

ISSN electrónico: 2445-1355

DOI: <http://dx.doi.org/10.14201/fj2019427384>

ANÁLISIS METAGENÓMICO DE LA EVOLUCIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN ALIMENTOS SOMETIDOS A REFRIGERACIÓN Y EN CONDICIONES DE AUSENCIA DE FRÍO

Metagenomic Analysis of the Evolution of Microbial Communities in Foods Subjected to Refrigeration and in Conditions of Absence of Cold

Virginia PIRES; Raúl RIVAS; Paula GARCÍA-FRAILE

Departamento de Microbiología y genética. Dirección: Edificio Departamental, 2.ª planta. Campus Miguel de Unamuno. 37007, Salamanca. Teléfono: +34 923 294 461 - Fax: +34 923 294 876

Correo-e: dpto.myg@usal.es

RESUMEN: La cadena del frío constituye un elemento clave en seguridad alimentaria, pues la mayoría de los microorganismos detienen su crecimiento a bajas temperaturas. Se han desarrollado técnicas, basadas en la secuenciación masiva, que analizan las poblaciones bacterianas de una muestra mediante secuenciación de un fragmento del gen ribosómico 16S, permitiendo la caracterización microbiana de alimentos.

El objetivo del presente estudio consistió en la identificación y cuantificación de bacterias sobre alimentos refrigerados y sin refrigerar utilizando secuenciación masiva del ADN_r16S, para describir el rol del mantenimiento de la cadena del frío sobre la evolución de comunidades microbianas en alimentos.

Así, se secuenció el ADN extraído de muestras de pollo, espinacas, queso fresco y yogurt, a los 2 y 4 días. Las Unidades de Operación Taxonómica (Operational Taxonomic Units: OTUs) obtenidas se compararon con bases de

datos de secuencias de organismos (NCBI). Además, se realizó el cultivo de microorganismos de las muestras en el momento de su compra.

De forma general se observó un aumento de la cantidad y diversidad de bacterias en las muestras sin refrigerar, confirmando que la cadena del frío retrasa el desarrollo de microorganismos en los alimentos, aumentando la vida útil de los mismos. Además, el estudio demuestra la eficacia de la secuenciación masiva del ADN_r16S para estudiar el efecto de la temperatura en el desarrollo de comunidades bacterianas sobre los alimentos.

Palabras clave: ARN_r 16S; secuenciación masiva; identificación bacteriana; alimentos; cadena del frío.

ABSTRACT: The cold chain is a key element in food safety since most microorganisms stop their growth at low temperatures. Techniques that analyse the bacterial populations of a sample by sequencing a fragment of the 16S ribosomal gene, allowing the microbial characterization of foods have been developed.

The objective of the present study was to identify and quantify bacteria on refrigerated and uncooled foods using massive sequencing of rDNA16S, to describe the role of maintenance of the cold chain on the evolution of microbial communities in food.

Thus, the DNA extracted from the samples was sequenced at 2d and 4d. The OTUs obtained were compared with those of the databases and identified. The culture of microorganisms of the samples was carried out at 0d.

In general, an increase in the amount and diversity of bacteria was observed in the uncooled samples, confirming that the cold chain delays the development of microorganisms in foods, increasing the shelf life of them. In addition, the study demonstrates the efficacy of the massive sequencing of rDNA16S to study the effect of temperature on the development of bacterial communities on food.

Key words: RNAr 16S; massive sequencing; bacterial identification; foods; chain of cold.

1. INTRODUCCIÓN

Durante siglos, la humanidad ha intentado evitar la descomposición de los alimentos cuando los almacenaba en períodos de abundancia para enfrentar la

escasez y la hambruna de los períodos menos abundantes. Desde la antigüedad se conocía que era posible prolongar considerablemente la duración de los alimentos conservándolos a bajas temperaturas, utilizando el frío natural (bodegas subterráneas, manantiales, nieve, hielo). Hoy en día se exploran nuevas tecnologías de conservación de alimentos. Recientemente, el grupo de investigación «Nuevas tecnologías de conservación y seguridad alimentarias» (NEWTEC) de la Universidad de León ha evaluado la efectividad del Plasma Atmosférico No Térmico (PANT) resultando ser una posible tecnología de primera elección para reducir el riesgo microbiológico en los alimentos.

Durante el almacenaje se producen modificaciones de los alimentos, que conducen finalmente a su descomposición, ya sea por procesos físicos, químicos, o biológicos. Así, la cadena del frío constituye un elemento clave en la seguridad alimentaria, ya que la mayoría de los microorganismos detienen su crecimiento a bajas temperaturas, reduciéndose la descomposición de los alimentos.

La forma tradicional de determinar el microbioma de los alimentos ha sido mediante métodos de cultivo. Sin embargo, este método presenta limitaciones, ya que el 99,8 % de los microorganismos no son cultivables, por lo que se ha demostrado repetidamente que no es confiable para la caracterización microbiana completa de muchos ecosistemas, incluidos los de los alimentos.

En las últimas décadas se han desarrollado técnicas de secuenciación masiva (NGS; *Next Generation Sequencing*) (Mayo *et al.*, 2014), siendo una de sus muchas aplicaciones el análisis de las poblaciones bacterianas de una muestra mediante la secuenciación de amplicones de un fragmento del gen ribosómico 16S, utilizado en identificación bacteriana por su secuencia altamente conservada. Se ha propuesto que procariontas, cuyo ARNr 16S tenga un 97 % o más de secuencias idénticas, es muy probable que pertenezcan a la misma especie. La amplificación selectiva de esta secuencia a partir del ADN genómico y la comparación de los resultados con bases de datos permite la identificación de los microorganismos (Vasek *et al.*, 2018).

Así, ya son muchos los estudios realizados con el objetivo de describir la composición microbiana de diferentes alimentos utilizando la secuenciación de ADN. Por ejemplo, Yu *et al.*, 2017, realizaron un estudio para determinar si la marinación de alimentos aumentaba la vida útil del producto y observaron que a veces, contrariamente a su uso previsto, el marinado aumenta la velocidad del deterioro. Por ejemplo, un producto de ave de corral se deterioró rápidamente tras su marinación con ácido acético. Al determinar la composición bacteriana del producto, utilizando secuenciación de amplicones del ADNr16S, observaron la presencia de *Leuconostoc gasicomitatum* (bacteria ácido-láctica), considerada como el microorganismo causante de la descomposición.

El objetivo del presente estudio consistió en la identificación y cuantificación de bacterias en distintos grupos de alimentos refrigerados y en condiciones de ausencia de frío, utilizando secuenciación masiva de amplicones del ADN_r16S, para describir el rol del mantenimiento de la cadena del frío sobre la evolución de comunidades microbianas en alimentos. Como variable de comparación, se llevó a cabo el cultivo de microorganismos a partir de muestras de alimentos recién comprados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

a) *Obtención de muestras*

Se obtuvieron muestras de pollo, espinacas embolsadas, queso fresco y yogur en un supermercado local para realizar el estudio sobre distintos grupos de alimentos perecederos, cuyas características hacen que sea necesario mantener la cadena de frío para su conservación.

Cada alimento se cortó en pequeñas piezas y fue dividido en cuatro partes acondicionadas en tubos Falcon estériles, identificándolos correspondientemente. Dos de estos se sometieron a refrigeración y los dos restantes fueron expuestos a temperatura ambiente. Una de las muestras refrigeradas y una de las muestras sin refrigerar de cada alimento fue sometida a congelación a -20 °C a los 2 d, para detener el crecimiento microbiano hasta su procesamiento. Se realizó el mismo procedimiento con las restantes muestras a los 4 d.

b) *Extracción y análisis de ADN*

Se extrajo ADN de las muestras congeladas a los tiempos indicados en el aparatado anterior utilizando 1 g del alimento correspondiente mediante el kit de extracción de ADN HigherPurity™Soil DNA (Canvax), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN purificado se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

c) *Evaluación del proceso de extracción y purificación del ADN*

El ADN aislado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Se preparó un gel de agarosa al 1 % en TAE 1X (Buffer Tris Acetate-EDTA) con bromuro de etidio (0,5 µg/mL). Se tomaron 3µL de cada muestra de ADN y se le añadieron 2 µL de frente de carga (azul de bromofenol y sacarosa). Los pocillos fueron cargados con 5 µL de muestra. Además, se aplicó un marcador de peso molecular (PGM 100 ng/µL). Finalmente se ejecutó la electroforesis a 100 V durante 45 min

y se observó y fotodocumentó el ADN en un transiluminador de luz ultravioleta. Se observó la presencia y calidad del ADN (ausencia de degradación).

d) *Amplificación del ADN_r16S mediante PCR*

Se comprobó la posibilidad de amplificación del ADN_r16S bacteriano a partir del ADN extraído, mediante PCR con oligonucleótidos universales para secuenciar el 16S bacteriano, según la metodología descrita por Saati-Santamaría, *et al.* 2018. El producto amplificado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa, siguiendo el procedimiento explicado en el apartado anterior y se comprobó la presencia de una banda correspondiente al gen del ADN_r16S por comparación con el marcador de pesos moleculares también cargado en el gel. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su envío al servicio de secuenciación de la Academia de las Ciencias Checa, donde se prepararon las librerías de secuenciación, los amplicones del gen ADN_r16S se secuenciaron en la plataforma Illumina MiSeq, siguiendo la metodología descrita por Žifčáková *et al.*, 2001.

e) *Análisis de datos*

Las secuencias de amplicones obtenidas fueron analizadas mediante la herramienta SEED 2 (Větrovský *et al.*, 2018). Las lecturas de pares se fusionaron usando fastq-join. Se detectaron secuencias quiméricas usando USEARCH, eliminándolas posteriormente. Secuencias con un 97 % de similitud se agruparon utilizando UPARSE, implementado dentro de USEARCH en diferentes OTUs (Operational Taxonomic Units). Se construyeron secuencias de consenso para cada clúster (de cada OTU), y aquellas más cercanas a un género o nivel de especie se identificaron usando BLASTn, utilizando la base de datos GenBank. Se eliminaron las secuencias identificadas como no bacterianas y las OTUs de secuencias únicas («singletons») (Žifčáková *et al.*, 2001).

f) *Preparación de medios de cultivo, siembra en placa y cultivo de microorganismos*

Se emplearon diferentes medios de cultivo presuntivos en función del microorganismo que se pretendía aislar (Tabla 1). Se prepararon 600 ml por cada medio, acondicionándolos en Placas Petri en una cabina de flujo laminar, las cuales se identificaron y conservaron bajo refrigeración hasta su uso.

Se prepararon 4 suspensiones (una por alimento) con 1 g de alimento fresco y 50 ml de agua estéril, manteniéndolas en agitación magnética durante 60 min. A partir de estas, se prepararon diluciones seriadas hasta 10⁻⁷ con agua estéril. A continuación, se transfirieron con una pipeta estéril 100 µl, de cada dilución a las

Placas Petri con los medios y se extendió con ayuda de un asa de Digiralsky. Se trabajó bajo un ambiente estéril.

Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 h. Bajo estas condiciones, no se observó crecimiento de microorganismos en el medio MRS, por lo que estas se incubaron 24 h más a 37 °C.

TABLA 1. Medios de cultivo empleados para el aislamiento de los microorganismos a tiempo 0.

Medio de cultivo	Microorganismo
Mannitol Salt Agar, CM0085, Oxoid Microbiology Products, Thermo Scientific	Aislamiento de estafilococos patógenos
Saboraud Glucose Agar with chloramphenicol, 89579, Sigma Aldrich	Aislamiento e identificación de hongos y levaduras
Brilliant Green Agar (modified), CM0329, Oxoid Microbiology Products, Thermo Scientific	Diagnóstico de salmonelas (además de <i>Salmonella entérica</i> serotipo Typhi) de alimentos
Violet Red Bile Lactose Dextrose Agar, CM0485, Oxoid Microbiology Products, Thermo Scientific	Detección de enterobacterias
Tryptic Soy Agar, 22091, Sigma Aldrich	Cultivo de bacterias mesófilas totales
MRS Agar (de Man, Rogosa, Sharpe), CM0361, Oxoid Microbiology Products, Thermo Scientific	Cultivo de bacterias ácido lácticas

g) Cálculo de las UFC/g de alimento

El cálculo y la expresión de los resultados se llevó a cabo siguiendo las normas ISO 7218:2007. El resultado se expresó como número de microorganismos por gramo, con un número entre 1,1 y 9,9 multiplicando por la potencia de 10 adecuada.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a) Análisis del ADN extraído

Se comprobó la presencia de ADN en todas las muestras, mientras que solo se pudo amplificar el ADN_{r16S} (banda de ~1500pb) en algunas de ellas. Sin embargo, se decidió enviar todas al servicio de secuenciación masiva, ya que los primers y condiciones de PCR para la amplificación de amplicones son diferentes.

b) *Recuento de bacterias*

El recuento en placa de las bacterias contenidas en los alimentos a tiempo cero se recoge en la Tabla 2.

TABLA 2. Recuento de UFC/g de alimento.

Alimento	Microorganismo aislado	UFC/g alimento
Pollo	Bacterias mesófilas totales	Número de microorganismos 1,6x 10 ⁵ por gramo
	Enterobacterias	Hay microorganismos presentes pero a un nivel inferior a 40 UFC por gramo
	<i>Staphylococcus</i>	Número estimado de microorganismos 3x 10 ⁴ por gramo
	Hongos filamentosos y levaduras	Menos de 100 UFC por gramo
	<i>Salmonella</i>	Número estimado de microorganismos 2x 10 ⁴ por gramo
Espinacas	Bacterias mesófilas totales	Número de microorganismos 2,5x 10 ⁴ por gramo
	Enterobacterias	Menos de 100 UFC por gramo
	<i>Staphylococcus</i>	Menos de 100 UFC por gramo
	Hongos y levaduras	Hay microorganismos presentes pero a un nivel inferior a 400 UFC por gramo
	<i>Salmonella</i>	Menos de 400 UFC por gramo
Queso	<i>Bacterias mesófilas totales</i>	Número de microorganismos 3,1x 10 ⁸ por gramo
	Enterobacterias	Menos de 100 UFC por gramo
	<i>Staphylococcus</i>	Hay microorganismos presentes pero a un nivel inferior a 40 UFC por gramo
	Hongos y levaduras	Número estimado de microorganismos 3,5x 10 ⁴ por gramo
	<i>Salmonella</i>	Menos de 100 UFC por gramo
	Bacterias ácido-lácticas	Número de microorganismos 5x 10 ⁶ por gramo
Yogur	Bacterias mesófilas totales	Menos de 100 UFC por gramo
	Enterobacterias	Menos de 100 UFC por gramo
	<i>Staphylococcus</i>	Menos de 100 UFC por gramo
	Hongos y levaduras	Menos de 100 UFC por gramo
	<i>Salmonella</i>	Menos de 100 UFC por gramo
	Bacterias ácido-lácticas	Número de microorganismos 4,9x 10 ¹⁰ por gramo

c) *Composición de la comunidad bacteriana*

La diversidad bacteriana se mide como el número de OTUs diferentes, mientras que el número de secuencias determina la cantidad de bacterias (Mayo *et al.*, 2014). Las Figuras 1 y 2 recogen los resultados de la secuenciación masiva.

De forma general, se observó un aumento de la cantidad de bacterias en las muestras sin refrigerar. También la diversidad suele ser menor en las muestras refrigeradas, a excepción del caso de pollo en el que, a los dos días, presenta una diversidad algo mayor cuando está refrigerado, probablemente porque alguna de las bacterias que se desarrolla a temperatura ambiente inhibe a algunas de las demás.

La detección presuntiva de enterobacterias en el pollo a partir del cultivo se confirmó al secuenciar *Proteus vulgaris*, *Hafnia alvei*, *Morganella psychrotolerans* (enterobacterias). Sin embargo, no hubo secuencias de estafilococos o salmonelas, microorganismos detectados presuntivamente en cultivo. En algunos estudios donde se ha evaluado la diversidad microbiana de la carne durante el almacenamiento se ha observado la presencia de bacterias pertenecientes a las familias *Enterobacteriaceae* y *Enterococcaceae*, y concretamente de *Pseudomonas spp.*, *Brochothrix thermosphacta*, *Clostridium spp.*, considerados como agentes de descomposición (Nieminen *et al.*, 2012; Fougry *et al.*, 2016; Filippis *et al.*, 2013). En nuestro trabajo se observó un aumento del número de estas bacterias en función del tiempo (más a los 4 d que a los 2 d) y en condiciones de ausencia de frío (más en los productos sin refrigerar que en los refrigerados). En las muestras de pollo también identificamos *Lactococcus lactis*, microorganismo adicionado a los cárnicos por su capacidad de producir nisina inhibiendo el crecimiento de microorganismos patógenos, prolongando así la vida útil del alimento (Ferrocino *et al.*, 2016).

En las espinacas, se secuenciaron *Proteus vulgaris*, *Hafnia alvei*, *Morganella psychrotolerans*, a diferencia de los resultados obtenidos en el cultivo. Sin embargo, coincide con el estudio de Leff *et al.*, 2013, en el cual identificaron una gran abundancia de *Enterobacteriaceae* en esta verdura. La diversidad bacteriana fue menor en las muestras refrigeradas que en las muestras sin refrigerar, hecho también observado en López-Velasco *et al.*, 2011, en el que, a través de secuenciación del ADNr 16S notaron una reducción de la diversidad bacteriana en espinacas refrigeradas. En el mismo estudio identificaron *Pseudomonas spp.* en este producto, también secuenciadas en nuestro trabajo. No se identificaron secuencias de *Salmonella spp.*, bacterias que presuntivamente se detectaron en el medio de cultivo.

En el queso se identificaron enterobacterias como *Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens*, *Proteus vulgaris*, además de bacterias ácido-lácticas: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus sp.*, *Carnobacterium divergen*, *Enterococcus faecalis*. En el cultivo no hubo crecimiento de las primeras, pero sí de las segundas. En la muestra QS4 (queso sin refrigerar 4 d) se identificó *Vibrio spp.*, microorganismo también secuenciado en el queso en el estudio de Delgado *et al.*,

2013, en el que también se identificó la presencia de *Streptococcus thermophilus*. En el mismo, se identificaron las especies *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Psychrobacter* como bacterias con alto potencial para contaminar líneas de procesamiento de queso deteriorando así el producto final. Estas bacterias también se secuenciaron en nuestro estudio en este producto.

Resulta llamativa la reducción significativa del número de taxones y secuencias en queso refrigerado 4 d (QR4). Podría relacionarse con los resultados de Yu *et*

FIGURA 1. Cantidad (n.º de secuencias) y diversidad (OTUs) en pollo y espinacas.

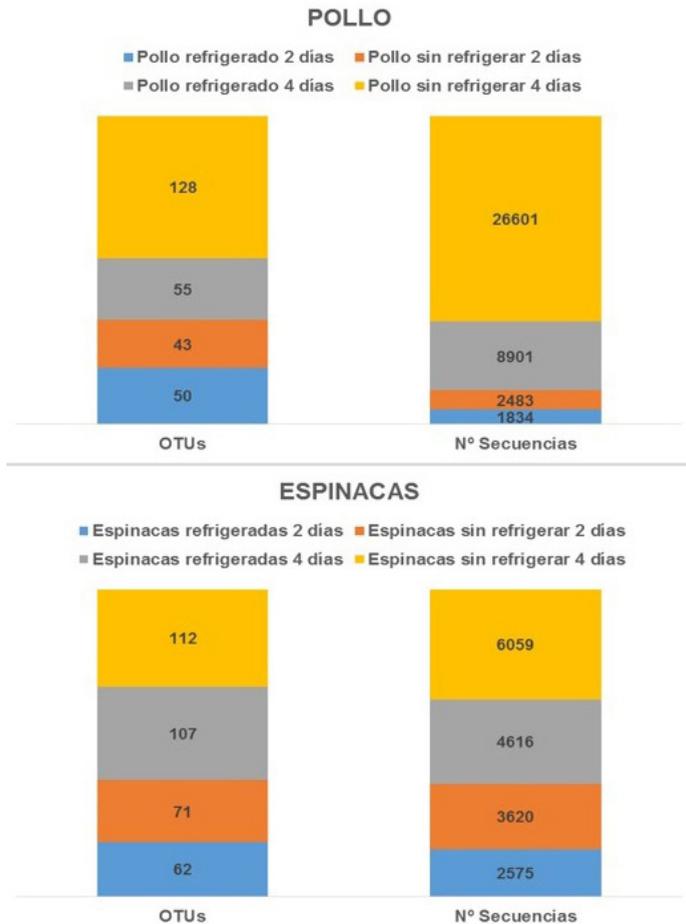
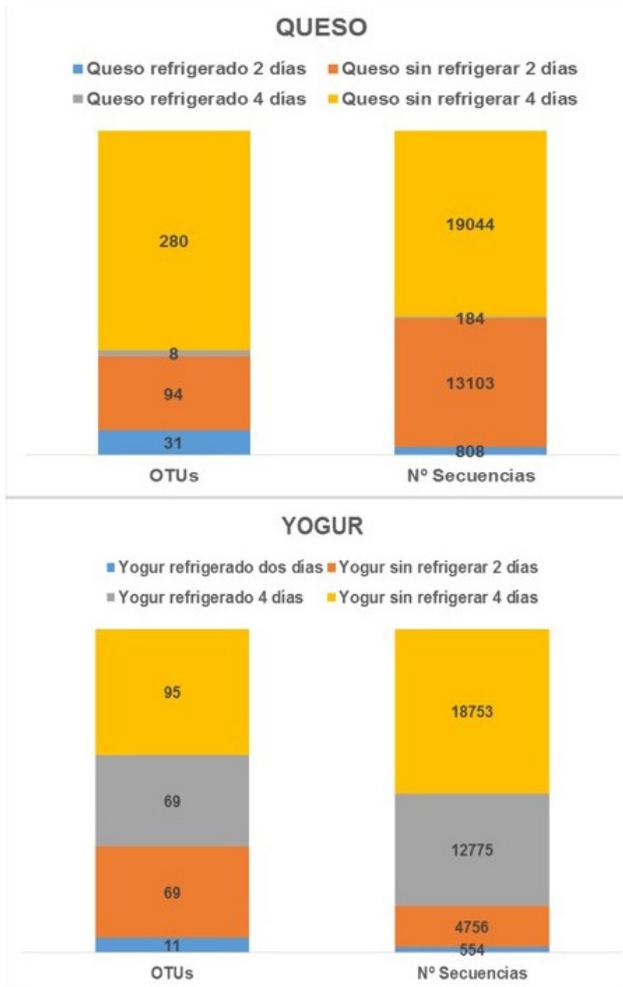


FIGURA 2. Cantidad (n.º de secuencias) y diversidad (OTUs) en queso y yogur.



al., 2017, quienes notaron una reducción de la diversidad bacteriana en alimentos refrigerados. Esto sería posible por la presencia de bacterias u hongos productores de algún compuesto antibacteriano que actuara inhibiendo el crecimiento del resto de microorganismos, como *L.lactis* (nisina) (Ferrocino *et al.*, 2016; Castro *et al.*, 2009; Beristain-Bauza *et al.*, 2012), detectado en QR4, o por el hecho de que algunas bacterias mueran por el frío.

En el yogur se secuenciaron bacterias ácido-lácticas tales como *Carnobacterium divergens*, *Lactococcus sp.*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus*, presentes también en el medio MRS. Los dos últimos son los agentes de la fermentación adicionados en la elaboración del yogur: *S. thermophilus* crece con mayor rapidez que *L. delbrueckii*, lo cual podría explicar el mayor número de secuencias identificadas del primero que del segundo en las cuatro muestras. Además, se detectaron multitud de bacterias no habituales en un yogur, lo que puede deberse a una contaminación de la muestra o a que, aunque el procedimiento de esterilización UHT de la leche elimina los microorganismos, no elimina su ADN, por lo que otra razón podría ser la secuenciación de estos restos de material genético (Vázquez *et al.*, 2014).

4. CONCLUSIONES

1. La secuenciación masiva de amplicones del ADNr16S constituye un método eficaz para estudiar el efecto de la temperatura en el desarrollo de comunidades bacterianas sobre los alimentos.
2. La cantidad y diversidad de microorganismos aumenta, de forma general, en los alimentos sin refrigerar, confirmando que la cadena del frío retrasa el desarrollo de microorganismos en los alimentos, aumentando así la vida útil de los mismos.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Beristain-Bauza SC, Palou E et López-Malo A. Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 2012; 6(2):64-78.
- Castro G, Valbuena E, Bríñez W, Sánchez E, Vera H, Tovar A. Comparación del empleo de nisina y cultivos de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, para la biopreservación de queso blanco. *FCV-LUZ*. 2009; 19(2):201-209.
- Delgado S, Rachid CT CC, Fernández E, Rychlik T, Alegría A, Peixoto RS, Mayo B. Diversidad de bacterias termófilas en leche cruda pasteurizada y cultivada selectivamente evaluada mediante cultivo de PCR-DGGE y pirosecuenciación. *Comida Microbiol*. 2013; 36:103-111.
- Ferrocino I, Greppi A., Latoria A., Rantsiou K., Ercolini D. Impacto de los envases activados con nisina en la microbiota de las hamburguesas de carne durante el almacenamiento. *Appl. Reinar. Microbiol*. 2016; 82:1-13.
- Filippis F, Storia A, Villani F, Ercolini D. Explorando las fuentes de los spoilers bacterianos en bistecs mediante secuenciación de alto rendimiento independiente del cultivo. *Microb. Biotechnol*. 2013; 10:91-102.

- Fougy L, Desmots M, Coeuret G, Fassel C, Hamon E, Hézard B. La reducción de la sal en las salchichas de cerdo crudas aumenta el deterioro y se correlaciona con la diversidad bacteriana reducida. *Appl. Reinar. Microbiol.* 2016; 82:3928-3939.
- Leff JW, Fierer N. Comunidades bacterianas asociadas con las superficies de frutas y verduras frescas. *PLOS ONE.* 2013; 8:59310.
- Lopez-Velasco G, Welbaum GE, Boyer RR, Mane SP, Ponder MA. Cambios en las comunidades de bacterias phylloepiphytic espinacas después de un procesamiento mínimo y almacenamiento refrigerado descrito mediante pyrosequencing de 16S rRNA amplicones. *J. Appl. Microbiol.* 2011; 110:1203-1214.
- Mayo B, Rachid CT, Alegría A, Leite AM, Peixoto RS, Delgado S. Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology. *Curr genomics.* 2014; 15(4):293-309.
- Nieminen TT, Koskinen K, Laine P, Hultman J, Säde E, Paulin L *et al.* Comparación de comunidades microbianas en carne de pollo marinada y no marinada mediante metagenómica. *En t. J. Food Microbiol.* 2012; 157:142-149.
- Saati-Santamaría Z, López-Mondéjar R, Jiménez-Gómez A, Díez-Méndez A, Větrovský T, Igual JM, Velázquez E, Kolarik M, Rivas R, García-Fraile P. Discovery of phloeophagus beetles as a source of *Pseudomonas* strains that produce potentially new bioactive substances and description of *Pseudomonas bohémica* sp. nov. *Frontiers in Microbiology.* 2018; 9(913).
- Vasek OM, Hebert EM, S. de Giori G, Raya R et Fusco AJV. Secuencia parcial del gen 16S rRNA de cepas constituyentes de un fermento para la elaboración de Queso Artesanal de Corrientes. UNNE.
- Vázquez W. Instrumentación y estandarización del proceso para la elaboración de yogurt mediante el monitoreo de las variables analíticas (pH y temperatura). Tesis doctoral. 2014.
- Větrovský T, Baldrian P, Morais D. SEED 2: a user-friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. *Bioinformatics.* 2018; 34(13):2292-2294.
- Yu C, Séamus F, Sínead P, Kieran J, Shabarínath S. A Review on the Applications of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food Related Microbiome Studies. *Front Microbiol.* 2017; 8:1829.
- Žifčáková L, Větrovský T, Howe A, Baldrian P. Microbial activity in forest soil reflects the changes in ecosystem properties between summer and winter. *Environ Microbiol.* 2016; 18(1):288-301.