, 12 (12): 1-23.
- Heiman, K.E., *et al.*, *Escherichia coli* O157 outbreaks in the United States, 2003–2012. *Emerging infectious diseases*, 2015. 21(8): pp. 1293.
- Hendriksen, R. S., Bortolaia, V., Tate, H., Tyson, G. H., Aarestrup, F. M., & McDermott, P. F. (2019). Using Genomics to Track Global Antimicrobial Resistance. *Front Public Health*, 7, 242.
- Hengyun Lu, Francesca Giordano, and Zemin Ning. Oxford Nanopore MinION sequencing and genome assembly. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 14(5):265–279, 2016.
- Heredia, N., Caballero, C., Cárdenas, C., Molina, K., García, R., Solís, L., Burrowes, V., Bartz, E. F., de Aceituno A. F., Jaykus, L. A., García, S., and Leon, J. 2016. Microbial indicator profiling of fresh produce and environmental samples from farms and packing facilities in northern Mexico. *Journal of Food Protection*. 79(7):1197-1209.
- Heredia, Norma, Cindy Caballero, Carmen Cárdenas, Karina Molina, Rafael García, Luisa Solís, Vanessa Burrowes, *et al.* 2016. Microbial Indicator Profiling of Fresh Produce and Environmental Samples from Farms and Packing Facilities in Northern Mexico. *Journal of Food Protection* 79 (7): 1197-1209.
- Holland RC, Down TA, Pocock M, Prlić A, Huen D, James K, Foisy S, Dräger A, Yates A, Heuer M, Schreiber MJ: BioJava: an open-source framework for bioinformatics. *Bioinformatics* 2008, 24:2096-2097.
- Hosoe, Ayaka, Toshikazu Suenaga, Takumi Sugi, Taro Iizumi, Naohiro Nagai, and Akihiko Terada. 2020. “Complete Genome Sequence of *Pseudomonas Putida* Strain TS312, Harboring an HdtS-Type N-Acyl-Homoserine Lactone Synthase, Isolated from a Paper Mill.” *Microbiology Resource Announcements* 9 (13).
- Jain, M., Fiddes, I., Miga, K. *et al.* Improved data analysis for the MinION nanopore sequencer. *Nat Methods* 12, 351–356 (2015). <https://doi.org/10.1038/nmeth.3290>

- Jones MR, Good JM. Targeted capture in evolutionary and ecological genomics. *Mol Ecol.* 2016; 25:185–202.
- Judge, K., Harris, S.R., Reuter, S., Parkhill, J. and Peacock, S.J. (2015) Early insights into the potential of the Oxford Nanopore MinION for the detection of antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.*, 70, 2775–2778.
- Juul S, Izquierdo F, Hurst A, Dai X, Wright A, Kulesha E, Pettett R, Turner DJ. What's in my pot? Real-time species identification on the MinION. *bioRxiv* (2015)30742. doi:10.1101/030742
- Kaper, J.B., J.P. Nataro, and H.L. Mobley, Pathogenic *escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*, 2004. 2(2): pp. 123-140.
- Kim D, Song L, Breitwieser FP, Salzberg SL. Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. *Genome Res* (2016) 26:1721–1729. doi:10.1101/gr.210641.116
- Kinoshita, Yuta, Hidekazu Niwa, Eri Uchida-Fujii, and Toshio Nukada. 2020. “Complete 717 Genome Sequence of Mycoplasma Felis Strain Myco-2, Isolated from an Equine 718 Tracheal Wash Sample in Japan.” *Microbiology Resource Announcements* 9 (9). 719 <https://doi.org/10.1128/MRA.00057-20>.
- Kirk, Martyn D., Sara M. Pires, Robert E. Black, Marisa Caipo, John A. Crump, Brecht Devleesschauwer, Dörte Döpfer, *et al.* 2015. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS Medicine* 12 (12).
- Koren S, Walenz BP, Berlin K, Miller JR, Bergman NH, Phillippy AM. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k -mer weighting and repeat separation. *Genome Res* (2017)722–736. doi:10.1101/gr.215087.116
- Kostic AD, Howitt MR, Garrett WS. 2013. Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. *Genes & Development* 27:701-718.
- Kumaraswamy, R., *et al.*, Molecular analysis for screening human bacterial pathogens in municipal wastewater treatment and reuse. *Environmental science & technology*, 2014. 48(19): pp. 11610-11619.
- Kunin V, Copeland A, Lapidus A, Mavromatis K, Hugenholtz. 2008. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72(4): 557-578.

- Lanza, F. V., Baquero, F., Martínez, L. J., Ramos-Ruíz, R., González-Zorn, B., Andremont, A., Sánchez-Valenzuela, A., Ehrlich, D., Kennedy, S., Ruppé, E., van Schaik, W., Willems, J. R., de la Cruz, F., and Coque, M. T. 2018. In-depth resistome analysis by targeted metagenomics. *Microbiome*. 6:11.
- Latorre-Perez, A., Villalba-Bermell, P., Pascual, J., & Vilanova, C. (2020). Assembly methods for nanopore-based metagenomic sequencing: a comparative study. *Sci Rep*, 10(1), 13588. doi:10.1038/s41598-020-70491-3
- León JS, Jaykus LA, Moe CL. 2009. Food safety issues and the microbiology of fruits and vegetables. In: *Microbiologically safe foods*. Heredia N, Wesley I, García S. (eds). Wiley: American United States. pp. 255- 258.
- Lewis, E., *et al.*, Next-generation sequencing as a screening tool for foodborne pathogens in fresh produce. *Journal of Microbiological Methods*, 2020: pp. 105840.
- Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics* (2018) 34:3094–3100. doi:10.1093/bioinformatics/bty191
- Li Z, Want Y, Li J, He L, He Y, Wang S. 2016. Metagenomic analysis of genes encoding nutrient cycling pathways in the microbiota of deep-sea and shallowwater sponges. *Marine Biotechnology* 18: 659-671.
- Li, A.-D., L.-G. Li, and T. Zhang, Exploring antibiotic resistance genes and metal resistance genes in plasmid metagenomes from wastewater treatment plants. *Frontiers in microbiology*, 2015. 6.
- Li, B., Chen, Z., Zhang, F., Liu, Y., & Yan, T. (2020). Abundance, diversity and mobility potential of antibiotic resistance genes in pristine Tibetan Plateau soil as revealed by soil metagenomics. *FEMS Microbiol Ecol*, 96(10).
- Li, B., *et al.*, Profile and fate of bacterial pathogens in sewage treatment plants revealed by high-throughput metagenomic approach. *Environmental science & technology*, 2015. 49(17): pp. 10492-10502.
- Lin, B., Hui, J., & Mao, H. (2021). Nanopore Technology and Its Applications in Gene Sequencing. *Biosensors (Basel)*, 11(7). doi:10.3390/bios11070214
- Loman NJ, Quick J, Simpson JT. A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data. *Nat Methods* (2015) 12:733–735. doi:10.1038/nmeth.3444

- Lu, X., *et al.*, Bacterial pathogens and community composition in advanced sewage treatment systems revealed by metagenomics analysis based on high-throughput sequencing. *PLoS One*, 2015. 10(5).
- Maghini, D.G., Moss, E.L., Vance, S.E. *et al.* Improved high-molecular-weight DNA extraction, nanopore sequencing and metagenomic assembly from the human gut microbiome. *Nat Protoc* 16, 458–471 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00424-x>
- Mamanova L, Coffey AJ, Scott CE, Kozarewa I, Turner EH, Kumar A, *et al.* Targetenrichment strategies for next-generation sequencing. *Nat Methods*. 2010; 7:111–8.
- Marine, C. S., Pagadala, S., Wang, F., Pahl, M. D., Melendez, V. M., Kline, L. W., Oni, A. R., Walsh, S. C., Everts, L. K., Buchanan, L. R., and Micallef, A. S. 2015. Growing season, but non farming system, a food safety risk determinant for leafy greens in the mid-Atlantic region. *Applied and Environmental Microbiology*. 1-53.
- Martin, C., Stebbins, B., Ajmani, A. *et al.* Nanopore-based metagenomics analysis reveals prevalence of mobile antibiotic and heavy metal resistome in wastewater. *Ecotoxicology* 30, 1572–1585 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02342-w>
- Martínez JL, Coque TM, Baquero F. Prioritizing risks of antibiotic resistance genes in all metagenomes. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13:396.
- Martínez JL, Coque TM, Baquero F. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat Rev Microbiol.* 2014;13: pp.116–23.
- Maury, M. M., Chenal-Francisque, V., Bracq-Dieye, H., Han, L., Leclecq, A., Vales, G., Moura, A., Gouin, E., Scotti, M., Disson, O., Vázquez-Boland, A. J., and Lecuit, M. 2017. Spontaneous loss of virulence in natural populations of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*. 85(11):13.
- Merino-Mascorro, J. A., Hernandez-Rangel, L. G., Heredia, N., & Garcia, S. (2018). Bacteroidales as Indicators and Source Trackers of Fecal Contamination in Tomatoes and Strawberries. *J Food Prot*, 81(9), 1439-1444. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-18-073

- Miten Jain, Sergey Koren, Josh Quick, *et al.* Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *bioRxiv*, 2017
- Mohammed-Amin Madoui, Stefan Engelen, Corinne Cruaud, *et al.* Genome assembly using Nanopore-guided long and error-free DNA reads. *BMC Genomics*, 16(1), 2015.
- Moore AM, Patel S, Forsberg KJ, Wang B, Bentley G, Razia Y, *et al.* Pediatric fecal microbiota harbor diverse and novel antibiotic resistance genes. *PLoS ONE*. 2013;8:e78822.
- Neefs, J.-M., *et al.*, Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic acids research*, 1993. 21(13): pp. 3025-3049.
- Nesme, J., *et al.*, Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment. *Current biology*, 2014. 24(10): pp. 1096-1100.
- Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, *et al.* Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*. 2009; 461:272–6.
- Nicholson, F.A., Groves, S.J. and Chambers, B.J. 2005. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Biores. Tech.* 96:135–143.
- Ocaña-de Jesús, R. L., A. T. Gutiérrez-Ibáñez, J. R. Sánchez-Pale, M. D. Mariezcurrena-Berasain, G. Velázquez-Garduño, A. Laguna Cerda, y I. Rojas Puebla. 2015. Microbiological quality of tomato (*Solanum lycopersicum L.*) produced under greenhouse conditions in 5 Municipalities of the State of México. *Phyton (Buenos Aires)* 84 (1): 45-50.
- Olea, A., Díaz, J., Fuentes, R., Vaquero, A. y García M., Surveillance of foodborne disease outbreaks in Chile, *Chilean magazine Infectol.* 2012, 29 (5):504-510.
- Olson M. Enrichment of super-sized resequencing targets from the human genome. *Nat Methods*. 2007;4: 891–2.
- Ordaz, G., Merino-Mascorro, J. A., Garcia, S., & Heredia, N. (2019). Persistence of Bacteroidales and other fecal indicator bacteria on inanimated materials, melon and tomato at various storage conditions. *Int J Food Microbiol*, 299, 33-38. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.015
- Pal C, Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DG. The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes. *Microbiome*. 2016; 4:54.

- Pérez-Garza J, Franco-Frías E, García-Heredia A, García S, Leon JS, Jaykus LA, Heredia N. The Cantaloupe Farm Environment Has a Diverse Genetic Pool of Antibiotic-Resistance and Virulence Genes. *Foodborne Pathog Dis.* 2021 Jul;18(7):469-476. doi: 10.1089/fpd.2020.2900. Epub 2021 Apr 23. PMID: 33900863.
- Perez-Garza, J., Garcia, S., & Heredia, N. (2017). Removal of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* after Hand Washing with Antimicrobial and Nonantimicrobial Soap and Persistence of These Bacteria in Rinsates. *J Food Prot*, 80(10), 1670-1675. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-17-088 (Perez-Garza *et al.* 2017)
- Perez-Montano, J. A., Gonzalez-Aguilar, D., Barba, J., Pacheco-Gallardo, C., Campos-Bravo, C. A., Garcia, S., . . . Cabrera-Diaz, E. (2012). Frequency and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes on beef carcasses at small abattoirs in Jalisco State, Mexico. *J Food Prot*, 75(5), 867-873. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-423
- Peterson J, Garges S, Giovanni M, McIness P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, McEwen JE, Wetterstrand KA, Deal C, Baker CC, Francesco V, Howcroft TK, Karp RW, Lunsford RD, Wellington CR, Belachew T, Wright M, Giblin C, David H, Mills M, Salomon R, Mullins C, Akolkar B, Begg L, Davis C, Grandison L, Humble M, Khalsa J, Little RA, Peavy H, Pontzer C, Portnoy M, Sayre MH, Starke-Reed P, Zakhari S, Read J, Watson B, Guyer M. 2009. The NIH human microbiome project. *Genome Research* 19(12): 2317-2323.
- Ravaliya, K., Gentry-Shields, J., García, S., Heredia, N., de Aceituno, F. A., Bartz, E. F., Leon, S. J., and Jaykus, L. A. 2014. Use of Bacteroidales microbial source tracking to monitor fecal contamination in fresh produce production. *Applied and Environmental Microbiology*. 80(2):612-617.
- Ravaliya, K., Gentry-Shields, J., Garcia, S., Heredia, N., Fabiszewski de Aceituno, A., Bartz, F. E., . . . Jaykus, L. A. (2014). Use of Bacteroidales microbial source tracking to monitor fecal contamination in fresh produce production. *Appl Environ Microbiol*, 80(2), 612-617. doi:10.1128/AEM.02891-13
- Sanchez-Gamboa, C., Hicks-Perez, L., Gutierrez-Mendez, N., Heredia, N., Garcia, S., & Nevarez-Moorillon, G. V. (2018). Microbiological Changes during Ripening of Chihuahua Cheese Manufactured with Raw Milk and Its Seasonal Variations. *Foods*, 7(9). doi:10.3390/foods7090153

- Schadt EE, Linderman MD, Sorenson J, Lee L, Nolan GP: Computational solutions to large-scale data management and analysis. *Nat Rev Genet* 2010, 11:647-657.
- Schloss PD, Handelsman J. 2003. Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology* 14(3): 303-310.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (23), 7537–7541.
- Servais, Pierre, y Julien Passerat. 2009. Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine River watershed (France). *Science of The Total Environment* 408 (2): 365-72.
- Shokralla, S., *et al.*, Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular ecology*, 2012. 21(8): pp. 1794-1805.
- Shrestha, R.G., *et al.*, Next-generation sequencing identification of pathogenic bacterial genes and their relationship with fecal indicator bacteria in different water sources in the Kathmandu Valley, Nepal. *Science of the Total Environment*, 2017. 601: pp. 278-284.
- Sivaplasingham, S., Friedman, C.R., Cohen, L. and Tauxe, R.V. 2004. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J. Food Prot.* 67:2342–2353.
- Soto Varela, Zamira, Liliana Pérez Lavalle, y Dalidier Estrada Alvarado. 2016. Bacteria causing of foodborne diseases: an overview at colombia. *Salud Uninorte* 32 (1): 105-22.
- Su JQ, Wei B, Xu CY, Qiao M, Zhu YG. 2014. Functional metagenomics characterization of antibiotic resistance genes in agricultural soils from China. *Environment International* 65: 9-15.
- Sun, D., Jeannot, K., Xiao, Y., & Knapp, C. W. (2019). Editorial: Horizontal Gene Transfer Mediated Bacterial Antibiotic Resistance. *Front Microbiol*, 10, 1933.
- Takeshita, Kazutaka, Seonghan Jang, and Yoshitomo Kikuchi. 2020. “Complete Genome Sequence of Burkholderia Sp. Strain THE68, a Bacterial Symbiont Isolated from

- Midgut Crypts of the Seed Bug Togo Hemipterus.” *Microbiology Resource Announcements* 9 (10). <https://doi.org/10.1128/MRA.00041-20>.
- Tennessen JA, Bigam AW, O’Connor TD, Fu W, Kenny EE, Gravel S, *et al.* Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science*. 2012; 337:64–9.
- Thomas, C.M. and K.M. Nielsen, Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews microbiology*, 2005. 3(9): pp. 711.
- Tippelt, Anna, Tobias Busche, Christian Rückert, and Markus Nett. 2020. “Complete Genome Sequence of the Cryptophycin-Producing Cyanobacterium *Nostoc* Sp. Strain ATCC 53789.” *Microbiology Resource Announcements* 9 (14). <https://doi.org/10.1128/MRA.00040-20>.
- Tiwari, B. & Field, D. *Linux User and Developer* 46,110–115 (2005).
- Todd, E. C. D., J. D. Greig, C. A. Bartleson, and B. S. Michaels. 2008. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 5. Sources of contamination and pathogen excretion from infected persons. *J. Food Prot.* 71:2582– 2595.
- Tong, L., Qin, L., Guan, C., Wilson, M. E., Li, X., Cheng, D., Gong, F. (2020). Antibiotic resistance gene profiling in response to antibiotic usage and environmental factors in the surface water and groundwater of Honghu Lake, China. *Environ Sci Pollut Res Int*, 27(25), 31995-32005.
- Turton, J.F., Doumith, M., Hopkins, K.L., Perry, C., Meunier, D. and Woodford, N. (2016) Clonal expansion of *Escherichia coli* ST38 carrying chromosomally-integrated OXA-48 carbapenemase gene. *J. Med. Microbiol.*, 38, 538–546
- Udikovic-Kolic, N., Wichmann, F., Broderick, A. N., and Handelsman, J. 2014. Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 42(111):15202-15207.
- Ukuku, O. D., Geveke, J. D., Chau, L., and Niemira, A. B. 2016. Microbial safety and overall quality of cantaloupe fresh-cut pieces prepared from whole fruit after wet steam treatment. *International Journal of Food Microbiology*. 3-31.

- Ukuku, O. D., Huang, L., and Sommers, C. 2015. Efficacy of sanitizer treatments on survival and growth parameters of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* on fresh-cut pieces of cantaloupe during storage. *Journal of Food Protection*. 78(7):1288-1295.
- Van Duijkeren, E., Schink, K. A., Roberts, C. M., Wang, Y., and Schwarz, S. 2018. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Microbiology Spectrum*. 6(1):31.
- Veras, J. F., Simeão do Carmo, L. and Tong, C.L. 2008. A study of the enterotocigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*. 12:410-415.
- Walsh, A. K., Bennett, D. S., Mahovic, M., and Gould, H. L. 2015. Outbreaks associated with cantaloupe, watermelon, and honeydew in the United States, 1973-2011. *Foodborne Pathogens and Diseases*. 11(12):945-952.
- Wang, F. R., Cao, W. W., and Cerniglia, E. C. 1997. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *Journal of Applied Microbiology*. 83:727-736.
- Wang, G., Manns, C. D., Churey, J. J., and Worobo, W. R. 2014. Naturally sensitive *Bacillus thuringiensis* EG10368 produces thurcin H and acquires immunity after heterologous expression of the one-step-amplified thurcin H gene cluster. *Journal of Dairy Science*. 97:4115-4119.
- Wang, H., Sangwan, N., Li, Y. H., Su, Q. J., Oyang, Y. W., Zhang, J. Z., Gilbert, A. J., Zhu, G. Y., Ping, F., and Zhang, L. H. 2016. The antibiotic resistome of swine manure is significantly altered by association with the *Musca domestica* larvae gut microbiome. *International Society for Microbial Ecology*. 1-12.
- Wang, J., Chen, K., Ren, Q., Zhang, Y., Liu, J., Wang, G., . . . Guan, G. (2021). Systematic Comparison of the Performances of De Novo Genome Assemblers for Oxford Nanopore Technology Reads from Piroplasm. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 696669. doi:10.3389/fcimb.2021.696669
- Watson, C. M., Crinnion, L. A., Simmonds, J., Camm, N., Adlard, J., & Bonthron, D. T. (2021). Long-read nanopore sequencing enables accurate confirmation of a

- recurrent PMS2 insertion-deletion variant located in a region of complex genomic architecture. *Cancer Genet*, 256-257, 122-126. doi: 10.1016/j.cancergen.2021.05.012
- Webb, C. C., Erickson, C. M., Davey, E. L., and Doyle, P. M. 2015. Evaluation of single or double hurdle sanitizer applications in simulated field of packing shed operations for cantaloupes contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Agriculture*. 5:231-244.
- WHO, Global Water Supply and Sanitation Assessment G. World Health Organization, Editor. 2000. Edition, F., Guidelines for drinking-water quality. *WHO chronicle*, 2011. 38(4): pp. 104-8.
- Wright, G.D., Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chemical communications*, 2011. 47(14): pp. 4055-4061.
- Xu, Y., Lewandowski, K., Jeffery, K., Downs, L. O., Foster, D., Sanderson, N. D., . . . Pullan, S. T. (2020). Nanopore metagenomic sequencing to investigate nosocomial transmission of human metapneumovirus from a unique genetic group among haematology patients in the United Kingdom. *J Infect*, 80(5), 571-577. doi: 10.1016/j.jinf.2020.02.003
- Xu, Y., Yang-Turner, F., Volk, D., & Crook, D. (2020). NanoSPC: a scalable, portable, cloud compatible viral nanopore metagenomic data processing pipeline. *Nucleic Acids Res*, 48(W1), W366-W371. doi:10.1093/nar/gkaa413
- Zhang, W. W., Ying, Y. L., & Long, Y. T. (2020). [Single-molecule electrophoresis: renewed understanding of nanopore electrochemistry]. *Se Pu*, 38(9), 993-998. doi:10.3724/SP.J.1123.2020.05001
- Zoellner, C., Venegas, F., Churey, J. J., Davila-Avina, J., Grohn, Y. T., Garcia, S., . . . Worobo, R. W. (2016). Microbial dynamics of indicator microorganisms on fresh tomatoes in the supply chain from Mexico to the USA. *Int J Food Microbiol*, 238, 202-207. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.013