

Anexos

Anexo 1: Medio de cultivo sólido

Non-nutrient agar PAGE (NNAP)

El Agar Bacteriológico Europeo se disuelve en PAGE 1X previamente preparado, obteniendo una composición final de 15 g/L. La disolución se esteriliza en el autoclave a 121 °C y 1 atmósfera durante 15 minutos. Se vierte en una placa y se deja enfriar hasta su solidificación.

Anexo 2: Reactivos empleados en tratamiento de Cloro y PMA

Extracción de DNA

GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, referencia K0722) concretamente, se siguió el protocolo de purificación de DNA genómico de células cultivadas de mamífero.

Hipoclorito de sodio

Se realiza una dilución de hipoclorito de sodio (100 ppm) con PAGE 1X hasta obtener una concentración de hipoclorito sódico de 1630 ppm.

Solución salina amébrica de Page (PAGE 10X)

Se disuelven los siguientes componentes en agua destilada obteniendo una composición final (g/l):

Cloruro de sodio (NaCl)	1.20
Sulfato de magnesio (MgSO4)	0.04
Hidrogenofosfato de sodio (Na2HPO4)	1.42
Dihidrogenofosfato de potasio (KH2PO4)	1.36
Cloruro de calcio (CaCl2)	0.04

PAGE 1X

Se realiza una dilución 1:10 de PAGE 10X con agua destilada.

PBS 1X estéril

Se filtra PBS 1X sin calcio y magnesio Lot 23016003. Ref:21-040- CVR (Corning, Mediatech) empleando un filtro Fisherbrand.

PMA

Para crear una concentración de 20 mM en stock de PMA, 1 mg sólido de este se disuelve en 98 µl de agua Milli-Q.

Anexo 3: *Pipeline* de QIIME2

#Importar secuencias

```
qiime tools import \  
  --type 'SampleData[PairedEndSequencesWithQuality]' \  
  --input-path FLA-Manifest-file.tsv \  
  --output-path fastq.qza \  
  --input-format PairedEndFastqManifestPhred33V2
```

#Resumen de los resultados

```
qiime demux summarize \  
  --i-data fastq.qza \  
  --o-visualization fastq.qzv
```

#Dada2: unir las secuencias, eliminar el ruido y filtrar las quimeras

```
qiime dada2 denoise-paired \  
  --p-trim-left-f 10 \  
  --p-trim-left-r 10 \  
  --p-trunc-len-f 290 \  
  --p-trunc-len-r 220 \  
  --o-table table.qza \  
  --o-representative-sequences rep-seqs.qza \  
  --o-denoising-stats denoising-stats.qza
```

#Resumen de los resultados

```
qiime feature-table summarize \  
  --i-table table.qza \  
  --o-visualization table.qzv \  
  --m-sample-metadata-file FLA-Metadata-file.tsv
```

```
qiime feature-table tabulate-seqs \  
  --i-data rep-seqs.qza \  
  --o-visualization rep-seqs.qzv
```

```
qiime metadata tabulate \  
  --m-input-file denoising-stats.qza \  
  --o-visualization denoising-stats.qzv
```

#Asignar taxonomía a las ASVs

```
qiime feature-classifier classify-consensus-blast \  
  --i-data rep-seqs.qza
```

```
--i-query rep-seqs.qza \  
--i-reference-reads silva-138-99-seqs.qza \  
--i-reference-taxonomy silva-138-99-tax.qza \  
--o-classification taxonomy.qza \  
--p-perc-identity 0.97
```

#Crear visualización de la taxonomía

```
qiime metadata tabulate \  
--m-input-file taxonomy.qza \  
--o-visualization taxonomy.qzv
```

#Filtrar secuencias de mitocondrias y cloroplastos

```
qiime taxa filter-table \  
--i-table table.qza \  
--i-taxonomy taxonomy.qza \  
--p-exclude mitochondria;chloroplast \  
--o-filtered-table filtered-table.qza
```

#Crear barplot de la composición taxonómica de las muestras

```
qiime taxa barplot \  
--i-table filtered-table.qza \  
--i-taxonomy taxonomy.qza \  
--o-visualization taxa-barplots.qzv \  
--m-metadata-file FLA-Metadata-file.tsv
```

#Generar árbol filogenético requerido para pasos posteriores

```
qiime phylogeny align-to-tree-mafft-fasttree \  
--i-sequences rep-seqs.qza \  
--o-alignment aligned-rep-seqs.qza \  
--o-masked-alignment masked-alignment-rep-seqs.qza \  
--o-tree unrooted-tree.qza \  
--o-rooted-tree rooted-tree.qza
```

#Normalizar

```
qiime diversity alpha-rarefaction \  
--i-table filtered-table.qza \  
--i-phylogeny rooted-tre.qza \  
--p-max-depth 41700 \  

```

```
--o-visualization alpha-rarefaction.qzv \  
--m-metadata-file FLA-Metadata-file.tsv \  
--p-metrics 'observed-features' \  

```

#Parámetros de diversidad

```
qiime diversity core-metrics-phylogenetic \  
--i-phylogeny rooted-tree.qza \  
--i-table filtered-table.qza \  
--p-sampling-depth 41700 \  
--m-metadata-file FLA-Metadata-file.tsv \  
--output-dir core-metrics-results
```

#Diversidad alfa

```
qiime diversity alpha-group-significance \  
--i-alpha-diversity core-metrics-results/faith_pd_vector.qza \  
--m-metadata-file FLA-Metadata.tsv \  
--o-visualization core-metrics-results/faith-pd-group-significance.qzv
```

#Diversidad beta

```
qiime diversity beta-group-significance \  
--i-distance-matrix core-metrics-results/unweighted_unifrac_distance_matrix.qza \  
--m-metadata-file FLA-Metadata.tsv \  
--m-metadata-column alimento\  
--o-visualization core-metrics-results/unweighted-unifrac-alimento-significance.qzv \  
--p-pairwise
```

#Crear PCA

```
qiime emperor plot \  
--i-pcoa core-metrics-results/unweighted-unifrac-pcoa-results.qza \  
--m-sample-metadata-file FLA-Metadata-file.tsv \  
--o-visualization core-metrics-results/unweighted-unifrac-pcoa-results.qzv \  

```

#Obtener core microbiome

```
qiime feature-table core-features \  
--i-table table.qza \  
--p-min-fraction 0.5 \  
--p-max-fraction 1 \  
--o-visualization core-microbiome.qzv
```

Anexo 4: Tabla suplementaria del análisis bioinformático

Tabla 13. Abundancia relativa de bacterias de interés para la Salud Pública presentes en las muestras de vegetales orgánicos.

Género	Promedio	Muestras de espinaca	Muestras de lechuga
<i>Achromobacter</i>	1.6529%	1.1723%	1.9892%
<i>Acidovorax</i>	0.9021%	1.0014%	0.8326%
<i>Acinetobacter</i>	0.6990%	0.4267%	0.8896%
<i>Aeromonas</i>	0.0561%	0.1154%	0.0146%
<i>Arcobacter</i>	0.0004%	0.0000%	0.0007%
<i>Bacillus</i>	0.2467%	0.0573%	0.3792%
<i>Bacteroides</i>	0.0002%	0.0004%	0.0000%
<i>Bordetella</i>	0.0292%	0.0269%	0.0308%
<i>Brevibacillus</i>	0.0023%	0.0057%	0.0000%
<i>Brevundimonas</i>	0.7024%	0.6540%	0.7363%
<i>Capnocytophaga</i>	0.0004%	0.0011%	0.0000%
<i>Chryseobacterium</i>	0.2496%	0.0588%	0.3833%
<i>Citrobacter</i>	0.0712%	0.0175%	0.1089%
<i>Clostridium</i>	0.0013%	0.0015%	0.0012%
<i>Comamonas</i>	0.4373%	0.3607%	0.4908%
<i>Corynebacterium</i>	0.0051%	0.0000%	0.0086%
<i>Coxiella</i>	0.0006%	0.0014%	0.0000%
<i>Delftia</i>	1.8534%	1.1294%	2.3602%
<i>Enterobacter</i>	0.2720%	0.0741%	0.4105%
<i>Erwinia</i>	0.0273%	0.0000%	0.0464%
<i>Erysipelothrix</i>	0.0058%	0.0012%	0.0090%
<i>Flavobacterium</i>	10.6491%	14.6797%	7.8276%
<i>Fusobacterium</i>	0.0213%	0.0179%	0.0237%
<i>Granulicatella</i>	0.0025%	0.0061%	0.0000%
<i>Klebsiella</i>	0.0026%	0.0064%	0.0000%
<i>Kocuria</i>	0.0026%	0.0018%	0.0032%
<i>Legionella</i>	0.5006%	0.1630%	0.7368%
<i>Leuconostoc</i>	0.0004%	0.0009%	0.0000%

<i>Mycobacterium</i>	0.0422%	0.0271%	0.0527%
<i>Nocardia</i>	0.0024%	0.0000%	0.0041%
<i>Ochrobactrum</i>	0.0564%	0.1160%	0.0147%
<i>Paenibacillus</i>	0.7548%	1.1828%	0.4553%
<i>Pantoea</i>	0.0909%	0.0233%	0.1382%
<i>Paracoccus</i>	0.0318%	0.0363%	0.0287%
<i>Peptococcus</i>	0.0460%	0.0000%	0.0782%
<i>Providencia</i>	0.0191%	0.0000%	0.0325%
<i>Pseudomonas</i>	9.5694%	1.1838%	15.4394%
<i>Rahnella</i>	0.0003%	0.0000%	0.0004%
<i>Ralstonia</i>	0.0020%	0.0000%	0.0035%
<i>Rhodococcus</i>	0.0020%	0.0000%	0.0035%
<i>Rickettsia</i>	0.1104%	0.0961%	0.1205%
<i>Salmonella</i>	0.0031%	0.0000%	0.0052%
<i>Serratia</i>	0.0007%	0.0018%	0.0000%
<i>Shewanella</i>	0.0005%	0.0000%	0.0008%
<i>Sphingobacterium</i>	0.2624%	0.3316%	0.2140%
<i>Sphingomonas</i>	0.7012%	0.4414%	0.8830%
<i>Staphylococcus</i>	0.0873%	0.0332%	0.1252%
<i>Stenotrophomonas</i>	4.4376%	1.1950%	6.7075%
<i>Streptococcus</i>	0.0028%	0.0061%	0.0004%
<i>Streptomyces</i>	0.0185%	0.0225%	0.0157%
<i>Tissierella</i>	0.0074%	0.0000%	0.0126%
<i>Xanthomonas</i>	0.0292%	0.0000%	0.0497%
Total	34.7006%	24.7141%	41.6912%