



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**SELECCIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS
DE QUESO FRESCO QUE POSEEN EL SISTEMA CRISPR-CAS
COMO MECANISMO DE DEFENSA CONTRA
BACTERIÓFAGOS**

Por:

JOSÉ ISIDRO MÉNDEZ ROMERO

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

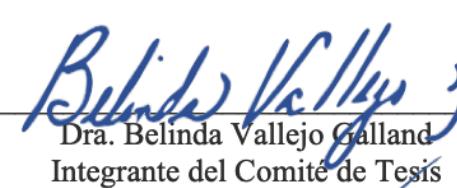
DOCTOR EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de José Isidro Méndez Romero, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias



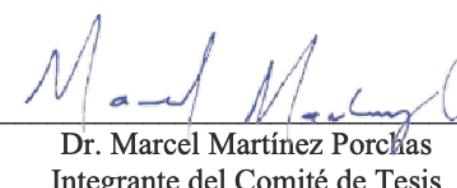
Dr. Aarón Fernando González Córdova
Director de Tesis



Dra. Belinda Vallejo Galland
Integrante del Comité de Tesis



Dr. Adrián Hernández Mendoza
Integrante del Comité de Tesis



Dr. Marcel Martínez Porchas
Integrante del Comité de Tesis



Dra. Sonia Guadalupe Sáyago Ayerdi
Integrante del Comité de Tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Selección de Bacterias Ácido Lácticas Aisladas de Queso Fresco que Poseen el Sistema CRISPR-Cas como Mecanismo de Defensa Contra Bacteriófagos” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, José Isidro Méndez Romero, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo prestado durante el posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD), por permitirme desarrollarme profesionalmente durante mi formación como Doctor en Ciencias y a la Coordinación de Programas Académicos del CIAD, por los apoyos económicos otorgados para realizar estancias y cursos académicos que favorecieron la culminación de este proyecto de investigación.

A mi Director de tesis, Dr. Aarón Fernando González Córdova, por la confianza y oportunidad de realizar este trabajo de tesis, por los consejos profesionales y tiempo brindado; y más allá de ello, externo un especial agradecimiento por ser mi mentor durante toda mi carrera profesional que me ha guiado para poder lograr mis metas académicas.

A los miembros del comité de tesis: Dra. Belinda Vallejo Galland, Dr. Adrián Hernández Medoza, Dra. Sonia Guadalupe Sáyago Ayerdi y Dr. Marcel Martínez Porchas, por todo su apoyo y dedicación en el presente trabajo. Agradezco a todos ustedes por haberme compartido sus valiosos conocimientos, que contribuyeron enormemente en mi formación académica.

A la M. en C. María del Carmen Estrada Montoya, por su apoyo técnico en el análisis proximal en el presente trabajo.

Al M. en C. Ricardo Reyes Díaz, por su apoyo y asesoramiento en los análisis estadísticos, en la redacción del presente manuscrito y por el apoyo en trabajo de campo durante el muestreo experimental.

Al Dr. Bruno Gómez Gil y a la M. en C. Karen Enciso Ibarra del CIAD Mazatlán, por su apoyo en los análisis bioinformáticos realizados para la caracterización de microbiota bacteriana.

Al Dr. Guillermo Pastor Palacios del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPICYT), por su apoyo en el análisis bioinformático general de los genomas de estudio.

A todos mis compañeros de laboratorio, con quienes compartí buenos momentos y de quienes me llevo mucho aprendizaje.

DEDICATORIA

A mis padres Ana María Romero Moyao e Isidro Méndez Nava y a mi
hermana Ana María Méndez Romero.

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	9
1. SINOPSIS.....	10
1.1. Justificación	10
1.2. Antecedentes	12
1.2.1. Quesería Artesanal en México	12
1.2.2. Quesos Artesanales de Sonora	14
1.2.3. Caracterización de la Microbiota Bacteriana en Quesos Artesanales.....	15
1.2.4. Aplicaciones de Bacterias Ácido Lácticas Aisladas de Quesos Artesanales.....	18
1.2.5. Generalidad de Bacteriófagos de BAL	19
1.2.5.1. Principales fuentes de contaminación de fagos.....	21
1.2.5.2 Mecanismos de infección de los fagos.....	21
1.2.5.3. Métodos para evitar la contaminación por fagos	22
1.2.6. Sistema CRISPR-Cas.....	25
1.2.6.1. Los arreglos CRISPR	26
1.2.6.2. Protoespaciadores y motivo adyacente al protoespaciador (PAM)	27
1.2.6.3. Proteínas asociadas al CRISPR	28
1.2.6.4. Mecanismo del sistema CRISPR-Cas	29
1.2.6.5. Consideraciones en la selección de BAL con CRISPR	30
1.3. Hipótesis	32
1.4. Objetivo General.....	32
1.5. Objetivos específicos	32
1.6. Sección integradora del trabajo	33
2. ARTISANAL FRESCO CHEESE FROM SONORA: PHYSICOCHEMICAL COMPOSITION, MICROBIAL QUALITY, AND BACTERIAL CHARACTERIZATION BY HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING	35
3. GENOMIC ANALYSIS OF THE CRISPR-CAS SYSTEM IN <i>Limosilactobacillus fermentum</i> STRAINS ISOLATED FROM MEXICAN ARTISANAL COCIDO CHEESE.....	48
4. CONCLUSIONES GENERALES	73
5. RECOMENDACIONES	74
6. BIBLIOGRAFÍA	75

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son muy valoradas debido a sus aplicaciones en tecnología de alimentos por conferir características sensoriales como sabor, aroma y textura; y además, es ampliamente documentado que pueden ejercer efectos benéficos a la salud. Una de las principales fuentes de aislamiento de las BAL son los quesos artesanales como los quesos genuinos mexicanos, tal es el caso de los quesos Fresco y Cocido de Sonora, que son considerados como quesos frescos por no incluir a la maduración en su proceso de manufactura. Por otro lado, las capacidades de las BAL pueden verse afectadas por distintos factores como el ataque de bacteriófagos, los cuales son capaces de matarlas o afectarlas a nivel genético pudiendo comprometer su desempeño como cultivos lácticos. Afortunadamente, algunas BAL pueden poseer el sistema CRISPR-Cas que es uno de los mecanismos más robustos que les permite generar y heredar la resistencia contra fagos. Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la presencia y actividad del sistema CRISPR-Cas como mecanismo de defensa contra bacteriófagos en BAL de interés tecnológico, aisladas de queso fresco. Para ello, se llevó a cabo una caracterización fisicocoquímica y microbiológica del queso fresco artesanal de acuerdo a metodologías estándar y se aplicó secuenciación masiva para caracterizar la microbiota bacteriana con la finalidad de encontrar las BAL representativas de este tipo de productos. Con base en ello, mediante análisis bioinformático se estudió el sistema CRISPR-Cas de cepas específicas, seleccionadas por sus capacidades tecnológicas demostradas. Los resultados fisicoquímicos y microbiológicos mostraron una alta variabilidad composicional y presencia de diversos grupos bacterianos, lo cual evidencia la falta de estandarización de procesos y de aplicación de buenas prácticas de manufactura. Los géneros de BAL más representativos fueron *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. El análisis de los genomas de dos cepas de *Limosilactobacillus fermentum* evidenció que estas poseen dos locus CRISPR-Cas cada una (tipos I-E y II-A), que poseen todos los elementos necesarios para su funcionamiento. Asimismo, el análisis de los espaciadores CRISPR-Cas permitió determinar que la mayoría corresponden a bacteriófagos específicos de *Limosilactobacillus fermentum* y en menor medida a plásmidos bacterianos. Por lo anterior, con el presente estudio, se logró revelar la presencia del sistema CRISPR-Cas en las cepas de *Limosilactobacillus fermentum* seleccionadas, el cual podría utilizar

para generar resistencia ante la infección por fagos, manteniendo su viabilidad para ser empleadas en el diseño de cultivos iniciadores con aplicaciones tecnológicas específicas.

Palabras claves: Bacterias ácido lácticas, secuenciación de alto rendimiento, CRISPR-Cas, bacteriófagos

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are recognized due to their applications in food technology for conferring sensory characteristics such as flavor, aroma and texture, and by exerting beneficial health effects. One of the main sources of LAB isolation are artisanal products such as genuine Mexican cheeses, e.g. Fresco and Cocido from Sonora, which are considered fresh cheeses because they do not include ripening in their cheese manufacturing. On the other hand, the LAB capacities can be affected by different factors such as the attack of bacteriophages, which may kill them or affect their genetic, compromising their performance as starter cultures. Fortunately, some LAB may possess the CRISPR-Cas system, which is one of the most robust mechanisms that allows them to generate and inherit resistance against phages. Thus, the objective of this work was to determine the presence and activity of the CRISPR-Cas system as a defense mechanism against bacteriophages in BAL of technological interest, isolated from fresh cheese. For this, a physicochemical and microbiological characterization of the artisanal fresh cheese was carried out according to standard methodologies and massive sequencing was applied to characterize the bacterial microbiota in order to find the BAL representative of this type of products. Based on this, the CRISPR-Cas system of specific strains with demonstrated technological capabilities, was studied by bioinformatic analysis. The physicochemical and microbiological results showed a wide variability, revealing the lack of standardized processes and application of good manufacturing practices. The most representative BAL genera were *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Leuconostoc*. The analysis of the genomes of two strains of *Limosilactobacillus fermentum* showed that they possess two CRISPR-Cas loci each (types I-E and II-A), which accomplish the necessary elements for their operation. Likewise, the analysis of the CRISPR-Cas spacers allowed to determine that correspond to specific bacteriophages of *Limosilactobacillus fermentum* and bacterial plasmids. Therefore, the present study revealed the presence of the CRISPR-Cas system in the selected *Limosilactobacillus fermentum* strains, which could confer them resistance against to a phage infection, maintaining their viability to be used in the starter cultures design with specific technological applications.

Key words: Lactic acid bacteria, high throughput sequencing, CRISPR-Cas, bacteriophage

1. SINOPSIS

1.1. Justificación

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos perteneciente a diferentes rangos taxonómicos, las cuales son generalmente reconocidas como seguras y tienen diversas aplicaciones tecnológicas en la industria de alimentos. La principal cualidad de las BAL es su capacidad de generación de ácido láctico mediante procesos fermentativos, a partir de los carbohidratos de la leche (Parente *et al.*, 2016). Las BAL, además de conferir características sensoriales deseables en alimentos como sabor, aroma y textura, pueden generar beneficios a la salud por su capacidad probiótica, así como la producción de compuestos antimicrobianos y péptidos con capacidad antihipertensiva, inmunomoduladora y antioxidante, entre otras. Estas cualidades son generalmente cepa-dependiente, lo que implica que cepas pertenecientes a la misma especie pueden tener diferentes capacidades (Colombo *et al.*, 2020). Esto favorece el incremento de estudios a cepas específicas de BAL, las cuales llegan a ser muy valiosas cuando poseen múltiples capacidades, útiles para el diseño de alimentos funcionales.

Algunos estudios se han enfocado en la búsqueda de cepas de BAL nativas aisladas de diferentes nichos ecológicos, como lo son los quesos artesanales (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2008; Heredia-Castro *et al.*, 2015). En México, los quesos artesanales son tradicionalmente elaborados a partir de leche cruda mediante procesos no estandarizados, por lo cual son una fuente importante de BAL (González-Córdova *et al.*, 2016). Por ello, diferentes grupos de investigación se han enfocado en la caracterización de la microbiota nativa de los quesos artesanales, lo cual puede contribuir a detectar aspectos importantes de su calidad sanitaria y además conocer los grupos de BAL potencialmente aislables a partir de estos productos. Particularmente en Sonora, México, se conoce que se elaboran principalmente cuatro tipos de quesos artesanales que son el *Fresco*, *Cocido*, *Quesadilla* y el *de Zarzo* que también es conocido como *Oreado* (Hernández, 2012; Ochoa, 2016). Todos ellos considerados como quesos frescos por no incluir un periodo de maduración en sus procesos de manufactura. Dentro de este grupo, los quesos Fresco y Cocido son los más populares, ya que son los más altamente comercializados y consumidos en todo el estado. En el Laboratorio

de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD) de Hermosillo, Sonora, se han estudiado diversos quesos artesanales mexicanos y BAL específicas aisladas de estos productos. Es importante mencionar que hasta el momento, a diferencia del queso Cocido, no se ha reportado la caracterización fisicoquímica y microbiológica del queso Fresco artesanal de Sonora, lo cual es necesario para poder exponer los grupos de BAL nativas que pudieran representar una gran oportunidad de importancia tecnológica y científica.

Hoy en día, la secuenciación de alto rendimiento es una de las herramientas más robustas para el análisis de la microbiota en cualquier muestra. Así, el estudio de microbiota mediante esta técnica puede permitir conocer la identidad de todos los entes biológicos presentes en el queso mediante un análisis metagenómico. También puede dirigirse a grupos específicos de microorganismos como las BAL mediante la secuenciación del gen 16S (Mayo *et al.*, 2021). Por lo cual, esta técnica resulta, actualmente, la mejor opción para el estudio de la microbiota de quesos artesanales.

Por otro lado, estudios específicos se enfocan en dilucidar las diferentes capacidades de las bacterias para determinar sus posibles aplicaciones tecnológicas, las cuales pueden verse afectadas por factores determinantes, como es el caso de los bacteriófagos, que son los virus que infectan a las bacterias y afectan su viabilidad y funcionalidad (Neve *et al.*, 1992; Quibroni, 2011; Pujato *et al.*, 2018). Por lo tanto, la presencia de estos fagos, representan un grave problema en los procesos de elaboración de alimentos cuando se emplean cultivos microbianos como ingredientes para su elaboración, como en el caso de los quesos. Estos virus son capaces de lisar a las BAL, matándolas y afectando el rendimiento del proceso o incluso generando la pérdida de lotes enteros de producción, lo cual se refleja en pérdidas que puede ascender a altas pérdidas económicas proporcionales al nivel de producción de cada empresa o inclusive llevar a la pérdida de lotes enteros de producción (Briggiler-Marcó y Mercanti, 2021). Lo anterior es particularmente preocupante considerando que estos virus son muy difíciles de eliminar, ya que son ubicuos e inclusive algunos pueden resistir procesos térmicos intensos como la pasteurización (Clokie *et al.*, 2011; Pujato *et al.*, 2018).

Por lo anterior, una de las alternativas es el empleo de bacterias que posean mecanismos de resistencia contra bacteriófagos y uno de ellos es el sistema CRISPR-Cas, que se ha reportado ser uno de los sistemas más robustos que permite la generación de resistencia específica contra los bacteriófagos y otros agentes genéticos móviles, que intenten infectar o entrar a la célula bacteriana

y que además genera una respuesta rápida ante un intento subsecuente de infección (Barrangou, 2007). Adicionalmente, el sistema CRISPR-Cas permite la “vacunación” de las BAL que lo poseen, es decir se pueden seleccionar el grupo de agentes genéticos, como fagos específicos, ante los cuales se necesita que la cepa adquiera resistencia (Dupuis *et al.*, 2015). Asimismo, esta posibilidad de interactuar con el sistema CRISPR-Cas de la bacteria, ha ido más allá y ha permitido reutilizar estos sistemas para que la bacteria modifique a conveniencia su propio genoma (Crawley *et al.*, 2018). Lo cual, abre la puerta al mejoramiento de estas cepas, por ejemplo, a través de la eliminación de genes indeseados, usando el propio mecanismo bacteriano para dicho fin.

Sin embargo, no todas las BAL poseen el sistema CRISPR-Cas y no todas las que lo poseen lo presentan activo, incluso pueden encontrarse diferencias entre bacterias pertenecientes a la misma especie (Mills *et al.*, 2010). Por lo tanto, es importante buscar y seleccionar a las BAL de importancia tecnológica que posean el sistema CRISPR-Cas. Un paso fundamental en el estudio de este sistema y de las BAL en general, es la secuenciación de su genoma completo, el cual se realiza actualmente mediante secuenciación de alto rendimiento (Roberts y Barrangou, 2020). La información genómica obtenida debe ser analizada mediante programas bioinformáticos especializados para la búsqueda y caracterización de los elementos del sistema CRISPR-Cas, de manera que se establezca su potencial participación en la defensa contra bacteriófagos en las cepas de estudio (Zhang *et al.*, 2020).

1.2. Antecedentes

1.2.1. Quesería Artesanal en México

Los quesos artesanales mexicanos son alimentos altamente consumidos en México, siendo más famosos y deseados por los consumidores que cualquier queso elaborado de manera industrial (González-Córdova *et al.*, 2016). De esta manera, la producción de quesos genuinos mexicanos es comparable con la generada por la industria del sector lácteo, lo que demuestra contundentemente la gran relevancia económica de la quesería artesanal mexicana (Pomeón y Cervantes, 2008; FIRA,

2015). Los factores constantes en sus procesos de elaboración son la baja o nula presencia de aditivos así como el empleo de leche cruda, la cual es la principal fuente de microorganismos que proliferan en la leche y el queso, generando un proceso de fermentación que tiene como consecuencia la degradación de los componentes de la cuajada durante el proceso de elaboración del queso (Montel *et al.*, 2014). La manufactura de estos quesos se ha adaptado a las condiciones tecnológicas, culturales y económicas regionales, en donde forman parte importante de la historia y cultura gastronómica que los vuelve un ingrediente esencial en platillos típicos mexicanos (González-Córdova *et al.*, 2016).

En México se han reportado más de 40 diferentes tipos de quesos artesanales genuinos, los cuales, en su mayoría, están registrados en compendios de quesos elaborados por Van Hekken *et al.*, 2003, Villegas, (2014) y González-Córdova, *et al.* (2016). Donde además se destacan sus procesos de elaboración típicos, historia y regiones de origen, e incluso se mencionan algunos de los principales grupos de bacterias que les proveen de sus tan apreciadas características que los tipifican.

Diversas investigaciones enfocadas en la caracterización de los procesos de elaboración de los quesos artesanales mexicanos (De Oca-Flores *et al.*, 2009; Heredia, 2012; Cuevas-González *et al.*, 2017; Aldrete-Tapia *et al.*, 2018) que conllevan el análisis de las diferentes etapas de elaboración, tales como la leche, el suero lixiviado de la cuajada, la cuajada, el queso como producto e incluso los cambios que puedan darse durante su periodo de almacenamiento en el anaquel, siendo la composición fisicoquímica y microbiológica los parámetros básicos considerados en su caracterización (Heredia, 2011; Rangel, 2011; Tunick *et al.*, 2012; Cuevas-González *et al.*, 2017; Valenzuela, 2018; De la Rosa-Alcaraz *et al.*, 2020).

Dichos estudios han sentado las bases para su permanencia y comercialización en mayor escala, así como determinar la seguridad de su consumo y detectar las posibles oportunidades de mejora (Cervantes, 2008; González-Córdova *et al.*, 2016). Además, estos estudios pueden ayudar a superar problemas que les imposibiliten la obtención de figuras jurídicas de protección en su comercialización como el logro de una denominaciones de origen (DO) o una marca colectiva como es el caso del Cotja región de origen, los quesos Bola de Ocosingo y Crema de Chiapas y el queso Poro de Balancán (Agudelo-López *et al.*, 2021). En todo caso, para lograr estos objetivos se necesita también del esfuerzo y organización por parte de los productores de queso para intentar estandarizar sus procesos incluyendo un programa de implementación de buenas prácticas de manufactura (Cuevas-González *et al.*, 2017).

1.2.2. Quesos Artesanales de Sonora

El territorio de Sonora está compuesto principalmente por desiertos semiáridos y praderas, los cuales son atravesados por la sierra madre occidental, cuyo clima predominante suele ser muy extremo, llegando a presentar temperaturas mínimas de 0°C en las zonas de la sierra y de hasta 50 °C en gran parte del estado, como es el caso de Hermosillo, que es la capital de la entidad con uno de los principales centros de comercialización de los quesos artesanales (Martínez-Yrízar, 2009). Se ha reportado que las características del ecosistema de las zonas de producción de los quesos artesanales afectan considerablemente la microbiota, las características de la materia prima y por consiguiente sus características que los tipifican (Villegas y Cervantes, 2011; Van Reckem, *et al.*, 2019).

La quesería artesanal en Sonora es una actividad de gran relevancia en la zona centro del estado, destacando los municipios de Ures, Ímuris, Rayón y Mazatlán, tanto que este último cuenta con una estatua a familia productora de queso en la entrada de la población como representación de la importancia que tiene dicha actividad económica en la región (Heredia, 2011; Hernández, 2012; Cuevas-González *et al.*, 2017). Estas regiones corresponden a una gran concentración de queserías artesanales de facto, que comparten un origen, tradiciones, su saber-hacer quesero, un perfil sociodemográfico así como algunos rasgos similares de su ecosistema el cual corresponde a la zona de transición de la zona entre la Sierra Madre Occidental y la costa sonorense (Hernández, 2012; Villaseñor, 2016).

La producción de queso artesanal en Sonora se realiza principalmente por unidades rurales familiares y se calcula que el 58% de la leche de Sonora se destina para la producción de queso. A la fecha, no se cuenta con una estimación precisa actualizada de producción de queso artesanal en Sonora debido a la presencia de diversas micro empresas artesanales que no se encuentran oficialmente registradas; sin embargo, se reporta que en el 2012 se produjeron 3 millones de kilos de queso artesanal (Hernández *et al.*, 2012; Villaseñor, 2016). La distribución de estos quesos se maneja en venta directa en las propias viviendas de los queseros, en las tiendas de abarrotes y mercados locales de la misma región o de las ciudades de Obregón y Hermosillo, principalmente (Ochoa, 2016; Villaseñor, 2016).

Los quesos artesanales más representativos de Sonora son el Fresco, el Cocido, Quesadilla de Ímuris (también llamado tortilla) y el queso de Zarzo (también llamado Oreado), los cuales son

cosiderados como quesos frescos al no contar con un periodo de maduración en su proceso de elaboración. De estos cuatro, los más populares son el queso Fresco y el Cocido, los cuales están fuertemente vinculados a la gastronomía del estado formando parte de platillos como el caldo de queso, las quesadillas, acompañando la carne asada, enchiladas tostadas, chimichangas, entre otros (Hernández, 2012; Villaseñor, 2016; Ochoa, 2016).

Una particularidad muy importante del queso Fresco de Sonora es que lleva un proceso básico artesanal que resulta en una cuajada salada y desuerada elaborada a base de leche cruda de ganado destinado para la producción de carne, cuya crianza se lleva a cabo en un ambiente muy árido, el cual es un factor determinante sobre la composición de la leche y, en consecuencia, influye en gran medida sobre las características típicas del producto (Hernández, 2012; Villaseñor, 2016). Por su parte, el queso Cocido también goza con gran aceptación entre los consumidores del noroeste de México y también es considerado un queso fresco por no contar con un proceso de maduración; sin embargo, también se clasifica como un queso de pasta cocida al incluir la aplicación de un tratamiento térmico a la cuajada. Además, la composición de este producto permite considerarlo como un queso de cuajada semidura-blanda, y de textura lisa tipo filata que tiene la propiedad de fundirse cuando se calienta. Sobre su proceso de elaboración de manera artesanal no se emplea leche pasteurizada y su acidificación se realiza adicionando suero fermentado y a su vez, la proteína es precipitada con la ayuda de la adición de cuajo natural y/o comercial. Así mismo, existe información que evidencia la comercialización del queso Cocido elaborado a partir de leche pasteurizada y con procesos semitecnificados que incluyen la adición de cultivos microbianos y el empleo de ácido cítrico como agente acidificante (Heredia, 2011).

1.2.3. Caracterización de la Microbiota Bacteriana en Quesos Artesanales

La caracterización de microorganismos consiste en buscar patrones metabólicos o genéticos que son únicos en los organismos de estudio y los relacionan o diferencian de otros. Actualmente, estos análisis son realizados mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo, y especialmente una mezcla de ambos, lo cual permite una mejor caracterización de las poblaciones microbianas (Gonçalves, *et al.*, 2017; Perin *et al.*, 2017).

Las técnicas dependientes requieren del conocimiento de los factores de crecimiento que permiten

propagar y aislar los microorganismos de interés, lo que impide aislar aquellos que se encuentran fisiológicamente viables de cuales no se conocen sus características necesarias para su aislamiento (Kumar y Ghosh, 2019). Actualmente, el análisis de la microbiota de quesos mediante técnicas dependientes de cultivo se enfoca principalmente en el análisis de la calidad microbiológica (Cuevas-González *et al.*, 2017), así como para el aislamiento e identificación de cepas de interés tecnológico, principalmente BAL (Gutiérrez -Méndez *et al.*, 2010; Renye *et al.*, 2011; Heredia-Castro *et al.*, 2015). Anteriormente, se identificaban las cepas aisladas mediante su patrón de fermentación de carbohidratos (Torres-Llanez *et al.*, 2006), después se solían identificar mediante cebadores específicos para género y especie (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2010) y desde hace unos años a la fecha se identifican, principalmente, mediante secuenciación de Sanger (Renye *et al.*, 2011; Heredia-Castro *et al.*, 2015).

Las técnicas independientes de cultivo permiten analizar la microbiota de los quesos sin la necesidad de aislar a los microorganismos, por lo cual ofrecen un panorama mucho más amplio de su población microbiana que las técnicas dependientes de cultivo. Estas técnicas tienen como la fundamento la amplificación de regiones específicas de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual ha sido acoplada a una gran diversidad de técnicas de análisis del producto PCR. Algunas de estas técnicas son la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) (Rangel, 2012; De la Rosa, 2013; Ortíz, 2014), PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR), el análisis de polimorfismos conformacionales en una cadena sencilla (SSCP) y la secuenciación de alto rendimiento (HTS), siendo esta última la más importante para este tipo de estudios en la actualidad. Mediante las técnicas antes mencionadas se han identificado los géneros representativos de la microbiota de diferentes quesos artesanales en el mundo (Mayo *et al.*, 2021).

La HTS puede utilizarse para identificar a todas las comunidades microbianas en las muestras, mediante el análisis metagenómico, con el cual se secuencia todo el material genético presente en las muestras analizadas (Escobar-Zepeda *et al.*, 2016). Estos estudios son conocidos como análisis metagenómicos o de escopeta que en México han sido utilizados para el análisis del queso Cotija (Escobar-Zepeda *et al.*, 2016). Por otra parte, la HTS también puede dirigirse a grupos específicos de microorganismos como levaduras o bacterias, lo cual se logra amplificando mediante PCR sus genes marcadores, como 16S o 18S, respectivamente. Estos estudios se conocen como análisis metagenómicos dirigidos. Los análisis metagenómicos dirigidos al gen 16S para la identificación de la microbiota

bacteriana son algunos de los estudios actuales mayormente encontrados en la literatura (Mayo *et*

al., 2021). Algunos quesos artesanales mexicanos analizados mediante esta técnica son el queso Poro de Balancan (Aldrete-Tapia *et al.*, 2014), Bola de Ocosingo (Aldrete-Tapia *et al.*, 2018), entre otros (Murugesan *et al.*, 2018).

Algunas de las plataformas de HTS que se ha utilizado son: Ion Torrent de ThermoFisher en la que se realiza la secuenciación la mediante la detección de protones liberados durante el proceso de polimerización del ADN, Roche 454 GS de Roche, que usa la pirosecuenciación mediante la cual se determina la secuencia ADN a través de la detección del pirofosfato liberado durante la síntesis del ADN, e Illumina que emplea la detección de nucléotidos marcados cuando son incorporados a una nueva cadena de ADN de la muestra. Las plataformas de Illumina son una de las más extendidas actualmente en la HTS en el mundo (Cao *et al.*, 2017; Mayo *et al.*, 2021).

El análisis de la microbiota bacteriana de los quesos artesanales es útil para determinar la calidad sanitaria de los productos, lo cual puede servir como referencia para instar al reforzamiento de buenas prácticas de manufactura. Asimismo, es posible estudiar la dinámica poblacional bacteriana durante las diferentes etapas del proceso de elaboración del queso, permitiendo establecer posibles asociaciones con taxones microbianos específicos en cada etapa. También, contribuye a la identificación de bacterias de interés tecnológico que puedan ser potenciales cultivos lácticos para la estandarización de procesos de quesos artesanales (Cuevas-González *et al.*, 2017).

Particularmente, los quesos Fresco y Cocido de Sonora presentan características en común; por ejemplo, son tradicionalmente elaborados a partir de leche cruda, no cuentan con estandarización de sus procesos, no aplican buenas prácticas de manufactura y presentan una alta humedad. Todo ello, los vuelven productos muy susceptibles de contaminación por microorganismos, dentro de los cuales podemos encontrar poblaciones microbianas como las BAL que le imparten características deseables (Torres-Llanez *et al.*, 2006; Renye *et al.*, 2008).

A diferencia del queso Fresco de Sonora, el queso Cocido ha sido materia de estudio en diversas investigaciones que incluyen capacidades específicas de sus poblaciones bacterianas, encontrándose resultados importantes por su potencial probiótico y producción de compuestos con actividades antioxidantes, antimicrobianas, inmunomoduladora y responsables del sabor y aroma, entre otros (Reyes-Diaz *et al.*, 2018; Santiago-Lopez *et al.*, 2018a; Santiago-Lopez *et al.*, 2018b Heredia-Castro *et al.*, 2015; 2021). Todo lo anteriormente mencionado, hacen que estos quesos sean productos de gran interés de científico para la caracterización de su microbiota nativa.

1.2.4. Aplicaciones de Bacterias Ácido Lácticas Aisladas de Quesos Artesanales

Las BAL son microorganismos unicelulares procariotas caracterizadas como grampositivas, ácido tolerantes, su morfología puede ser de cocos, bacilos o de bacilos bifurcados y no son esporulantes. Son un grupo de microorganismos pertenecientes a diferentes géneros y especies de gran interés tecnológico en la industria de alimentos (Pfeiler y Klaenhammer 2007). Estas bacterias suelen ser benéficas para la salud del humano por lo cual han sido categorizadas como *generalmente reconocidas como seguras* (GRAS, por sus siglas en inglés, aunque sus beneficios atribuibles deben ser comprobados, ya que estos son cepa dependiente (Colombo *et al.*, 2020).

Las BAL son frecuentemente asociadas a los productos lácteos, no obstante, pueden ser encontrados en otras fuentes, tales como carnes y vegetales fermentados, así como mucosas humanas. La principal característica por la cual son conocidas las BAL es su capacidad de generar ácido láctico mediante la fermentación, con lo cual, en algunos casos otorgan características deseables en los alimentos. Además, la disminución de pH, derivada de la producción de ácido, puede generar un efecto antagónico contra microorganismos patógenos en los alimentos (Parente *et al.*, 2017). La materia prima y el tipo de proceso de elaboración tienen fuerte influencia en las características sensoriales (Bonanno *et al.*, 2013). Sin embargo, la interacción entre las BAL y los componentes de la leche en la elaboración de productos lácteos es un factor preponderante en la generación de las características sensoriales deseables del producto (Burgain *et al.*, 2014). Sin embargo, esto es solo una de sus múltiples aplicaciones en la elaboración de diferentes alimentos, así como en el diseño de nuevos alimentos funcionales benéficos a la salud.

El Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD) tiene un cepario de BAL aisladas de quesos artesanales mexicanos, tales como el queso Poro de Tabasco, Crema de Chiapas y Cocido de Sonora.

Actualmente, se han hecho grandes avances científicos en la selección de BAL aisladas de quesos artesanales mexicanos con la finalidad de determinar su potencial uso como cultivos iniciadores (Torres-Llanez *et al.*, 2006), su capacidad de generar aromas deseables (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2008; Reyes-Díaz *et al.*, 2020), generación de compuestos antimicrobianos (Heredia-Castro *et al.*, 2015). Incluso la caracterización de estas BAL se ha llevado hasta el estudio de su efecto probiótico e inmunomodulador (Reyez-Díaz *et al.*, 2018; Santiago-López *et al.*, 2018a; Santiago-López *et al.*, 2018b). Adicionalmente, se ha estudiado el efecto postbiótico de diferentes BAL, los cuales han

demonstrado que se pueden obtener beneficios de las BAL incluso después de su lisis, debido al contenido intracelular (Vallejo-Córdova *et al.*, 2020). Dentro de estas cepas, las que tienen mayor cantidad de estudios que respaldan sus capacidades son las aisladas del queso Cocido. Todos estos estudios remarcán la importancia de las BAL aisladas de quesos artesanales y enmarca a estos productos como una fuente invaluable de este tipo de microorganismos.

Las cepas de *Limosillactobacillus fermentum* J20 y J28, que son parte de las cepas aisladas de queso Cocido artesanal de Sonora por Heredia-Castro *et al.* (2015), han mostrado capacidades como potencial probióticas, productoras de ácido gamma amino butírico y por producir péptidos con actividad antimicrobiana e inmunomoduladora (Reyes-Díaz *et al.*, 2018; Santiago-López *et al.*, 2018a; Santiago-López *et al.*, 2018b; Santos-Espinosa *et al.*, 2020), por lo que presentan un alto potencial para su uso como cultivos lácticos que ejercen efectos benéficos a la salud, así como para futuras investigaciones científicas que devuelven nuevas potenciales aplicaciones. Sin embargo, la mayoría de sus aplicaciones requieren que estas cepas se encuentren viables, ya que su utilidad radica en sus capacidades metabólicas y fisiológicas (Pfeiler y Klaenhammer 2007)

1.2.5. Generalidade de bacteriófagos de BAL

Los factores que afecten la viabilidad de las BAL deben ser extensamente estudiados para evitar problemas en su desempeño en elaboración de alimentos, lo cual podría repercutir en cuantiosas pérdidas a nivel industrial. Una manera de explicar este problema es, por ejemplo, su aplicación como probióticos en donde dicha capacidad está en función de la concentración bacteriana suministrada. Asimismo, como cultivos lácticos, en donde su proliferación en la leche favorece la generación de ácidez, una reducción en su población podría realentar los procesos de elaboración de productos lácteos. Algunos de esos factores son antibióticos o sanitizantes presentes en la materia prima, el antagonismo con otras bacterias, el sistema lactoperoxidasa y los leucocitos (Jeantet, 2016). Por otro lado, está ampliamente demostrado que uno de los principales factores que afecta la viabilidad de las BAL es la presencia de bacteriófagos, también conocidos como fagos. Son entes biológicos capaces de multiplicarse en las bacterias lisándolas en el proceso, lo que puede llevar a una severa disminución de la población de BAL afectando el proceso en donde sean utilizadas (Murphy, 2017).

Los fagos, son los virus que infectan a las bacterias y a diferencia de cualquier microorganismo no poseen organelos, ni la capacidad de reproducirse por sí mismos. Hasta donde se tiene conocimiento, son las entidades biológicas más abundantes en nuestro planeta superando a las bacterias en una proporción que se estima de 10 a 1 (Clokie *et al.*, 2011; Pujato *et al.*, 2018). Contienen ácidos nucleicos, generalmente ADN de doble cadena, que se encuentra protegido por una capa de proteínas y en algunos casos, también con una capa de lípidos (Quibroni, 2011). No son capaces de reproducirse por sí mismos, por ello, utilizan la maquinaria celular bacteriana para llevar a cabo este proceso, lo que termina con la destrucción de la bacteria o la alteración de su estabilidad genética (Murphy, 2017).

Las cepas en donde se reproducen los fagos son llamadas hospedadoras, mientras que, en este contexto, el fago suele llamarse hospedero (Pujato *et al.*, 2018). De esta manera, las cepas hospedadoras de un fago son conocidas a su vez como cepas sensibles, en referencia a la susceptibilidad de ser infectadas. El rango de cepas que un fago puede infectar o rango de hospederos suele ser muy específico, restringiéndose a integrantes de un mismo género, especie o incluso a nivel de cepa (Capra *et al.*, 2006; Kutter, 2009). Por otro lado, muchos fagos son dependientes de iones monovalentes o divalentes para llevar a cabo del proceso infectivo, dichos iones son obtenidos a partir Calcio⁺² o Magnesio⁺¹ del medio (Mahony *et al.*, 2015).

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) considera que todos los fagos de las BAL son fagos con cola y miembros del orden de los Caudovirales. Este tipo de virus tienen una cola que utilizan para reconocer al hospedero e introducir su material genético solo en aquellos con los cuales la cola pueda interactuar, generalmente con receptores de la superficie celular. Los fagos son entes biológicos considerablemente más pequeños que las bacterias, con genomas de un tamaño entre las 30,000 a las 200, 000 pb aproximadamente y su genoma puede ser circular, linear o permutable entre ambas formas. Los géneros más relacionados con las BAL son los pertenecientes a las familias *Podoviridae*, *Myoviridae* y *Siphoviridae* (Murphy, 2017; Pujato *et al.*, 2018).

La capacidad de los fagos para destruir bacterias, aunado a su alta especificidad, ha permitido utilizarlos como antimicrobianos naturales en los alimentos, para la destrucción de bacterias patógenas que comprometen la calidad sanitaria del producto (Sillankorva *et al.*, 2012). Sin embargo, los fagos que infectan a las BAL se consideran como el principal factor externo que genera problemas afectando o disminuyendo sus funciones que se reflejan en la calidad sensorial

de los quesos, composición final, rendimiento o producción de compuestos bioactivos (Bezerra *et al.*, 2017; Murphy, 2017).

1.2.5.1. Principales fuentes de contaminación de fagos. Las principales fuentes de contaminación provienen del ambiente de la fábrica, leche cruda, agua, ingredientes reciclados como suero, y cepas lisogénicas (Briggiler-Marcó *et al.*, 2012; Pujato *et al.*, 2018). La leche cruda es una importante y conocida fuente de fagos, donde su concentración oscila entre 10^1 y 10^4 Unidades Formadoras de Partículas por mililitro (UFP/mL) (Briggiler-Marcó *et al.*, 2012; Briggiler-Marcó-Mercanti, 2021). No obstante, los fagos también pueden ser encontrados en la leche pasteurizada, ya que soportan fácilmente este tratamiento térmico (Capra *et al.*, 2009). Así mismo, la concentración de los fagos presentes inicialmente en la leche pasteurizada puede incrementarse súbitamente durante el proceso de fermentación logrando concentraciones de fagos de 10^8 UFP/mL. De esta manera, las fermentaciones fallidas son una fuente ideal de fagos líticos (Feyereisen *et al.*, 2019) y frecuentemente se utilizan para el aislamiento, identificación y estudio de este tipo de fagos (Wang *et al.*, 2010)

Por otra parte, Kleppen *et al.* (2011) encontraron que los fagos que infectaban a los cultivos lácticos no provenían de la leche cruda necesariamente, sino de las instalaciones de la fábrica. Esto puede deberse a la presencia de fagos adheridos a la superficie de utensilios o cubas contaminadas o en el aire dentro de la fábrica de queso (Verreault *et al.*, 2011). Asimismo, pueden ser encontradas en superficies como puertas, agarraderas, oficinas y pisos donde se han encontrado en concentraciones de 9-3. 138 genomas / cm². Estos hechos, generan que la carga de fagos inicial en la leche pueda ser superada fácilmente por la población de fagos dentro de las instalaciones (Kleppen *et al.*, 2011). Los cepas en estado lisogénico son también una fuente importante de fagos, ya que contienen el material genético del fago dentro de su genoma, el cual tiene el potencial de pasar al estado lítico lisando a la célula hospedera, lo que permite la propagación de las nuevas partículas víricas (Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004).

1.2.5.2 Mecanismos de infección de los fagos. Los fagos contienen toda la información genética necesaria para su multiplicación, la cual deben introducir dentro de la célula bacteriana. El primer

paso en el proceso de infección es la unión a la superficie celular de la cepa bacteriana susceptible, proceso conocido como adsorción (Murphy, 2017; Pujato *et al.*, 2018). Este proceso se realiza, en gran parte, mediante la interacción de receptores del fago con estructuras bacterianas, altamente conservadas, encontradas en la superficie celular que funcionan como receptores específicos de unión entre el fago y su cepa hospedera. Algunos ejemplos de estos receptores son los carbohidratos unidos al peptidoglicano y ácidos teicoícos. El siguiente paso en el proceso de infección es la inyección del material genético, la cual se realiza con ayuda de la cola del fago, que sirve para introducir este material a través de la pared y membrana celular hacia el citoplasma (Kortright *et al.*, 2021). Una vez dentro del citoplasma, el material genético del fago puede tomar dos vías de infección o ciclos infectivos, conocidos como líticos y lisogénicos, que son dos vías diferentes mediante las cuales los fagos pueden conseguir multiplicarse (Murphy, 2017).

En el ciclo lítico, el material genético del fago utiliza la maquinaria celular para multiplicarse y así formar nuevas partículas víricas, las cuales lisan a la bacteria, liberándose de esta manera nuevos fagos al medio extracelular capaces de infectar a nuevos hospederos (Quibroni, 2011; Murphy, 2017). La proliferación de los fagos de BAL mediante el ciclo lítico suele ser el más preocupante en tecnología de alimentos, ya que la propagación exponencial de los fagos en las BAL afecta inmediatamente y de manera visible los procesos de elaboración al afectar su viabilidad (Quibroni, 2011; Pujato *et al.*, 2018).

Por otra parte, en el ciclo lisogénico, el material genético del fago se integra al genoma bacteriano, sin presentarse inmediatamente la lisis celular, y las cepas infectadas en este tipo de ciclo son conocidas como lisogénicas (Argov *et al.*, 2017). Estas pueden afectar los procesos de elaboración de queso mediante la generación de mutaciones en genes importantes del metabolismo bacteriano, lo que finalmente también afecta su desempeño. Así mismo, se ha reportado que las cepas en estado lisogénico pueden facilitar la HGT permitiendo que acepten genes de virulencia, lo cual puede comprometer la seguridad alimentaria en los procesos en donde sean utilizadas (Quib Hoai eroni, 2011; Hoai *et al.*, 2016). Además, los fagos en estado lisogénico pueden pasar al ciclo lítico, cuando la cepa hospedadora sufre algún tipo de estrés.

1.2.5.3. Métodos para evitar la contaminación por fagos. Los fagos son muy difíciles de eliminar, ya que son ubicuos, es decir están en todas partes, en todos los ecosistemas y abundan en nichos

con mayor concentración bacteriana. Así, los procesos fermentativos son un medio ideal para la llegada y proliferación de fagos en cepas sensibles. Los efectos negativos de la infección de BAL por fagos, pueden ser controlados excluyendo a las cepas bacterianas sensibles al momento de elaborar cultivos iniciadores (Zinno *et al.*, 2010; Capra *et al.*, 2011). Sin embargo, en ocasiones esta actividad no es posible cuando se trata de cepas que generan compuestos deseables en el producto.

Se ha intentado la destrucción de los fagos mediante el uso de altas temperaturas como la pasteurización, pero diversos fagos la han resistido; mientras que temperaturas de esterilización no son compatibles con el procesamiento de algunos productos (Murphy, 2017; Pujato *et al.*, 2018). Por lo tanto, se han probados tratamientos no térmicos como las altas presiones para la disminución de la población de fagos en muestras de quesos y otros productos lácteos (Capra *et al.*, 2009, Garneau y Moineau, 2011). También se han considerado tratamientos químicos; sin embargo, los fagos han demostrado adaptarse a estos (Mahony *et al.*, 2012; Garneau y Moineau, 2011). Por ejemplo, medios que contienen agentes quelantes han sido utilizados para afectar la adorsión, y por lo tanto la propagación de los fagos (Mahony *et al.*, 2015). Asimismo, Ledeboer, *et al.*, (2002) reportaron el empleo de péptidos purificados para bloquear los receptores, de superficie celular, de los fagos c2, 936 and P335 de *Lactococcus lactis*.

La ubicuidad de los fagos extendidos en las instalaciones de procesamiento de lácteos de cualquier nivel de tecnificación, y su gran resistencia a los métodos convencionales, ha generado la necesidad de obtener cepas resistentes (Goh *et al.*, 2011). La modificación genética es una alternativa para la obtención de cepas resistentes ante fagos (Verreault *et al.*, 2011). Algunas técnicas empleadas para la modificación genética de BAL incluyen: tecnología ARN antisentido, sistema de suicidios desencadenado por fagos, sobreproducción de proteínas de fago, proteínas repetidas de anquirina diseñadas (DARPins) y fragmentos de anticuerpos neutralizantes (Garneau y Moineau, 2011; Quibroni, 2011). Este tipo de BAL son consideradas como organismos genéticamente modificados (OGM), y tienen gran potencial para su empleo como cultivos iniciadores. Sin embargo, las legislaciones internacionales han sido muy severas impidiendo, en muchos casos, su empleo a nivel industrial (Mozzi y Vignolo, 2010).

Por otra parte, algunas cepas de BAL tienen diferentes mecanismos de resistencia naturales que utilizan para defenderse contra fagos en sus nichos ecológicos. Los principales mecanismos de resistencia son la prevención de la adsorción, prevención de la entrada del ADN del fago, cortado

del ADN del fago y el sistema de infecciones abortivas (Labrie *et al.*, 2010).

La inhibición de la adsorción permite el bloqueo, modificación en la estructura tridimensional de los receptores o la presencia de moléculas que compitan con en estos receptores pueden contribuir a inhibir la adsorción del fago. La prevención de la entrada del ADN del fago bloquea la inyección de los fagos que han logrado adsorberse en la superficie celular. Cuando el material genético logra entrar al citoplasma bacteriano puede tener lugar los mecanismos de cortado del ADN como el sistema restricción-modificación (R-M) que permite la degradación con enzimas de restricción del ADN no modificado por metilación, lo cual protege al ADN de la célula hospedera para impedir la autodegradación del material genético. En este mismo sentido, el sistema CRISPR-Cas es un mecanismo que permite la degradación del material genético de los agentes genéticos exógenos, mediante un sistema de nucleasas guiadas por ARN. Por otro lado, los mecanismos de infecciones abortivas son el último frente de defensa contra los fagos. Este tiene lugar durante el proceso de la generación de nuevas partículas víricas. El sistema Abi participa en la detención de la replicación del ADN, transcripción y traducción de los genes del fago, así como la maduración de las partículas víricas o la etapa de lisis. Asimismo, la actividad de este sistema generalmente conlleva la apoptosis de la bacteria impidiendo el ensamblado de las partículas víricas formadas o la propagación de los virus (Labrie *et al.*, 2010).

Un tema muy interesante e importante en cuanto a la obtención de cepas resistentes a fagos son las cepas mutantes no sensibles a fagos (BIM). Las BIM se obtienen a partir de cepas que son sensibles a fagos, las cuales han sido enfrentadas a pruebas de reto contra fagos hasta que algunas bacterias mutan para obtener resistencia. Dichas mutaciones son naturales y, por lo tanto, no existen normas regulatorias que las prohíban (Mahony *et al.*, 2012; Zago *et al.*, 2017). Estas cepas son aisladas mediante su selección en un medio rico en fagos para diferenciarlas de la población sensible, con lo cual se genera una nueva cepa, ahora con resistencia a los fagos ante los cuales se expuso. Se ha reportado que los mecanismos de resistencia involucrados en la generación de BIM están relacionados con mutaciones en los receptores de fagos, el sistema de infecciones abortivas y el sistema CRISPR-Cas (Mills *et al.*, 2007; 2010).

Sin embargo las mutaciones en receptores puede afectar la morfología celular dificultando la división celular, lo que puede generar la pérdida de la resistencia adquirida (Viscardi *et al.*, 2003), mientras que el sistema de infecciones abortivas a menudo puede involucrar la apoptosis celular de las células infectadas (Dy *et al.*, 2014). Una situación muy diferente ocurre con el sistema CRISPR-Cas mediante el cual las cepas adquieren resistencia sin afectar su fenotipo (Mills *et al.*, 2007;

Barrangou, 2007). Por lo tanto, el estudio de este sistema resulta de gran interés científico y tecnológico para la obtención de cepas resistentes a fagos.

1.2.6. Sistema CRISPR-Cas

El sistema CRISPR-Cas es un mecanismo de defensa basado en nucleasas guiadas por ARN en bacterias y arqueas para defenderse de agentes genéticos móviles, como fagos y plásmidos. El nombre del sistema se divide en dos partes; así, CRISPR-Cas es un acrónimo en donde CRISPR significa repeticiones palindrómicas cortas regularmente interespaciadas, mientras que Cas hace referencia a complejos proteicos asociados a las CRISPR (Makarova *et al.*, 2015). Este sistema permite a las BAL que lo poseen adaptarse ante los diferentes agentes genéticos móviles que intenten infectarla y guardar un registro de dichos ataques para defenderse en ataques posteriores. Por lo cual, este sistema es comúnmente comparado con el sistema inmune de los vertebrados, ya que la resistencia es adquirida por la previa exposición ante el agente genético invasivo, generando una “inmunidad” que además puede ser heredada a las subsecuentes generaciones (Wright *et al.*, 2016).

Una característica muy importante de este sistema CRISPR-Cas es que es muy dinámico y está en constante evolución, lo cual le permite adaptarse a los distintos agentes genéticos exógenos, como los fagos, que tienen genomas muy heterogéneos y que mutan constantemente (Datsenko *et al.*, 2012). El sistema CRISPR-Cas está presente en casi el 50 % de los genomas bacterianos analizados (Makarova *et al.*, 2015), mientras que en estudios comparativos entre los grupos de las BAL se determinó que aproximadamente el 60% de los integrantes de este grupo poseen el sistema CRISPR-Cas (Sun *et al.*, 2015). Sin embargo, no todas las BAL que poseen el sistema CRISPR-Cas lo tiene completo, pudiendo faltar los genes cas o los arreglos CRISPR y en algunos casos sistemas CRISPR-Cas completos parecen estar inactivos (Horvath *et al.*, 2008).

La región del genoma en donde se encuentran las secuencias de nucleótidos correspondientes al sistema CRISPR-Cas es denominado locus CRISPR. Los genomas bacterianos pueden tener más de un locus CRISPR dentro de su genoma, los cuales frecuentemente contienen diferentes locus que codifican para diferentes tipos de proteínas Cas (Barrangou, 2007; 2013).

La principal ventaja del sistema CRISPR-Cas presente en BAL de interés industrial se debe a que

es posible realizar la CRISPRización o vacunación. Por lo tanto, puede elegirse el tipo de fago al que se desea que la bacteria adquiera resistencia inmediata y así no tenga que pasar por el proceso natural de adaptación (Barrangou, 2013; Horvath *et al.*, 2009; 2013). Las aplicaciones de BAL con sistema CRISPR-Cas como cultivos iniciadores para la elaboración de quesos, van más allá de la resistencia a fagos. Algunas de estas aplicaciones son la resistencia a transferencia de plásmidos, elementos genéticos móviles, genes de resistencia a antibióticos, factores de genes que codifican virulencia, entre otras. Actualmente se han reportado cultivos iniciadores con el sistema CRISPR-Cas para la elaboración de queso para pizza, llamado CHOOZIT SWIFT™ Dupont, este cultivo está compuesto por seis cepas de *Streptococcus thermophilus* (Barrangou y Horvath, 2012). CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. Annual review of food science and technology, 3, 143-162.). De tal forma que, la mayoría de los estudios sobre el sistema CRISPR-Cas se han realizado a *Streptococcus thermophilus* por su importancia tecnológica en la elaboración de productos lácteos (Horvath *et al.*, 2008; Garneau y Moineau, 2011).

1.2.6.1. Los arreglos CRISPR. Los arreglos CRISPR, también conocidos como matriz CRISPR, están formados por secuencias repetidas, a menudo conservadas, las cuales están interrumpidas por espaciadores, generalmente de origen exógeno. La longitud de los arreglos CRISPR dependerá del número de repeticiones y espaciadores, los cuales generalmente se encuentran intercalados entre sí. De esta manera, se ha documentado que el tamaño de los arreglos CRISPR puede ser muy variables desde las 30 repeticiones hasta más de 500 (Barrangou *et al.*, 2007; 2013). El arreglo CRISPR cumple una función de almacenamiento de un registro de ataques previos, lo que permite que sistema CRISPR-Cas ejerza una respuesta rápida y robusta tras la reinfección, a diferencia de otros mecanismos de defensa celular, que brindan protección de amplio espectro (Wright *et al.*, 2016). El tamaño de los arreglos a menudo es relacionada con la actividad del sistema; de manera que, arreglos más largos se han asociado con una mayor actividad contra agentes genéticos exógenos (Horvath *et al.*, 2008).

Las repeticiones del arreglo CRISPR son secuencias de nucleótidos de 27 a 50 pb, siendo muy frecuente la longitud de 30 pb, que están separadas o alternadas con secuencias únicas, de origen exógeno, llamados espaciadores (Barrangou, 2013). Se ha demostrado que la secuencia de estas repeticiones es altamente conservada entre subtipos de sistemas CRISPR-Cas, por lo cual tienen

una correlación con el tipo de complejos proteicos Cas (Kunin *et al.*, 2007). La secuencia parcialmente palindrómica de las repeticiones permite que sus transcritos puedan conformar una estructura secundaria de ARN con forma de horquilla y tallo. Dicha estructura secundaria de ARN, en conjunto con el transcripto del espaciador, sirven de guía de ARN para dirigir a las nucleasas Cas hacia su objetivo (Kunin *et al.*, 2007; Makarova *et al.*, 2015).

Por otro lado, los espaciadores del arreglo CRISPR, son secuencias de nucléotidos obtenidas a partir del material genético de origen extracromosomal. El tamaño de los espaciadores regularmente es de 27 a 50 pb (Barrangou, 2013). A diferencia de las repeticiones, los espaciadores son únicos dentro del arreglo CRISPR, y sus principales fuentes son fagos, plásmidos, y otros elementos genéticos móviles. La diversidad de los espaciadores, tanto en cantidad como en procedencia, puede variar entre microorganismos pertenecientes a una misma especie, lo cual se ha atribuido al tipo de elementos genéticos móviles contra los cuales se ha enfrentado la cepa de estudio (Shmakov *et al.*, 2017; 2020). Sin embargo, también se han encontrado espaciadores que presentan similitud con regiones dentro del genoma al que pertenece, también conocidos como espaciadores autodirigidos. La función de estos espaciadores se ha atribuido a posibles errores, pero también se ha asociado con funciones de regulación de genes (Stachler *et al.*, 2020).

1.2.6.2. Protoespaciadores y motivo adyacente al protoespaciador (PAM). La secuencia de nucléotidos de procedencia (agente genético móvil) que corresponde al espaciador se le conoce como protoespaciador. Así, el protoespaciador es la región muestreada dentro del material genético invasor, y este fragmento pasa a denominarse espaciador una vez que a sido introducido en el arreglo CRISPR de la bacteria, como un registro genético de ataques previos. La secuencia de los protoespaciadores es la detectada por el sistema CRISPR-Cas en la etapa de interferencia (Richter *et al.*, 2012; Sanozky-Dawes *et al.*, 2015).

El reconocimiento de los protoespaciadores en diferentes sistemas CRISPR-Cas requiere de la previa detección de un “motivo adyacente al protoespaciador” (PAM) (Barrangou, 2013). El tamaño del PAM es de aproximadamente 4 nucleótidos, variaciones en una sola base podrían impedir o disminuir la efectividad de la etapa de interferencia y en consecuencia la viabilidad celular (Crawley *et al.*, 2018). La obtención de la secuencia PAM es indispensable para el diseño de estudios enfocados a comprobar la actividad del sistema CRISPR-Cas, en los cuales se utilizan

plásmidos que contengan secuencias sintéticas detectables por las nucleasas Cas del sistema CRISPR-Cas bajo estudio (Sanozky-Dawes *et al.*, 2015).

1.2.6.3. Proteínas asociadas al CRISPR. El funcionamiento del sistema CRISPR-Cas depende de la actividad de las proteínas Cas, las cuales son las encargadas de la adquisición de los nuevos espaciadores, procesamiento del arreglo CRISPR para formar las guías de ARN, así como el corte del ADN invasor (fagos, plásmidos, y otros elementos genéticos móviles) (Barrangou, 2007; 2013). Estas “proteínas Cas” se encuentran codificadas en los “genes cas” que han sido denominados con el mismo nombre según la proteína, los cuales son un grupo de genes presentes en la proximidad del arreglo CRISPR (Barrangou, 2007). Se ha reportado una gran variedad de proteínas Cas, lo que ha permitido la clasificación de los sistemas CRISPR-Cas según el tipo de proteínas Cas que posea. Hasta la fecha, se han reportado seis tipos de sistemas CRISPR-Cas (I, II, III, IV, V, y VI), los cuales pertenecen a dos grupos principales 1 y 2. Los tipos de sistemas CRISPR-Cas se dividen a su vez en diferentes subtipos; por ejemplo, el tipo I, está conformado por los subtipos I-A hasta I-F, mientras que el tipo II, está conformado por los subtipos II-A hasta II-C, y de esta forma, cada tipo se subdivide en sus respectivos subtipos, como se reporta en Makarova *et al.* (2015) y Makarova y Koonin, (2015).

El grupo de proteínas Cas de un locus CRISPR-Cas se pueden dividir a su vez en tres grupos principales que son, las Cas núcleo, las Cas que definen el tipo y las que definen el subtipo de sistema CRISPR-Cas. Así, en primer lugar, las Cas núcleo presentes en la mayoría locus CRISPR son Cas1 y Cas2, codificadas por sus respectivos genes cas1 y cas2. Estas proteínas participan principalmente en la adquisición del material genético exógeno. Dentro de las proteínas Cas que definen el tipo de sistema se encuentran Cas3, Cas9 y Cas10 que definen a los sistemas CRISPR-Cas tipo I, II y III, respectivamente. Finalmente, las proteínas que definen el subtipo son muy variados; así, en el caso del sistema CRISPR-Cas tipo I, el subtipo I-A es Cas8a2 y Csa5; para el subtipo I-B es definido por Cas8b; para el subtipo II-A es definido por Csn2; en el subtipo III-B es definido por Cmr5; y de esta forma existen diversas proteínas que definen a cada subtipo reportados en la literatura (Makarova y Koonin, 2015).

En algunos subtipos, como en el caso los sistemas tipo I y tipo III, varias proteínas Cas se unen para formar un complejo efector que interviene en el procesamiento, detección, y escisión del

material genético invasor. Estos son conocidos como CASCADE en el tipo I, mientras que en el tipo III-A y III-B son conocidos como complejos Csm and Cmr (Jore *et al.*, 2011; Wiedenheft *et al.*, 2012; Makarova *et al.*, 2015). La variación de proteínas Cas en los diferentes subtipos tiene implicaciones principalmente en el procesamiento de los arreglos CRISPR y la escisión del material genético invasor, sin embargo, las etapas siguen siendo las mismas de la actividad del sistema. (Makarova *et al.*, 2015).

La implicación tecnológica de las proteínas Cas, para su empleo como mecanismo de defensa contra fagos en cepas de BAL, radica el tipo de material genético que puedan escindir, tal es el caso particular de los sistemas III-B que son capaces de degradar el ARN invasor, mientras que la mayoría de los subtipos CRISPR-Cas parece degradar ADN de cadena sencilla o de doble cadena (Makarova *et al.*, 2015). Por otro lado, es importante determinar que los sistemas CRISPR-Cas se encuentran completos, ya que de esto dependerá su potencial actividad y aprovechamiento como mecanismo de defensa contra fagos (Wang *et al.*, 2020; Pujato *et al.*, 2021).

1.2.6.4. Mecanismo del sistema CRISPR-Cas. El funcionamiento del sistema CRISPR-Cas consiste básicamente en tres pasos principales que son la adquisición o adaptación, expresión y procesamiento de los arreglos CRISPR, así como la interferencia o degradación del material genético invasor. Estos tres pasos se llevan a cabo en todos los tipos de sistemas CRISPR-Cas, pero presentan grandes variaciones en su mecanismo, especialmente en los pasos de expresión y procesamiento e interferencia (Makarova y Kooning, 2015).

La etapa de adaptación consiste en la adquisición de los espaciadores y su introducción dentro del arreglo CRISPR para generar resistencia contra los fagos, u otros agentes genéticos móviles, a partir de los cuales se adquirieron dichos espaciadores. Las principales proteínas Cas involucradas en esta etapa son Cas1 y Cas2; sin embargo, se han reportado que otras proteínas pueden contribuir a esta labor. Asimismo, Cas1 y Cas2 podrían desempeñar otras funciones en etapas diferentes. Los nuevos espaciadores se introducen de manera unidireccional en el extremo terminal de la secuencia líder del arreglo CRISPR, quedando más alejados los espaciadores más antiguos. De esta manera, el orden de los espaciadores permite hipotetizar cuáles son los fagos más recientes contra los cuales se han enfrentado la bacteria (Barrangou, 2007; Abriouel *et al.*, 2017). La adquisición de espaciadores sucede en escalas de tiempo relativamente cortas en medios altamente

contaminados por fagos (Tyson *et al.*, 2008); por lo cual, la presencia del sistema CRISPR-Cas sería ideal en cepas de interés tecnológico.

Posteriormente, en la etapa de la expresión y procesamiento, los arreglos CRISPR se transcriben en una secuencia larga de preCRISPR-ARN (precrARNc). El precrARNc sufre un procesamiento postranscripcional que permite la obtención de diversos fragmentos de CRISPR-ARN (crARN), uno por cada espaciador. El crARN generado está conformado por la estructura secundaria de la repetición junto con su espaciador adyacente. Las enzimas involucradas en esta etapa pueden ser diferentes entre los distintos subtipos. Por ejemplo, en algunos subtipos I, las proteínas Cas involucradas en el procesamiento de los arreglos CRISPR son Cas6b en el tipo IB, Cas5d en el tipo IC y Cas6e (CasE, Cse3) en el tipo I-E, mientras que en algunos sistemas tipo II, es necesaria Cas9, la ARNasa III del huésped para el procesamiento de pre-crRNA en crRNA maduro, así como un transcripto codificado en la misma hebra del ADN del locus CRISPR, el cual es conocido como (tracrARN) (Datsenko *et al.*, 2012; Leon *et al.*, 2018).

Finalmente, en la etapa de la interferencia o degradación del material genético invasor, este proceso también será acorde al tipo de sistema CRISPR-Cas, al igual que el procesamiento del precrARN. Así, por ejemplo, en los sistemas CRISPR-Cas tipo I, CASCADE unido a un único crARN reconoce y se une a la secuencia blanco en el material genético invasor, con la que presente complementariedad. Para ello, es necesario el previo reconocimiento de una secuencia adyacente al PAM. Después, CASCADE recluta a Cas3, que será la encargada de realizar la escisión del ADN. Por otro lado, el sistema CRISPR-Cas tipo II, se forma un complejo tracrARN:crARN y Cas9, con lo cual esta enzima se une y degrada el ADN invasor. Al igual que el sistema CRISPR-Cas tipo I, el reconocimiento y la escisión de este ADN depende de la previa detección de la secuencia PAM. Por lo tanto, la caracterización de la secuencia PAM resulta de gran interés en el estudio de la actividad del sistema CRISPR-Cas (Barrangou, 2013; Guan *et al.*, 2017; Leon *et al.*, 2018).

1.2.6.5. Consideraciones en la selección de BAL con CRISPR. La caracterización del sistema CRISPR-Cas como mecanismo de resistencia contra fagos en cepas de BAL comienza con el análisis de su genoma completo para realizar la búsqueda de los elementos básicos del sistema: el arreglo CRISPR y sus genes cas (Roberts y Barrangou, 2020). Una de las metodologías más rápidas

para cumplir este propósito es el empleo de cebadores PCR específicos dirigidos a regiones conservadas que flanquean los locus CRISPR-Cas (Deveau *et al.*, 2008; Petrie *et al.*, 2020). Por otra parte, los análisis del genoma completo pueden proveer mayor información que los análisis con cebadores PCR específicos, lo cual resulta indispensable para la caracterización de los distintos sistemas CRISPR-Cas presentes en una misma cepa (Roberts y Barrangou, 2020).

La información de los genomas completos de cepas puras de BAL es indispensable para correlacionar la presencia del sistema CRISPR-Cas con elementos genéticos móviles presentes en el mismo genoma (Horvath *et al.*, 2008; Vendramin *et al.*, 2017), lo cual podría dar indicios de su potencial actividad. Asimismo, dicha información es necesaria para encontrar los diferentes sistemas CRISPR-Cas que pueden encontrarse en un mismo genoma (Sun *et al.*, 2015; Brandt *et al.*, 2020). Además, cada sistema puede contener múltiples arreglos CRISPR, lo cual puede implicar una mayor resistencia y adaptabilidad a la infección por fagos (Mahony *et al.*, 2012). Por lo tanto, el análisis de genomas completos parece ser uno de los análisis más frecuentes para la caracterización de sistemas CRISPR-Cas en cepas de BAL (Abriouel *et al.*, 2017; Brandt *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020).

Se ha reportado una gran variedad de programas para el análisis bioinformático exhaustivo de los sistemas CRISPR-Cas (Zhang *et al.*, 2020). Estos permiten una inferencia muy precisa de los arreglos CRISPR, sus proteínas Cas, así como el tipo y subtipo de sistema CRISPR-Cas usando como archivos de entrada las secuencias de nucleótidos de genomas bacterianos. Algunos ejemplos de estos programas son el CRISPRDetect (Biswas *et al.*, 2016), CRISPRFinder (Grissa *et al.*, 2007) y su actualización el CRISPRCasFinder (Couvin *et al.*, 2018), y actualmente el CRISPRTyper (Russel *et al.*, 2020), que además genera una representación gráfica del sistema CRISPR-Cas. Por otro lado, diferentes estudios sobre la identificación de espaciadores en genomas de BAL han utilizado las plataformas web CRISPRTarget (Biswas *et al.*, 2013) y BLASTn para la identificación de los espaciadores de sus arreglos CRISPR, para determinar la potencial actividad, así como conocer el registro de eventos de ataques que ha sufrido la cepa, tanto de fagos como otros agentes genéticos móviles.

La confirmación de la actividad potencial del sistema CRISPR-Cas implica demostrar que las regiones CRISPR adquieren espaciadores en respuesta al ataque de elementos genéticos móviles, como los fagos y plásmidos (Mills *et al.*, 2010). Generalmente esta demostración se realiza mediante pruebas de desafío o reto de las BAL contra diferentes fagos (Horvath *et al.*, 2008).

Actualmente, los análisis metagenómicos son una herramienta poderosa para estudiar la interacción

entre los fagos y las bacterias con sistema CRISPR-Cas, ya que es posible secuenciar tanto el genoma del huésped como del hospedero (Miller *et al.*, 2012). Mediante estos estudios es posible conocer el tipo de fagos, especialmente aquellos no cultivables, presentes en el ecosistema de estudio. Así mismo, debido a que los CRISPR representan un registro molecular de los fagos que intentaron infectar a la bacteria, la información contenida en los espaciadores puede utilizarse para intentar armar el genoma del fago y además conocer su rango de hospederos (Sun *et al.*, 2015).

1.3. Hipótesis

Bacterias ácido lácticas específicas de interés tecnológico, aisladas de queso fresco artesanal, poseen el sistema CRISPR-Cas, como mecanismo de defensa contra fagos.

1.4. Objetivo General

Determinar la presencia y actividad del sistema CRISPR-Cas como mecanismo de defensa contra bacteriófagos en BAL, de interés tecnológico, aisladas de quesos frescos artesanales de Sonora.

1.5. Objetivos Específicos

1. Conocer las principales BAL representativas de quesos frescos artesanales de Sonora mediante secuenciación masiva de la región V3 del gen 16S ARNr
2. Secuenciar y caracterizar el genoma de las BAL de interés tecnológico, aisladas de queso fresco artesanal.
3. Caracterización del sistema del sistema CRISPR-Cas, en los genomas secuenciados de las cepas de estudio, mediante el uso de herramientas bioinformáticas.

1.6. Sección Integradora del Trabajo

La información de esta tesis está contenida en 2 artículos, los cuales se encuentran resumidos a continuación:

Artículo 1. Artisanal Fresco cheese from Sonora: physicochemical composition, microbial quality, and bacterial characterization by high-throughput sequencing

En este capítulo se presenta el análisis de la composición fisicoquímica y la microbiota bacteriana del queso Fresco artesanal de Sonora. La composición fisicoquímica fue determinada mediante la metodología de AOAC, mientras que la calidad microbiológica se analizó mediante técnicas dependientes siguiendo la NOM (NOM)-243-SSA1-2010, principalmente. Además, la microbiota bacteriana se analizó por secuenciación de alto rendimiento dirigida a la región V3 del gen 16S del ARN ribosomal. Los resultados permitieron determinar que el queso Fresco artesanal de Sonora tiene un potencial importante para su estandarización, basándose en los análisis fisicoquímicos y micromicrobiológicos realizados. Se encontró que la calidad sanitaria es un factor en el cual, los productores de queso Fresco deben trabajar arduamente y de manera organizada para mejorar y estandarizar sus procesos. El análisis de la microbiota bacteriana por secuenciación de alto rendimiento permitió determinar que cinco géneros de BAL fueron los más predominantes en el queso Fresco artesanal de Sonora. Por lo tanto, consideramos que posteriores investigaciones podrían enfocarse en el aislamiento y estudio de estos géneros dominantes para su posible empleo como cultivos lácteos e investigación científica.

Artículo 2. Genomic analysis of the CRISPR-Cas system in *Limosilactobacillus fermentum* strains isolated from Mexican artisanal Cocido cheese.

En este capítulo se presenta la caracterización del sistema CRISPR-Cas de *Limosilactobacillus fermentum* J23 y J28 (aisladas de queso Cocido, que es un queso fresco sonorense), mediante el análisis bioinformático de las secuencias de ADN de su genoma, las cuales fueron obtenidas mediante secuenciación masiva de alto rendimiento. El análisis bioinformático realizado permitió determinar que las cepas *Limosilactobacillus fermentum* J23 y J28 poseen dos tipos de sistema CRISPR-Cas, el tipo I-E y el II-A, aparentemente completos y potencialmente funcionales. De esta

manera, el análisis de los espaciadores CRISPR permitió determinar que, de manera general, las cepas bajo estudio se han enfrentado a el mismo tipo de agentes genéticos móviles, destacando los bacteriófagos específicos de *Limosilactobacillus fermentum*, lo cual es muy alentador para los fines del presente estudio. Además, se analizaron las estructuras secundarias y secuencias PAM que son la puerta a la reutilización de los sistemas CRISPR-Cas para la autoedición genética de su genoma.

2. ARTISANAL FRESCO CHEESE FROM SONORA: PHYSICOCHEMICAL COMPOSITION, MICROBIAL QUALITY, AND BACTERIAL CHARACTERIZATION BY HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING

José I. Méndez-Romero¹, Ricardo Reyes-Díaz¹, Lourdes Santiago-López¹, Adrián Hernández-Mendoza¹, Belinda Vallejo-Cordoba¹, Sonia G Sayago-Ayerdi², Bruno Gómez-Gil³ And Aarón F González-Córdova¹.

¹Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos, Calidad, Autenticidad y Trazabilidad de los Alimentos. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, No. 46 Col. La Victoria, C.P. 83304, Hermosillo, Sonora, México. isidro.mendez@estudiantes.ciad.mx (J.I. M-R); ricardo.reyes@ciad.mx (R R-D); lsantiagolopez@outlook.es (L S-L); ahernandez@ciad.mx (A H-M); vallejo@ciad.mx (B V-C).

²Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic, Av. Tecnológico No 2595, Col. Lagos del Country C.P. 63175, Tepic, Nayarit, México. sonia.sayago@gmail.com (S. S-A).

³Coordinación Regional Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Av. Sábalo-Cerritos s/n, Estero del Yugo, Mazatlán, Sinaloa C.P. 82000, México. bruno@ciad.mx (B. G.-H).

Este artículo fue publicado en la revista International Journal Dairy Technology en Mayo del 2021

ORIGINAL
RESEARCH

Artisanal Fresco cheese from Sonora: Physicochemical composition, microbial quality, and bacterial characterization by high-throughput sequencing

JOSÉ I MÉNDEZ-ROMERO,¹ RICARDO REYES-DÍAZ,¹
LOURDES SANTIAGO-LÓPEZ,¹ ADRIAN HERNÁNDEZ-MENDOZA,¹
BELINDA VALLEJO-CORDOBA,¹ SONIA G SAYAGO-AYERDI,²
BRUNO GÓMEZ-GIL³ and AARÓN F GONZÁLEZ-CÓRDOVA *¹

¹Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., Carretera Gustavo Aizazán Rosas, No. 46 Col. La Victoria, Hermosillo, Sonora C.P. 83300, ²Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic, Av. Tecnológico No 2395, Tepic Col. Lagos del Country C.P. 63175, and ³Coordinación Regional Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Av. Sábalo-Cerritos s/n, Estero del Yugo, Mazatlán C.P. 82000 México

Keywords Fresco cheese, Physicochemical composition, Microbial diversity, High-throughput sequencing.

The aim of the present study was to characterise the physicochemical and the microbiota composition of the artisanal Fresco cheese from Sonora. For this, cheeses of 18 small-scale artisanal dairies were analysed. The chemical composition and the microbiological quality were determined by standard methods, and bacterial diversity by high-throughput sequencing. The physicochemical composition showed differences ($P < 0.05$) among dairies, and the principal component analysis aggrupation of 66% dairies. The analysis by region did not show difference ($P < 0.05$). The microbiota most abundant were Firmicutes, Proteobacteria and lactic acid bacteria in phyla and genera, respectively. These results provide insights on the characterisation of the Fresco cheese from Sonora.

Keywords Fresco cheese, Physicochemical composition, Microbial diversity, High-throughput sequencing.

INTRODUCTION

Fresco cheese is one of the most consumed cheeses in Mexico and Latin American countries since it is used as a base ingredient in traditional dishes. Hence, this product has become very popular in the United States due to the growing population of Hispanics in this country. The cheese is known as a fresh cheese that can be immediately consumed after preparation (Van Hekken and Parkye 2003). The cheesemaking process is characterised by using raw cow's milk and the product may present different variants in sizes, shapes, and composition. Therefore, in some regions of Mexico, it is also known as Panela, Canasto or Blanco cheese

(Van Hekken *et al.* 2012; González-Córdova *et al.* 2016). Even though, some vegetables may be added as extra ingredients, according to the region where it is prepared. In view of the foregoing, sensory characteristics, chemical composition, and microbiological quality may vary among regions or dairies. All these variations make this product heterogeneous; in consequence, it often does not comply with the limits established in official standards, mainly those with high concentrations of undesirable microorganisms. Nevertheless, scientific interest in artisanal cheeses has also been raised since they have been recognised as good sources of novel bacteria with probiotic, immunomodulatory, antimicrobial capacities, among others

*Author for correspondence. E-mail: aaronlgz@ciad.mx

© 2021 Society of
Dairy Technology

(Santiago-López *et al.* 2018a; Santiago-López *et al.* 2018b). Besides, it is widely known that these microorganisms could play an important role in imparting desirable sensory characteristics in the cheese.

Among different commercial cheeses, the artisanal Fresco cheese is widely popular in the state of Sonora, Mexico. Actually, this cheese has been manufactured for approximately 300 years in this region and produced in small scale (Hemández). The milk used mainly comes from cattle breeds raised for meat production (Hemández 2012) located in an extremely arid environment, which may influence its typicality that makes it highly consumed in this region. Therefore, several studies have been carried out to assess the characteristics and microbial composition of this cheese in order to determine its quality and safety (Torres-Llance *et al.* 2006). However, the physicochemical composition and microbial diversity of this cheese have not been fully characterised. Hence, the aim of the present study was to characterise the physicochemical and the microbiota composition of the artisanal Fresco cheese from Sonora, Mexico, using conventional methods and high-throughput DNA sequencing.

MATERIALS AND METHODS

Collection of samples

Two Artisanal Fresco cheese samples made with raw milk were collected from 18 different small-scale dairies, in a period of six months between spring and summer, in three different regions of Sonora, Mexico: Mazatlán (M1–M6), Pueblo de Alamos (P1–P6) and Ures (U1–U6), obtaining a total of 36 cheeses.

The process of Fresco cheeses does not include a maturation period step and the sampled cheeses were freshly made, with a maximum of 5 days old. All the samples were aseptically obtained and transported under refrigerated conditions to the Laboratory of Chemistry and Biotechnology of Dairy Products in the Research Center for Food and Development (CIAD A.C.). In the laboratory, under aseptic conditions, the Fresco cheese samples were taken into internal and external sections and placed in a sterile bag. Immediately, the cheese samples were homogenised. Then, the samples were divided into three: (i) for physicochemical analysis, (ii) for microbiological analysis and (iii) for metagenomics analysis, it was stored at -20 °C.

Physicochemical composition

Total solids (TS), moisture by difference, were determined by the oven drying method (947.05); protein by the micro-Kjeldahl method (9910.20); fat by the Goldfish method (989.04); ashes by the gravimetric method (990.19); acidity by titration (920.124); total salt content by Volhard method (935.43); and total carbohydrates were determined by

difference [100 – (protein + fat + total solids + ash)] (AOAC, 2000). Additionally, the pH was recorded (Hanna Instruments pH 211, Cluj, Romania).

Microbiological analyses

Three main groups of presumptive genus of lactic acid bacteria (LAB) were determined *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus* (Torres-Llance *et al.* 2006). The population of aerobic mesophilic bacteria (AMB), moulds and yeasts (MY), and *Staphylococcus aureus* were determined by plate counting. Total coliform bacteria (TCB) and faecal coliform bacteria (FCB) and the presence of *Escherichia coli* were evaluated by the most probable number (MPN) method. Likewise, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. were determined by selective media and biochemical tests. All these analyses were performed following the guidelines of the official Mexican Standard (NOM)-243-SSA1-2010 (Secretaría de Salud, 2010a, 2010b).

Metagenomics analysis

DNA extraction

Three dairies from each region were randomly selected for the bacterial DNA extraction. The DNA extraction was performed in 100 mg of cheese samples (previously homogenised and kept at -20 °C before being analysed) by using the Nucleospin Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The DNA purity and integrity were verified by spectrophotometry in a Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) and gel electrophoresis analysis, respectively. DNA was quantified with a Quant-iT PicoGreen dsDNA assay kit (Invitrogen, Eugene, OR, USA). Finally, the samples were stored at -20 °C until being used for the preparation of the DNA libraries.

Preparation of DNA libraries and massive sequencing

The preparation of DNA libraries was performed following the 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation protocol (Illumina, 2013), with some modifications. The V3 region of the 16S rRNA gene was amplified with the 338f (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') for 338f (5'-ACYCCTACGGGRGGCAGCAG-3') primers (Huse *et al.* 2008). The genes were amplified by real-time PCR at 95 °C for 5 min, 35 cycles; (95 °C for 35 s, 56 °C for 35 s and 72 °C for 30 s and 72 °C for 10 min. Subsequently, a second real-time PCR was performed adding Nextera XT Indexes (Illumina, San Diego, CA, USA) in each real-time PCR product to add binding domains to flow cell and to differentiate the samples in libraries for the massive sequencing. The products were visualised by gel electrophoresis and quantified following the protocol Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

The libraries were purified (AMPure® XP magnetic beads; Brea, CA, USA) and their concentration was normalised to

4 nM and then homogenised in a single pool. The pool was sequenced in a MiniSeq platform (Illumina) with a paired-end configuration using 2 × 150 cycles with a mid-flow cell (300 cycles) (Illumina).

Bioinformatic analyses

The libraries were analysed in a virtual linux image (MG-Linux) using the Oracle VM VirtualBox software (Oracle Corporation, Redwood City, CA, USA). Indexes were removed and raw reads were filtered considering their quality and size. The paired reads (R1 and R2), of each sample, were assembled (PEAR software The Exelixis Lab, Heidelberg, Germany). Then, the chimeras were removed from the assembled sequences with the VSEARCH program (v. 3.1) <https://github.com/torognes/vsearch> (Edgar 2010), and the SILVA release 128 databases Quast et al., 2013. The sequences with 97% of similitude were grouped into operational taxonomic units (OTU's) by the UCLUST method (VSEARCH software) (Edgar 2010). Afterwards, each representative OTU was identified with the EzBioCloud-LGM 2018 (Yoon et al. 2017) database by using the taxonomic level thresholds proposed by Yarza et al. (2014). Sequencing coverage was assessed by rarefaction curves with the Past software (v. 2.5) https://palae-electronica.org/2001/l/pastissue1_01.htm (Hammer et al. 2013). The OTU's dates were expressed as a percentage of relative abundance (RA) and the OTU's with a minimum of 0.1% of RA were analysed. Additionally, the Simpson (1/D) and Shannon (H) indexes were obtained with the Past software (v. 2.5).

Statistical analysis

The results of the chemical composition and the bacterial counts were analysed by analyses of variance with a block design in order to establish differences among regions. Additionally, a completely randomised design was applied to establish differences among dairies. Significant differences ($P < 0.05$) were analysed using Fisher's test. The principal component analyses (PCA) were performed to group dairies according to the chemical and bacterial composition of their cheeses. All these latter analyses were performed in the NCSS, LLC, Kaysville, UT, USA. 2012 software. The data obtained in massive sequencing, a PCA was also carried out taken the differential abundances of the bacterial communities by using the Statistical Analysis of Metagenomic Profiles (STAMP) program and a Tukey-Kramer test ($P < 0.05$) was used to statistically validate the variation in abundances observed in the microbial communities.

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical composition

The results of the physicochemical composition for the 18 dairies are shown in Table 1. Overall, the physicochemical parameters among dairies within the same region and even

among regions shown differences ($P < 0.05$). For instance, TS showed a wide range of 36.34%–48.26%. This variation in total solids was due to was their high concentration of protein and fat both parameters ranging from 13% to 26%. Additionally, the concentration of carbohydrates (0.01%–2.54%), ash (2.21%–3.48%), NaCl (0.87%–1.86%) and acidity (1.00%–3.24%) showed differences among dairies ($P < 0.05$), and pH showed the less variation ranging (5.08–5.66) ($P > 0.05$).

In this sense, a study reported by Tunick (2007) show the relative similarity in NaCl values, which may be attributed to this ingredient is added at the end of the process, and their concentration only decrease during commercialisation by the loss whey (Tunick et al. 2012). On the other hand, the pH was considerably similar to those Fresco cheeses manufactured with raw milk under controlled laboratory conditions showing pH values in a range of 5–6 (Torres-Llanez et al. 2006; Van Hekken et al. 2012; Reyes-Díaz et al. 2019). The results of pH could be attributed to the lactic fermentation by LAB present during the manufacturing process. In that regard, LAB and coliforms are some of the bacteria that are widely reported for their ability to produce lactic acid from lactose (Davison et al. 2004; Cuevas-González et al. 2017). Thus, low pH value is a factor that determines the type of microbiota present in cheeses, also, often affecting the pathogenic bacteria load (McSweeney, 2004).

The analysis by region showed differences ($P < 0.05$). Mazatlán showed the highest concentration of TS, fat and NaCl; Pueblo de Alamos was highest in moisture, ashes and pH; meanwhile, Ures was the lowest values in fat, NaCl and pH. These differences could be attributed to the milk composition, as well as the lack of standardisation of processes (González-Córdova et al. 2016). Similar results have been reported by other artisanal Mexican cheeses, such as Cocido and Poro de Tabasco (Cuevas-González et al. 2017; De la Rosa-Alcaraz et al. 2020).

Overall, the physicochemical results were similar to Fresco, Panela and Blanco cheeses (Tunick, 2007; Tunick et al. 2012). Indeed, these three kinds of cheeses have similar manufacturing processes and only may vary in presentation (size and shape). According to the Codex Standard 283-1978, the artisanal Fresco cheese from Sonora could be classified as a soft and full-fat cheese considering equals percentage moisture on a fat-free basis and equals percentage fat on the dry basis (67.20%–78.04% and 31.30%–57.28%, respectively).

The PCA was applied to the physicochemical composition among artisanal Fresco cheese from Sonora (Figure 1A). In this sense, the k-means cluster analysis shown four main groups, being the group A (M1–M4, M6, U1–U3, U5–U6, P2 and P6) who shown the 66.66% of the total dairies evaluated; group B (M5, P1, P3, P4) with 22.2% and C (P5) and D (U4) with 5.55%, respectively.

Regarding the composition, the group A, the dairies grouped were of Mazatlán and Ures regions, with the lowest

Table 1 Physicochemical composition of artisanal Fresco cheese from Sonora.

Dairy ^j	Moisture ^j	Total solids ^j	Protein ^j	Fat ^j	Total carbohydrates ^j	Ash ^j	NaCl ^j	Acidity ^j	pH
M1	51.74 ± 0.14 ^a	48.26 ± 0.14 ^a	16.87 ± 0.24 ^{ab}	26.50 ± 0.19 ^a	1.84 ± 0.57 ^a	3.05 ± 0.74 ^a	1.71 ± 0.76 ^a	2.24 ± 0.67 ^a	5.23 ± 0.44 ^a
M2	60.71 ± 0.13 ^b	39.29 ± 0.16 ^b	14.65 ± 0.26 ^{ab}	21.50 ± 0.22 ^b	0.33 ± 0.60 ^b	2.81 ± 1.74 ^b	1.38 ± 0.85 ^b	2.30 ± 0.66 ^b	5.16 ± 0.44 ^b
M3	61.65 ± 0.13 ^b	38.35 ± 0.16 ^b	13.66 ± 0.27 ^b	21.00 ± 0.22 ^b	0.78 ± 0.59 ^b	2.91 ± 1.14 ^a	1.47 ± 0.82 ^a	2.37 ± 0.65 ^a	5.20 ± 0.44 ^a
M4	54.65 ± 0.14 ^a	45.35 ± 0.15 ^a	17.67 ± 0.24 ^a	25.00 ± 0.20 ^a	0.12 ± 0.62 ^a	2.56 ± 2.85 ^a	1.78 ± 0.75 ^a	3.24 ± 0.56 ^b	5.10 ± 0.44 ^a
M5	54.10 ± 0.14 ^a	45.90 ± 0.15 ^a	17.10 ± 0.24 ^a	25.75 ± 0.20 ^a	0.12 ± 0.58 ^a	2.93 ± 2.86 ^a	1.47 ± 0.82 ^a	1.71 ± 0.77 ^a	5.66 ± 0.42 ^a
M6	54.19 ± 0.14 ^a	45.81 ± 0.15 ^a	17.90 ± 0.24 ^a	25.00 ± 0.20 ^a	0.09 ± 0.60 ^a	2.82 ± 3.40 ^a	1.53 ± 0.81 ^a	1.96 ± 0.72 ^a	5.26 ± 0.44 ^a
P1	62.78 ± 0.13 ^b	37.22 ± 0.16 ^b	15.74 ± 0.25 ^b	17.50 ± 0.24 ^b	0.50 ± 0.54 ^a	3.48 ± 1.42 ^a	1.86 ± 0.73 ^a	3.17 ± 0.56 ^b	5.48 ± 0.43 ^a
P2	54.61 ± 0.14 ^a	45.39 ± 0.15 ^a	16.53 ± 0.25 ^a	26.00 ± 0.20 ^a	0.66 ± 0.67 ^a	2.21 ± 1.23 ^a	0.92 ± 1.04 ^a	2.49 ± 0.63 ^b	5.21 ± 0.44 ^a
P3	62.62 ± 0.13 ^b	37.38 ± 0.16 ^b	14.20 ± 0.27 ^b	17.50 ± 0.24 ^b	2.54 ± 0.56 ^b	3.14 ± 0.63 ^a	1.81 ± 0.74 ^a	1.36 ± 0.86 ^a	5.55 ± 0.42 ^a
P4	53.00 ± 0.14 ^a	47.00 ± 0.15 ^a	17.06 ± 0.24 ^a	26.50 ± 0.19 ^a	0.36 ± 0.57 ^a	3.08 ± 1.66 ^a	1.31 ± 0.87 ^a	1.61 ± 0.79 ^a	5.63 ± 0.42 ^a
P5	63.66 ± 0.13 ^b	36.34 ± 0.17 ^b	18.00 ± 0.24 ^a	15.00 ± 0.26 ^a	0.01 ± 0.55 ^a	3.34 ± 9.65 ^a	1.46 ± 0.83 ^a	1.20 ± 0.90 ^a	5.58 ± 0.42 ^a
P6	57.69 ± 0.13 ^b	42.31 ± 0.15 ^b	17.77 ± 0.24 ^a	21.85 ± 0.21 ^a	0.05 ± 0.62 ^a	2.63 ± 4.42 ^a	1.39 ± 0.85 ^a	3.14 ± 0.56 ^b	5.30 ± 0.43 ^a
U1	63.10 ± 0.13 ^b	36.90 ± 0.16 ^b	16.29 ± 0.25 ^b	16.50 ± 0.25 ^b	1.25 ± 0.59 ^b	2.86 ± 0.89 ^a	1.62 ± 0.79 ^a	2.79 ± 0.60 ^a	5.08 ± 0.44 ^a
U2	58.45 ± 0.13 ^b	41.55 ± 0.16 ^b	15.06 ± 0.26 ^b	22.50 ± 0.21 ^a	1.48 ± 0.63 ^b	2.50 ± 0.80 ^a	0.93 ± 1.04 ^a	2.63 ± 0.62 ^a	5.26 ± 0.44 ^a
U3	60.88 ± 0.13 ^b	39.24 ± 0.16 ^b	15.73 ± 0.25 ^b	20.50 ± 0.22 ^a	0.05 ± 0.58 ^a	2.96 ± 4.33 ^a	1.56 ± 0.80 ^a	2.25 ± 0.67 ^a	5.21 ± 0.44 ^a
U4	58.47 ± 0.13 ^b	41.53 ± 0.16 ^b	25.21 ± 0.20 ^b	13.00 ± 0.28 ^b	0.08 ± 0.56 ^a	3.24 ± 3.44 ^a	0.87 ± 1.07 ^a	2.03 ± 0.30 ^a	5.16 ± 0.44 ^a
U5	54.59 ± 0.14 ^a	45.41 ± 0.15 ^a	17.41 ± 0.24 ^a	25.00 ± 0.20 ^a	0.07 ± 0.58 ^a	2.93 ± 3.66 ^a	0.99 ± 1.00 ^a	1.00 ± 0.59 ^a	5.18 ± 0.44 ^a
U6	54.10 ± 0.14 ^a	45.90 ± 0.15 ^a	17.42 ± 0.24 ^a	26.00 ± 0.20 ^a	0.11 ± 0.65 ^a	2.37 ± 3.06 ^a	1.99 ± 0.79 ^a	2.38 ± 0.65 ^a	5.24 ± 0.44 ^a

Values represent the means ± standard deviation ($n = 3$). Different superscripts indicate statistical differences ($P < 0.05$) among dairies.^jValues are expressed in per cent.

pH range (5.08 and 5.31), carbohydrates and moisture, and the highest acidity values and TS, suggesting the main discriminant factors to conform this group. This is important to highlight that since this is the largest group, the composition of these cheeses may be considered as typical of the artisanal Fresco cheese from Sonora. These similarities have special importance since it is known that cheesemakers from Mazatlán and Ures have tried to be organised in order to work together since they share traditions such as know-how in the production of cheeses (mainly Fresco and Cocido) (Villegas de Gante and Cervantes-Escoto, 2011; Hernández 2012).

Group B, conformed by dairies of Pueblo de Álamos and one from Mazatlán showed less acidity and high pH. For the groups C (Pueblo de Álamos) and D (Ures) were characterised by containing the lowest concentration of TS and carbohydrates; and group D (U4) the highest protein and the lowest fat and NaCl. These results could suggest that their processes and consequently the cheese composition are different from those dairies grouped in clusters A and B.

Overall, according to the physicochemical composition, this product was characterised as a nonripened, soft and full-fat cheese.

Microbiological composition

The microbiological composition for the 18 dairies is shown in Table 2. This microbiological parameters presented differences ($P < 0.05$) among dairies showing wide ranges: AMB (7.5–10.05 \log_{10} cfu/g), MY (4.2–8.0 \log_{10} cfu/g), TCB (6.50–10.04 \log_{10} MPN/g), FCB [identified as *E. coli* (6.38–10.04 \log_{10} MPN/g)] and *S. aureus* (3.66–6.14 \log_{10}

cfu/g). Besides, the presence of *Salmonella* spp. in 14 dairies was detected, and *Listeria* spp. was absent in all dairies.

The AMB and MY concentrations were relatively higher than those reported by Renye *et al.* (2008). In general, there are not NOM established for artisanal dairies products, and then, all concentrations for indicator and pathogenic microorganisms found in cheeses analysed are above the limit established for pasteurised milk NOM-091-SSA1-1994 and NOM-243-SSA1-2010. Although Mexican standards do not establish permissible limits for AMB in fresh cheeses, these is considering an indicator of microbiological quality in foods (Nanu *et al.* 2007); and high concentrations may contain pathogenic microorganisms (Park and Kim, 2013).

Regarding MY, these are considered common in both raw and pasteurised milk products (Pitt and Hocking 2009; Marín *et al.* 2015). In this sense, an important source of contamination of moulds is the air and the dairies are exposed freely (Marín *et al.* 2015; Kure and Skaar, 2019). On the contrary, some MY are used as adjunct cultures or found as part of the native cheese microbiota providing important organoleptic characteristics (Banjara *et al.* 2015). For instance, in Panela cheese there are *Scheffersomyces*, *Dikarya*, *Saccharomyces*, *Galactomyces*, which are not considered dangerous for health (Murugesan *et al.* 2018). However, some species may be deteriorative or even of medical importance due to the generation of mycotoxins (Dobson 2017, Awasti and Anand, 2020). Although their contamination has been reported below the permissible limits in Oaxaca cheese made at industrial scale (Carvajal-Moreno *et al.* 2019). However, some Mexican cheeses have been associated with the presence of mycotoxins at high levels, including Fresco cheese (Urbán *et al.* 2009; Rojas-Marín *et al.* 2018).

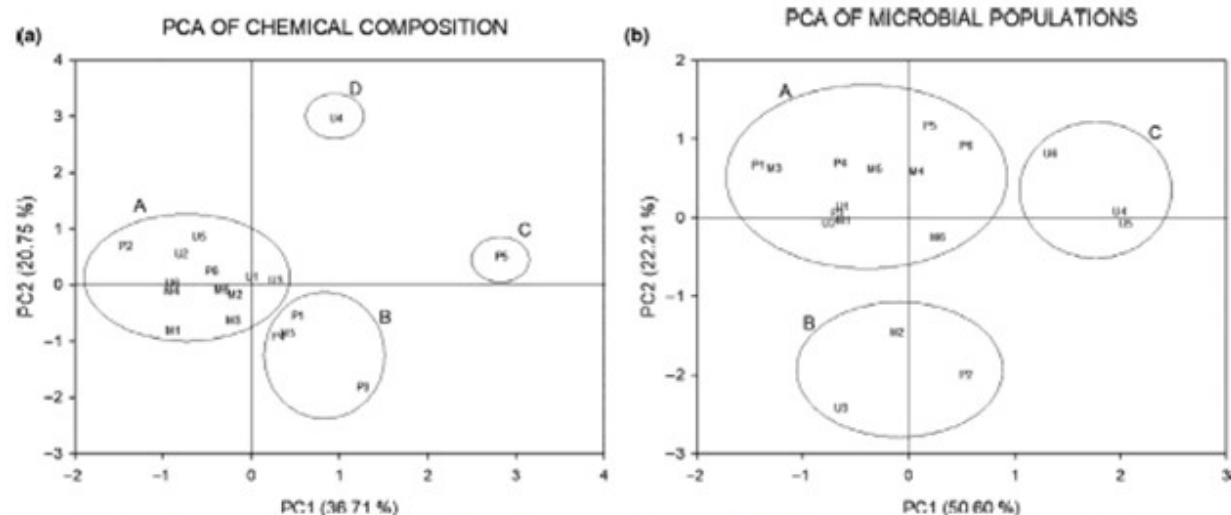


Figure 1 Principal component analysis. (a) physicochemical composition and (b) microbiological composition of artisanal Fresco cheese from Sonora.

Table 2 Microbiological concentration of artisanal Fresco cheese from Sonora.

Dairies	Lactobacillus ^a	Lactococcus ^a	Saccharomyces ^a	AMB ^b	MF ^c	S. aureus ^d	TCB ^e	FCB ^f	E. coli ^g	S
M1	7.86 ± 0.03 ^e	6.98 ± 0.06 ^e	7.11 ± 0.01 ^b	10.05 ± 0.14 ^e	5.49 ± 0.01 ^a	5.58 ± 0.47 ^{b,c}	9.03 ± 0.21 ^b	9.03 ± 0.21 ^c	9.03 ± 0.21 ^c	Absent
M2	8.15 ± 0.19 ^d	7.50 ± 0.12 ^d	6.93 ± 0.42 ^{ab}	7.90 ± 0.29 ^e	4.93 ± 1.03 ^a	4.24 ± 0.07 ^a	7.93 ± 0.55 ^b	7.93 ± 0.55 ^{ab}	7.93 ± 0.55 ^{ab}	Detected
M3	7.66 ± 0.15 ^{bc}	6.94 ± 0.09 ^c	7.04 ± 0.12 ^{ab}	10.22 ± 0.03 ^b	5.60 ± 0.08 ^a	4.05 ± 0.40 ^a	9.85 ± 0.27 ^c	9.85 ± 0.27 ^c	9.85 ± 0.27 ^c	Detected
M4	6.71 ± 0.05 ^a	6.54 ± 0.09 ^b	7.60 ± 0.08 ^c	8.82 ± 0.04 ^c	5.72 ± 0.02 ^a	6.14 ± 0.05 ^a	9.03 ± 0.21 ^b	8.86 ± 0.45 ^{bc}	8.86 ± 0.45 ^{bc}	Detected
M5	7.44 ± 0.13 ^b	5.88 ± 0.05 ^b	7.69 ± 0.13 ^c	8.32 ± 0.03 ^b	5.63 ± 0.06 ^a	5.14 ± 0.09 ^a	9.32 ± 0.06 ^c	9.32 ± 0.06 ^c	9.32 ± 0.06 ^c	Detected
M6	7.86 ± 0.05 ^c	6.60 ± 0.13 ^b	6.58 ± 0.06 ^a	9.22 ± 0.04 ^d	5.85 ± 0.03 ^a	5.66 ± 0.10 ^{a,c}	8.85 ± 0.27 ^b	7.61 ± 0.61 ^a	7.61 ± 0.61 ^a	Detected
P1	7.69 ± 0.06 ^d	6.95 ± 0.03 ^c	7.09 ± 0.04 ^b	9.92 ± 0.06 ^d	5.57 ± 0.05 ^b	3.66 ± 0.42 ^a	10.04 ± 0.06 ^d	10.04 ± 0.20 ^c	10.04 ± 0.20 ^c	Detected
P2	8.02 ± 0.00 ^f	7.36 ± 0.71 ^a	6.33 ± 0.71 ^a	8.18 ± 0.00 ^b	3.78 ± 0.71 ^a	5.65 ± 0.23 ^c	7.37 ± 0.10 ^b	7.07 ± 0.15 ^a	7.07 ± 0.15 ^a	Detected
P3	7.38 ± 0.06 ^e	6.85 ± 0.08 ^e	7.01 ± 0.08 ^{abc}	9.98 ± 0.09 ^d	5.55 ± 0.14 ^a	4.36 ± 0.37 ^b	9.49 ± 0.24 ^d	8.80 ± 0.24 ^b	8.80 ± 0.24 ^b	Detected
P4	7.57 ± 0.04 ^e	6.63 ± 0.09 ^e	7.60 ± 0.07 ^c	10.00 ± 0.02 ^d	6.69 ± 0.07 ^c	4.73 ± 0.07 ^a	9.32 ± 0.20 ^b	9.15 ± 0.25 ^b	9.15 ± 0.25 ^b	Detected
P5	6.64 ± 0.03 ^a	6.46 ± 0.12 ^a	6.76 ± 0.10 ^{ab}	8.82 ± 0.12 ^c	6.84 ± 0.15 ^c	4.94 ± 0.06 ^b	8.86 ± 0.45 ^b	8.76 ± 0.30 ^b	8.76 ± 0.30 ^b	Absent
P6	6.93 ± 0.06 ^b	6.71 ± 0.15 ^a	6.77 ± 0.04 ^{ab}	7.62 ± 0.02 ^c	7.29 ± 0.03 ^c	6.17 ± 0.02 ^c	9.04 ± 0.00 ^a	8.54 ± 0.71 ^b	8.54 ± 0.71 ^b	Absent
U1	7.81 ± 0.20 ^b	6.94 ± 0.06 ^e	7.07 ± 0.05 ^a	9.87 ± 0.05 ^c	5.83 ± 0.09 ^c	5.12 ± 0.22 ^c	9.07 ± 0.15 ^a	9.07 ± 0.15 ^a	9.07 ± 0.15 ^a	Absent
U2	7.84 ± 0.09 ^b	7.03 ± 0.05 ^b	6.97 ± 0.03 ^a	9.88 ± 0.11 ^c	5.49 ± 0.01 ^b	4.26 ± 0.34 ^a	9.39 ± 0.16 ^d	8.75 ± 0.17 ^d	8.75 ± 0.17 ^d	Detected
U3	7.61 ± 0.15 ^b	8.16 ± 0.66 ^b	9.15 ± 0.69 ^b	7.57 ± 0.20 ^b	3.23 ± 0.00 ^a	4.69 ± 0.09 ^b	8.25 ± 0.10 ^c	8.25 ± 0.10 ^c	8.25 ± 0.10 ^c	Detected
U4	6.88 ± 0.07 ^a	5.51 ± 0.09 ^b	6.66 ± 0.08 ^a	6.83 ± 0.18 ^a	7.17 ± 0.04 ^a	5.07 ± 0.10 ^c	6.50 ± 0.07 ^a	6.50 ± 0.07 ^a	6.50 ± 0.07 ^a	Detected
U5	6.95 ± 0.07 ^a	5.63 ± 0.05 ^b	6.79 ± 0.07 ^a	6.83 ± 0.07 ^a	7.04 ± 0.06 ^a	5.86 ± 0.01 ^a	6.72 ± 0.23 ^b	6.38 ± 0.09 ^a	6.38 ± 0.09 ^a	Detected
U6	6.69 ± 0.04 ^a	5.54 ± 0.10 ^f	6.89 ± 0.01 ^a	6.73 ± 0.05 ^a	7.29 ± 0.03 ^c	4.74 ± 0.06 ^{a,c}	8.04 ± 0.00 ^b	7.42 ± 0.34 ^a	7.42 ± 0.34 ^a	Detected

Values represent the means ± standard deviation ($n = 2$). Different superscripts indicate statistical differences ($P < 0.05$) among dairies. AMB, aerobic mesophilic bacteria; FCB, faecal coliform bacteria; MY, mould/yeast; S, *Salmonella* spp.; TCB, total coliform bacteria.

^aValues are expressed in log₁₀ MPN/g.

^bValues are expressed in log₁₀ MPN/g.

The TCB concentration was consistent with the reported by Renye *et al.* (2008) in cheese made from raw milk. The high concentrations of TCB may have an important role in sensory characteristics (Davidson 2004). Furthermore, their presence is not necessarily an index of the occurrence of pathogenic bacteria, but if a lack of good manufacturing practices (Davidson 2004; Trmić *et al.* 2016; Chavez-Martinez *et al.* 2019).

The presence of pathogenic bacteria (*S. aureus*, *Salmonella* and *L. monocytogenes*) may represent a health risk (Chavez-Martinez *et al.* 2019). Because of this, Mexican legislation establishes that must be absent in foods (Secretaría de Salud, 2010a, 2010b). The occurrence of these bacteria in some cheese factories may be probably due to the initial bacterial load in the raw milk (Godínez-Oviedo *et al.* 2020), although *L. monocytogenes* was absent in all samples analysed in our study.

On the other hand, the presumptive LAB concentrations were for *Lactococcus* (5.6–8.0 log₁₀ cfu/g), *Streptococcus* (5.9–7.0 log₁₀ cfu/g) and *Lactobacillus* (6.2–8.2 log₁₀ cfu/g). The concentrations of *Streptococcus* and *Lactococcus* were similar in all regions, implying that all cheeses have mesophilic and thermophilic LAB. LAB are generally recognised as safe and also generate compounds derived from their metabolism, that often provide the most desirable sensory characteristics in artisanal cheeses (Ballesteros *et al.* 2006; Franz *et al.* 2010). Actually, it is well known that these cheeses are characterised by presenting more intense flavour than industrial cheeses, and the native LAB are the main responsible of this characteristic (Montel *et al.* 2014). Several LAB strains isolated of raw milk and artisanal cheese have been shown the potential for the production of aroma (Gutiérrez-Méndez *et al.* 2008; Reyes-Díaz *et al.* 2019), potential probiotic and immunomodulatory activity (Santiago-López *et al.* 2018a; Santiago-López *et al.* 2018b).

Additionally, the analysis of the PCA shows the grouping of the dairies considering the concentration of each of the microorganisms analysed (Figure 1B). Three main groups were identified by the k-means cluster analysis: group A (M1, M3–M6, P1, P3–P6 and U1–U2), group B (M2, U3 and P2), and group C (U4, U5 and U6). In particular, the cheeses grouped in cluster A showed the highest presumptive LAB, AMB, TCB, FCB and *E. coli*. The grouping of the dairies considering the microbial concentration was similar to the grouping, considering seven dairies (M1, M3, M4, M6, P6, U1 and U2), for the physicochemical composition (Figure 1A). These data suggest that the production process and the characteristics of the raw material could be standardised in these dairies.

Characterisation of microbiota by sequencing

A total of 1 179 522 pair-end from 1,789,375 raw reads were selected by size including the removal of chimeras, achieving an average of 54 673 reads per sample. The

rarefaction curves showed the formation of an asymptote, which ensures that all the sequences obtained are enough to represent the diversity of OTU's present in the samples (Chao and Jost, 2012). The taxonomic analysis allowed to identify 4 phylum, being *Firmicutes* with 55.4%–99.03% of relative abundance (RA) the most predominant phylum, followed by *Proteobacteria* (0.38%–44.58% RA), *Actinobacteria* (0%–1.21% RA) and *Bacteroidetes* (0%–1.04% RA), and were identified 34 families and 78 genera as the microbiota representative of artisanal Fresco cheese (Figure 2).

On the other hand, the Shannon index allowed the determination of differences ($P < 0.05$) in bacterial diversity (1.17–2.26). The Simpson's dominance index, which directly indicates the number of dominant organisms (with higher RA), was 2.18–6.25, which implies that the Fresco cheese from Sonora presented from 2–6 dominant genera, without significant differences ($p > 0.05$) between dairies.

The correlation between physicochemical composition and bacterial diversity (Shannon and Simpson indexes) were significantly for carbohydrates content and Simpson's index. In this sense, the Simpson's index showed a value of $r = -0.64$ ($P = 0.05$). These correlations may be attributed to the presence of bacterial communities used the carbohydrates availability, and then decrease their concentration. Likewise, this indicates that a less concentration of carbohydrates in Fresco cheese is related to a greater amount of dominant species. Interestingly, neither pH nor acidity showed a significant relationship with the determined diversity indices. This could be due to factors such as the level of salt in the curd, and the composition of the cheese, which could affect the viability of the LAB, keeping the acid and pH values stable (Hou *et al.* 2012). Therefore, the amount of carbohydrates available is an important indication of the bacterial structure of cheese.

Regarding the above, the bacteria that presented the highest AR, and therefore the highest dominance, were those belonging to the phylum Firmicutes. The phylum *Firmicutes* was represented by the family *Streptococcaceae* (52.87% RA), *Lactobacillaceae* (9.61% RA), *Leuconostocaceae* (7.19%) and *Enterococcaceae* (2.39% RA). For the family of *Streptococcaceae*, *Lactobacillales* and *Leuconostocaceae*, the genus representative were *Lactococcus* (28.22% RA), *Streptococcus* (16.08% RA), *Lactobacillus* (8.03% RA) and *Leuconostoc* (6.82% RA).

The *Proteobacteria* phylum was represented by the families *Enterobacteriaceae* (13.64% RA), *Oceanospirillaceae* (5.83% RA) and *Aeromonadaceae* (1.39% RA) meanwhile, the *Actinobacteria* phylum was represented by the families *Bifidobacterium* and *Micrococcaceae*. In this sense, some *Bifidobacterium* have been reported in dairy products, although they have not been characterized as a common part of the cheese microbiota (Boylston *et al.* 2004).

Kocuria and *Rothia* genus from *Micrococcaceae* have been identified in raw milk (Giannino *et al.* 2009). Renye

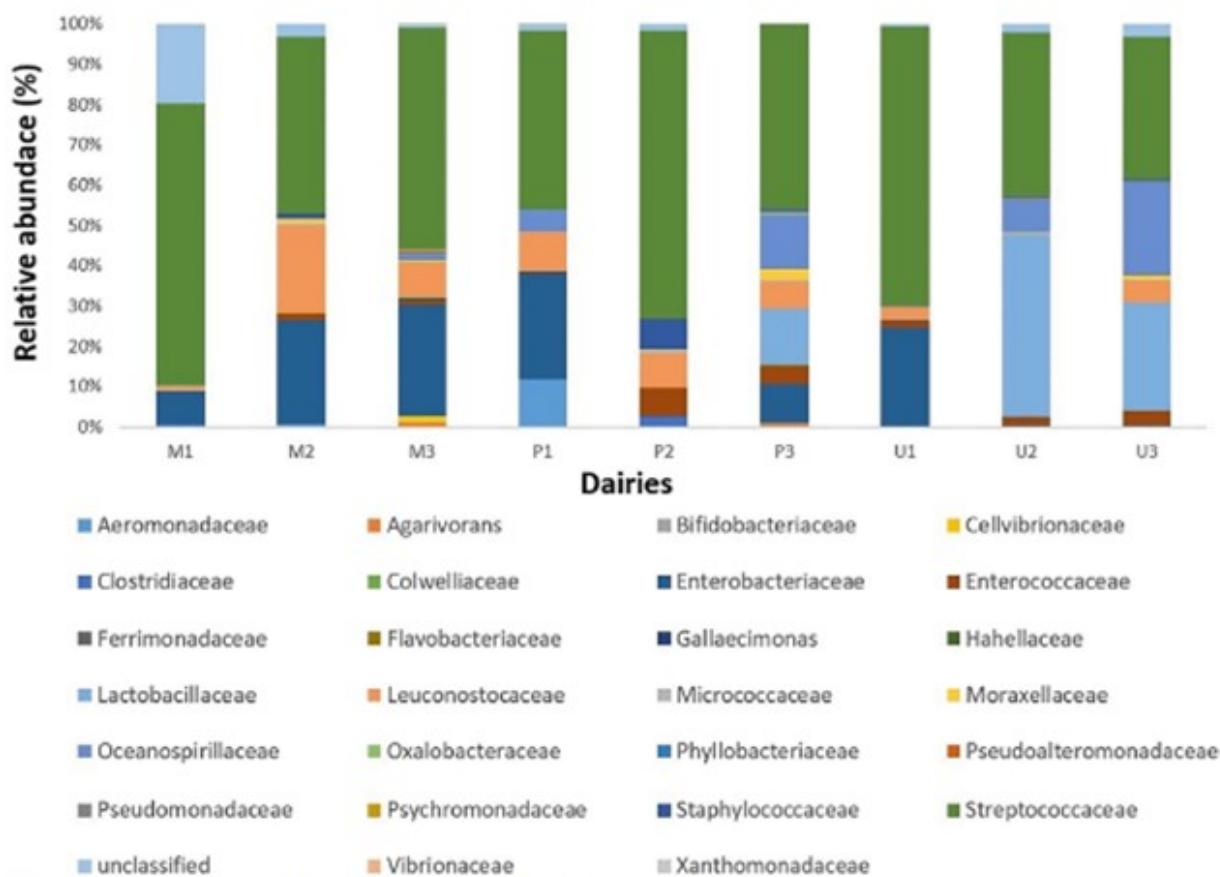


Figure 2 Structure of the bacterial communities of artisanal Fresco cheese from Sonora.

et al. (2008) isolated *Kocuria* strains from Fresco cheese from Mexico. Centeno *et al.* (2017) have been added this microorganism as an adjunct bacterial culture, due to their proteolytic and lipolytic capacity, for the cheesemaking of Tetilla cheese from Spain, made from pasteurised milk (Centeno *et al.* 2017).

Variations in the diversity index and RA of the dominant genus differed among dairies from the same region. Therefore, a Venn diagram was made to identify which bacterial groups are shared among the study regions (Figure 3A). Sixteen families were shared for the three regions (Mazatlán, Pueblo de Álamos and Ures). The main bacterial families were *Streptococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* and *Oceanospirillaceae* with 89.14% of the total abundance. The genera most representative were *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, with 77.80%, which are common in some type of cheeses (Murugesan *et al.* 2018). For instance, *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Streptococcus* have been used as starter cultures in Fresco cheese made with pasteurised milk (Tunick and Hekken, 2010; Cruciata *et al.* 2014).

Notably, *Lactococcus* genus have been the most representative in the microbiota of artisanal Mexican cheeses, such as Poro (Aldrete-Tapia *et al.* 2014) and Cotija (Chombo-Morales *et al.* 2016). In particular, this genus has been isolated from cheeses and demonstrated their ability to generate aromas and flavours (Carafa *et al.* 2018; Van Mastrigt *et al.* 2019), or showed antagonistic effect against *L. monocytogenes* due to their bacteriocins production (Oliveira *et al.* 2019). Likewise, studies based on sensory evaluation and analysis of volatile compounds have shown that native *L.lactis* strains can be considered as a possible starter culture for the production of Fresco cheeses (Reyes-Díaz *et al.* 2019).

On the other hand, the presence of *Leuconostoc* genus is less common in the microbiota of artisanal cheeses; however, it has been abundant in some artisanal Mexican cheeses such as Cotija (Escobar-Zepeda *et al.* 2016) and Asadero (Murugesan *et al.* 2018). However, in Fresco cheese from Sonora was present in high abundance (6.82% RA). Strains of this genus have been studied for their ability to generate desirable aromas, as well as for its antimicrobial

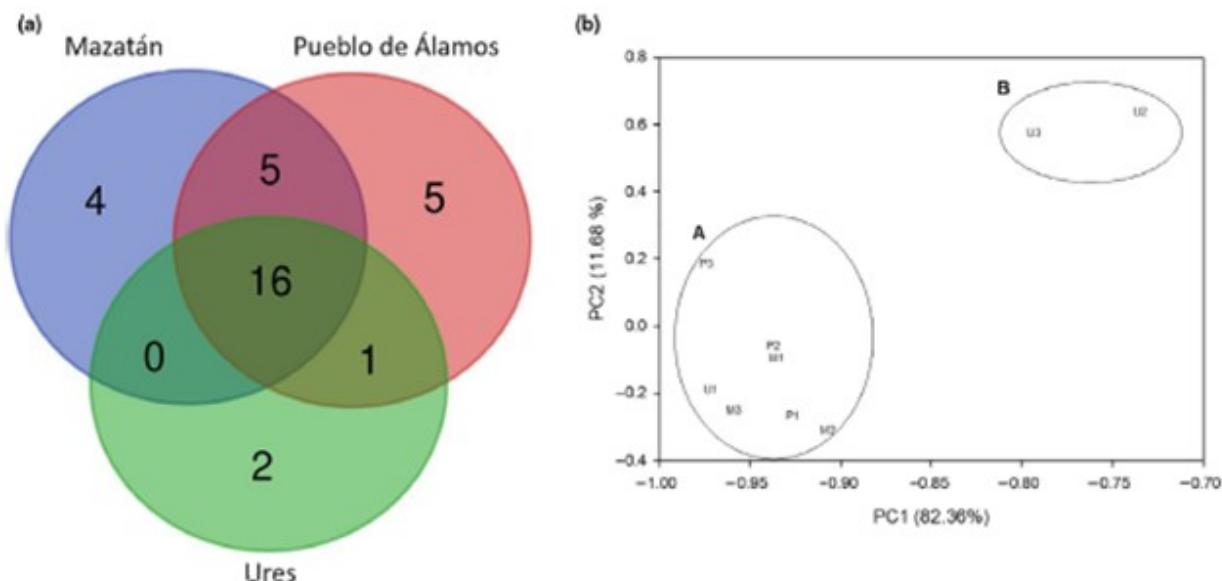


Figure 3 Grouping of microbial communities. (a) Venn diagram and (b) principal components analysis.

potential (Gutiérrez-Méndez *et al.* 2008). On the other hand, *Enterococcus* has been studied for multiple applications such as starter in fermented milk, probiotic capacity, production of bacteriocins, among others (Silva *et al.* 2018; Baccouri *et al.* 2019). However, its use as limited for some species due to shown resistance to multiple antibiotics (Hanchi *et al.* 2018).

The *Marinomonas* genus (2.80% RA) are halophilic bacteria that have been identified in artisanal Mexican cheeses such as Ranchero and Adobera (Kang *et al.* 2012; Murugesan *et al.* 2018). Other halophilic bacteria such as *Alkalibacterium* and *Marinilactibacillus* have been reported in Cotija cheese as part of subdominant microbiota (Murugesan *et al.* 2018).

Genus of psychrotrophic bacteria such as *Salmonella*, *Buttiauxella*, *Psychrobacter*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* and *Yersinia* were identified. In specific, *Salmonella* was presented in 6 of the 9 dairies analysed as it was detected by conventional microbiology. All the microorganisms found in the artisanal Sonoran Fresco cheese may be representative of raw milk used, as well as the processing conditions (Schmidt 2008; Kousti *et al.* 2010).

On the other hand, the *Aeromonadaceae* has been detected as part of the abundant microbiota in cheeses such as Adobera, Ranchero, Cotija and Panela (Murugesan *et al.* 2018) and members of *Micrococcaceae* family like *Kocuria* and *Rothia* genus have been found in raw milk and raw milk curd where they disappear after light heat treatments (Giannino *et al.* 2009). *Kocuria*, in particular, has been

added as an adjunct bacterial culture due to its proteolytic and lipolytic capacity together with selected starter cultures in order to give traditional characteristics to cheeses made from pasteurised milk (Centeno *et al.* 2017).

To complement our results, a PCA analysis of the RA was performed (Figure 3B). The k-means cluster analysis showed two main groups: group A (M1, M2, M3, P1, P2, P3 and U1), and group B only included cheeses from dairies located in Ures (U2, U3). According to the microbial diversity, this PCA allowed defining that the most representative genera for artisanal Fresco cheese from Sonora in group A were *Lactococcus*, *Streptococcus* and *Leuconostoc*.

In summary, our results provide an insight in the microbial community of artisanal Fresco cheese from Sonora. Likewise, it can be seen that this diversity is generated even among cheesemakers in the same region. All these factors can be summarised in the fact that the artisanal products do not have a standardised process (Schmidt 2008; Kousti *et al.* 2010).

In the last years, the current consumption of artisanal cheeses has been enhanced due to characteristics and typical flavour (Bae *et al.* 2017). In particular, the presence of all their microbial diversity participates in conferring desirable characteristics demanded by the traditional and assertive consumers. Unfortunately, it is necessary to consider that the lack of standardised processes may limit the commercialisation because of not complying standards or due to the competition with industrial cheeses. Nevertheless, artisanal cheeses have important possibilities to maintain their commercialisation if good manufacturing practices are applied

since its typicity in flavour and aroma are widely recognised and revalorised. Besides, their native LAB may give them important beneficial claims of scientific interest in technological and health applications.

CONCLUSIONS

The physicochemical and microbiological characteristics from artisanal Fresco cheese from Sonora were represented by dairies from Mazatlán and Pueblo de Alamos. Additionally, the microbial concentration to show the lack of good manufacturing processes. The high-throughput sequencing allowed us to identify the great bacterial diversity found in Fresco cheese, which was represented by more of 80 genera, of which the LAB as *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Leuconostoc* were the most abundant and may be considering for future items.

All these results are indispensable since contribute to improving processes in order to obtain better quality products that may help to apply for a type of legal protection to the cheese producers such as a collective trademark.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge a graduate scholarship from the National Council for Science and Technology (CONACyT) of Mexico to author José I. Méndez-Romero. Special grateful acknowledge for IBQ, Karen Enciso Ibarra of Coordinación Regional Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental by the supports the sequencing and analysis of the samples.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interests.

AUTHOR CONTRIBUTION

Isidro Méndez-Romero: Formal analysis, Methodology, Writing-original draft. **Ricardo Reyes-Díaz:** Formal analysis, Methodology. **Lourdes Santiago-López:** Investigation, Supervision, Writing-original draft. **Adrián Hernández-Mendoza:** Investigation, Supervision, Writing-review & editing. **Belinda Vallejo-Córdoba:** Methodology, Supervision, Validation. **Sonia Sayago-Ayerdi:** Investigation, Visualization, Writing-review & editing. **Bruno Gómez-Gil:** Data curation, Methodology, Software. **Aarón González-Córdoba:** Conceptualization, Data curation, Investigation, Methodology, Project administration, Writing-review & editing.

FUNDING INFORMATION

This study was supported by the Mexican Council of Science and Technology (CONACyT; México City, México) research projects 60305.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

REFERENCES

- Akrete-Tapia A, Escobar-Ramírez M C, Tamplin M L and Hernández-Burriaga M (2014) High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. *Food Microbiology* **44** 136–141.
- Association of Official Analytical Chemists International (AOAC) (2000) *Official Methods of Analysis of A.O.A.C. International: agricultural chemicals, contaminants, drugs*, 17a Edición. MD, EEUU.
- Awasti N and Anand S (2020) The role of yeast and molds in dairy industry: An update. In *Dairy Processing: Advanced Research to Applications*, pp. 243–262. Minj J, Sudhakaran V A and Kumari A, eds. Singapore: Springer.
- Baccouri O, Boukef A M, Farhat L B et al. (2019) Probiotic potential and safety evaluation of *Enterococcus faecalis* (E) OB14 and OB15, isolated from traditional tunisian testouri cheese and rigotta, using physiological and genomic analysis. *Frontiers in Microbiology* **10** 881.
- Bae I, Park J H, Choi H Y and Jung H K (2017) Emerging innovations to reduce the salt content in cheese; effects of salt on flavor, texture, and shelf life of cheese; and current salt usage: A review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* **37** 793–798.
- Ballesteros C, Poveda J M, González-Vinas M A, Cabezas L, Méndez J I and González-Cordoba A (2006) Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control* **17** 249–255.
- Banjara N, Suh M J and Hallen-Adams H E (2015) Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. *Current Microbiology* **70** 792–800.
- Boylston T D, Vinderola C G, Ghoddusi H B and Reinheimer J A (2004) Incorporation of bifidobacteria into cheeses: Challenges and rewards. *Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. International Dairy Journal* **14** 375–387.
- Carafa I, Stocco G, Franceschi P, Summer A, Tuohy K M, Bittante G and Franciosi E (2018) Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter and non-starter cultures for the production of Traditional Mountain cheese. *Food Research International* **115** 209–218.
- Carvajal-Moreno M, Vargas-Ortiz M, Hernández-Camarillo E, Ruiz-Velasco S and Rojo-Callejas F (2019) Presence of unreported carcinogens, aflatoxins and their hydroxylated metabolites, in industrialized oaxaca cheese from Mexico city. *Food and Chemical Toxicology* **124** 128–138.
- Centeno J A, Garabal J I, Docampo F, Lorenzo J M and Carballo J (2017) Recovering traditional raw-milk Tetilla cheese flavor and sensory attributes by using *Kocuria varians* and *Yarrowia lipolytica* adjunct cultures. *International Journal of Food Microbiology* **251** 33–40.
- Chao A and Jost L (2012) Coverage-based rarefaction and extrapolation: standardizing samples by completeness rather than size. *Ecology* **93** 2533–2547.
- Chavez-Martinez A, Paredes-Montoya P, Renteria-Monterrubio A L, Corral-Luna A, Lechuga-Valles R, Dominguez-Viveros J, Sanchez-Vega R and Santellano-Estrada E (2019) Microbial quality and prevalence

- of foodborne pathogens of cheeses commercialized at different retail points in Mexico. *Food Science and Technology* **39**(suppl 2) 703–710.
- Chombo-Monales P, Kirchmayr M, Gschaeffer A, Lugo-Cervantes E and Villanueva-Rodríguez S (2016) Effects of controlling ripening conditions on the dynamics of the native microbial population of Mexican artisanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE. *LWT - Food Science and Technology* **65** 1153–1161.
- Cruciata M, Sannino C, Ercolini D, Scatassa M L, De Filippis F, Manuccio I, La Storia A, Moschetti G and Settanni L (2014) Animal rennets as sources of dairy lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **80** 2050–2061.
- Cuevas-González P F, Heredia-Castro P Y, Méndez-Romero J I, Hernández-Mendoza A, Reyes-Díaz R, Vallejo-Córdoba B and González-Córdova A F (2017) Artisanal Sonoran cheese (Cocido cheese): an exploration of its production process, chemical composition and microbiological quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **97** 4459–4466.
- Davison P M, Roth L A and Gambrel-Lenarz S A (2004) Coliform and other indicator bacteria. In *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, 17th edn, pp. 187–226. Wehr H M and Frank J F eds. Washington, DC: American Public Health Association.
- De la Rosa-Alcaraz M Á, Ortiz-Estrada Á M, Heredia-Castro P Y, Hernández-Mendoza A, Reyes-Díaz R, Vallejo-Córdoba B and González-Córdova A F (2020) Poro de Tabasco cheese: Chemical composition and microbiological quality during its artisanal manufacturing process. *Journal of Dairy Science* **103** 3025–3037.
- Dobson A D (2017) Mycotoxins in cheese. In *Cheese*, pp. 595–601. McSweeney P L H, Fox P F, Cotter P D and Everett D W, eds. Cambridge, MA: Academic Press.
- Edgar R C (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26** 2460–2461.
- Escobar-Zepeda A, Sanchez-Flores A and Quinisco Baruch M (2016) Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology* **57** 116–127.
- Franz C M A P, Cho G S, Holzapfel W H and Gilvez A (2010) Safety of lactic acid bacteria. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications* **2** 341–359.
- Giannino M L, Marzotto M, Dellaglio F and Feligini M (2009) Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* **130** 188–195.
- Godínez-Oviedo A, Tamplin M L, Bowman J P and Hernández-Iturriaga M (2020) *Salmonella enterica* in Mexico 2000–2017: Epidemiology, antimicrobial resistance, and prevalence in food. *Foodborne Pathogens and Disease* **17** 98–118.
- González-Córdova A F, Yesca C, Ortiz-Estrada Á M, De la Rosa-Alcaraz M Á, Hernández-Mendoza A and Vallejo-Córdoba B (2016) Invited review: Artisanal Mexican cheeses. *Journal of Dairy Science* **99** 3250–3262.
- Gutiérrez-Méndez N, Vallejo-Córdoba B, González-Córdova A F, Nevárez-Moorillón G V and Rivera-Chavín B (2008) Evaluation of aroma generation of *Lactococcus lactis* with an electronic. *Journal of Dairy Science* **91** 49–57.
- Guzman-Hernandez R, Contreras-Rodriguez A, Hernandez-Velez R, Perez-Martinez I, Lopez-Merino A, Zaidi M B and Estrada-Garcia T (2016) Mexican unpasteurised fresh cheeses are contaminated with *Salmonella* spp., non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* and potential uropathogenic *E. coli* strains: A public health risk. *International Journal of Food Microbiology* **237** 10–16.
- Hammer Ø, Harper D A T and Ryan P D (2013) National knowledge resource consortium - A national gateway of S&T on-line resources for CSIR and DST laboratories. *Current Science* **105** 1352–1357.
- Hanchi H, Motiawea W, Sehei K and Hammami R (2018) The genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concerns—an update. *Frontiers in Microbiology* **9** 1–16.
- Hernández M. (2012) Elementos para la activación de la cadena láctea en los DDR 142 Ures y 145 Mazatlán, Sonora. Una propuesta bajo la perspectiva del Sistema Agroalimentario Localizado. Extensionismo y gestión territorial para el desarrollo rural. IIICA, INCA, SAGARPA.
- Hernández, M. C., and Ochoa J. L. Dinámicas colectivas en una región quesera de Sonora. análisis desde la perspectiva de los sistemas agroalimentarios localizados. In 13er. Congreso Nacional de Investigación Socioeconómica y Ambiental de la Producción Pecuaria (p. 191).
- Hou J, Hannon J A, McSweeney P L, Beresford T P and Guinee T P (2012) Effect of curd washing on composition, lactose metabolism, pH, and the growth of non-starter lactic acid bacteria in full-fat Cheddar cheese. *International Dairy Journal* **25** 21–28.
- Huse S M, Dethlefsen L, Huber J A, Welch D M, Relman D A and Sogin M L (2008) Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genetics* **4** e1000255.
- Kang I, Jang H, Oh H-M and Cho J-C (2012) Complete genome sequence of Marinomonas bacteriophage PI2026. *Journal of Virology* **86** 8909–8910.
- Kousta M, Mataragas M, Skandamis P and Drosinos E H (2010) Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control* **21** 805–815.
- Kure C F and Skaar I (2019) The fungal problem in cheese industry. *Current Opinion in Food Science* **29** 14–19.
- Marín P, Palmero D and Jurado M (2015) Occurrence of moulds associated with ovine raw milk and cheeses of the Spanish region of Castilla La Mancha. *International Journal of Dairy Technology* **68** 565–572.
- McSweeney P L H (2004) Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology* **57** 127–144.
- Montel M, Buchin S, Mallet A, Delbes-Paus C, Vuitton D A, Desnárees N and Bethier F (2014) Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology* **177** 136–154.
- Murugesan Selvasankar, Reyes-Mata Maria Paulina, Nirmalkar Khemlal et al. (2018) Profiling of bacterial and fungal communities of Mexican cheeses by high throughput DNA sequencing. *Food Research International* **113** 371–381.
- Nanu E, Latha C, Sunil B, Prejith, Thomas M and Menon K V (2007) Quality assurance and public health safety of raw milk at the production point. *American Journal of Food Technology* **2** 145–152.
- Oliveira D, Mitiko M, Bittencourt C S, Ferreira T, Neves S, Lúcia A and Penna B (2019) Monocytogenes growth and impacts on fatty acids profile and conjugated linoleic acid content in fermented cream. *LWT - Food Science and Technology* **107** 264–271.

- Park J and Kim M (2013) Comparison of dry medium culture plates for mesophilic aerobic bacteria in milk, ice cream, ham, and codfish fillet products. *Preventive Nutrition and Food Science* **18** 269–272.
- Pitt J I and Hocking A D (2009). *Fungi and food spoilage*, 3rd edn, Vol. 519. New York, NY: Springer.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P and Glöckner F O (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* **41** 590–596.
- Renye J A, Somkuti G A, Vallejo-Cordoba B, Van Hekken D L and González-Córdoba A F (2008) Queso fresco made from raw and pasteurized milk. *Journal of Food Safety* **28** 59–75.
- Reyes-Díaz R, González-Córdoba A F, Estrada-Montoya M C, Méndez-Romero J I, Mazorra-Manzano M A, Soto-Valdez H and Vallejo-Cordoba B (2019) Volatile and sensory evaluation of Mexican Fresco cheese as affected by specific wild *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science* **103** 242–253.
- Rojas-Marín V, Carvajal-Moreno M, González-Villaseñor M C, García-Hernández E A and González-Mendoza A (2018) Presence of aflatoxin carcinogens in fresh and mature cheeses. *Pharmaceutica Analytica Acta* **9** 581.
- Santiago-López L, Aguilar-Toalá J E, Hernández-Mendoza A, Vallejo-Cordoba B, Liceaga A M and González-Córdoba A F (2018) Invited review: Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption. *Journal of Dairy Science* **101** 3742–3757.
- Santiago-López L, Hernández-Mendoza A, Mata-Haro V, Vallejo-Cordoba B and González-Córdoba A F (2018) Immune response induced by fermented milk with potential probiotic strains isolated from artisanal cocido cheese. *Food and Agricultural Immunology* **29** 911–929.
- Schmidt R H (2008) Microbiological considerations related to dairy processing. *Dairy Processing and Quality Assurance* **25** 105–143.
- Secretaría de Salud (1994) *NOM-091-SSA1-1994. Bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias*. Mexico: Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación. URL: <http://www.salud.gob.mx/unidades/dof/nom/091ssa14.html>. Accessed 4/2018.
- Secretaría de Salud (2010a) *NOM-243-SSA1-2010. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba*. Mexico: Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación. URL: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5160755&fecha=27/09/2010. Accessed 13/7/2015.
- Secretaría de Salud (2010b) *NOM-243-SSA1-2010. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba*. Diario Oficial de la Federación. URL: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5160755&fecha=27/09/2010. Accessed 13/7/2015.
- Silva C, Silva S and Ribeiro S C (2018) Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in Microbiology* **9** 594.
- Torres-Llano M J, Vallejo-Cordoba B, Díaz-Cinco M E, Mazorra-Manzano M A and González-Córdoba A F (2006) Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. *Food Control* **17** 683–690.
- Trnčić A, Chauhan K, Kent D J, Ralyea R D, Martin N H, Boor K J and Wiedmann M (2016) Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. *Journal of Dairy Science* **99** 6105–6120.
- Tunick M H (2007) Hispanic dairy products. In *Hispanic Foods: Chemistry and Flavor*, pp. 33–43. Tunick D M H and González de Mejía E eds., Washington, DC: American Chemical Society. ACS Symposium Series 946.
- Tunick M H and Van Hekken D L (2010) Rheology and texture of commercial queso fresco cheeses made from raw and pasteurized milk. *Journal of Food Quality* **33** 204–215.
- Tunick M H, Van Hekken D L, Iandola S K and Tomasula P M (2012) Characterization of Queso Fresco during storage at 4 and 10°C. *Journal of Food Research* **1** 308–319.
- Urbán G, Pérez J, Martínez F, Salas J, Díaz G, Ramírez M L and Escobar A (2009) Niveles de aflatoxina M1 en quesos frescos producidos en diferentes zonas de México. *Revista de Salud Animal* **31** 115–121.
- Van Hekken Diane L and Farkye N Y (2003) Hispanic cheeses: The quest for queso. *Food Technology* **57** 32–38.
- Van Hekken D L, Tunick M H, Leggett L N and Tomasula P M (2012) Impact of curd milling on the chemical, functional and rheological. *Journal of Dairy Science* **95** 5527–5535.
- Van Mastrigt O, Egas R A, Abee T and Smid E J (2019) Aroma formation in reconstituted co-cultures of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Food Microbiology* **82** 151–159.
- Villegas de Gante A and Cervantes-Escoto F (2011) Genuineness and typicity in the revalorization. *Estudios Sociales* **19** 126–164.
- Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner F O, Ludwig W, Schleifer K-H, Whitman W B, Euzéby J, Amann R and Rosselló-Móra R (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology* **12** 635–645.
- Yoon S H, Ha S M, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H and Chun J (2017) Introducing EzBioCloud: A taxonomically unified database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **67**, 1613–1617.

3. GENOMIC ANALYSIS OF THE CRISPR-CAS SYSTEM IN *Limosilactobacillus fermentum* STRAINS ISOLATED FROM MEXICAN ARTISANAL COCIDO CHEESE.

José I. Méndez-Romero^a, Guillermo Pastor-Palacios^b, Ricardo Reyes-Díaz^a, Adrián Hernández-Mendoza^a, Belinda Vallejo-Cordoba^a, Aarón F. González-Córdova^{a*}

^aLaboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos and Calidad, Autenticidad y Trazabilidad de los Alimentos. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD). Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas # 46. Hermosillo, Sonora, México. 83304

^bCONACYT-Consorcio de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas, Instituto 11 Potosinode Investigación Científica y Tecnológica A.C, San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico. 12 78216.

*Corresponding author: aaronglz@ciad.mx

Manuscript submitted to the Editor of International Journal of Food Microbiology

November 2021

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) are highly appreciated by the food industry due to their diverse technological applications, mainly for the production of dairy foods. The LAB viability is usually affected by bacteriophages since they use the bacterial cellular machinery to replicate their genetic material. In this sense, the CRISPR-Cas system is an adaptive immune system that protects bacteria against bacteriophages through the RNA-guided nuclease system. In previous studies, *Limosilactobacillus fermentum* strains J23 and J28, isolated from Mexican artisanal Cocido cheese showed important bioactivities such as potential probiotic, immunomodulatory and antimicrobial effects. The objective of this study was to analyze by bioinformatic methods the CRISPR-Cas system in J23 and J28 strains. Genomes of the study strains were sequenced by a high throughput sequencing analysis and by bioinformatic analyses. The presence of two CRISPR-Cas loci in each were determined, the I-E and type II-A systems; both specialized in the degradation of invasive double-stranded DNA, such as DNA phages and plasmids. Besides, the analysis of the CRISPR spacers allowed to know the record of previous attacks on the bacteria and interestingly, their sequences matched to the bacterial genome, plasmids, but mainly to those of phages. In the last case, such spacers showed homology with genes related to the phage tail, lysogeny, capsid, among others. These data suggest that strains J23 and J28 possess CRISPR-Cas systems that may positively operate against phages make them viable for different technological uses.

Keywords: CRISPR-Cas, Lactic Acid Bacteria, Spacers, Phages

1. Introduction

Limosilactobacillus fermentum (*L. fermentum*) (known as *Lactobacillus fermentum* up to 2020 (Zheng *et al.*, 2020) is a Gram-positive bacteria that has a widely recognized as beneficial on human health supported by a large number of studies and also for food safety and preservation (Bintsis, 2018; Naghmouchi *et al.*, 2019). Therefore, several strains belonging to this specie have been focus of assessing scientific studies related to the production of bioactive compounds and specific technological uses evidencing new and substantial applications. In previous studies, specific strains of *L. fermentum* (J23 and J28) isolated from Mexican artisanal Cocido cheese, have demonstrated to being potential starter cultures for the production of fermented milk with potential probiotic and immunomodulatory capacities (Reyes-Díaz *et al.*, 2018; Santiago-López *et al.*, 2018). Additionally, J23 has been shown to produce bacteriocins against pathogens such as *Listeria*

monocytogenes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Salmonella choleraesuis* evidencing its high potential use for food safety and preservation (Heredia-Castro *et al.*, 2015; Heredia-Castro *et al.*, 2021).

Nevertheless, all above applications and bioactivities may be affected because of the presence of bacteriophages (phages) in the environment (Briggiler-Marcó *et al.*, 2012). These phages are viruses that infect bacteria and are considered their main predators because are obligated to use the cellular machinery with the purpose of reproduction (Koskella and Brockhurst, 2014). Phages are ubiquitous, it is estimated that on average there are 10 phages for each bacteria and their concentration may be higher in niches with high bacterial concentrations, such as fermentative processes. In addition, they can support pasteurization (Briggiler-Marcó *et al.*, 2012) in a manner that they may be consider as a biologic opportunistic entities, difficult to eliminate completely, capable to modify the bacterial microbiota of any niche, attacking susceptible bacteria through an infection process.

Among different defense mechanisms displayed by bacteria, the CRISPR-Cas system is one of the most robust mechanisms of bacteria against phages allowing to acquire adaptive immunity (Labrie *et al.*, 2010). This system can be compatible with another mechanisms, such as restriction-modification (RM), increasing the phage resistance (Dupuis *et al.*, 2013). Besides, CRISPR-Cas may also act against different mobile genetic agents (MGE), such as plasmids and transposons (Bikard *et al.*, 2012; Mills *et al.*, 2010). CRISPR-Cas is a very diverse system, even within the same species, which make it scientifically interesting to being explored (Koonin and Makarova, 2019). It consists of an array of the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) and the CRISPR-associated proteins (Cas), where CRISPR array that contain spacer sequences from phages and other MGE that constitute the immunity record of previous infections, while Cas proteins are responsible of all the system activity, that includes acquisition, expression and interference of the foreign DNA (Barrangou *et al.*, 2013).

Currently, the whole genome sequencing by high throughput sequencing (HTS) is a useful tool to explore basic features of the CRISPR-Cas system, such as *cas* genes and the organization and identification of the spacers and repetitions of the CRISPR array (Roberts and Barrangou, 2020). Then, when the system is identified and characterized by bioinformatic analysis from the bacterial genome, is a valuable information of its possible adaptation as a phage infection response in the

process of destination. Furthermore, this information may also be useful in order to carry different strategies to potentially activate the system against specific phage types and develop novel strains capable of promoting an optimum performance yield of their attributed benefits. In this study, the genome of strains J23 and J28 was analyzed by comparative genomics with genomes of related bacteria. The identification of elements of the CRISPR-CAS system will allow us to know their potential use even in adverse environments with the presence of phages.

2. Methods

2.1. Obtention and propagation of *L. fermentum* strains

Two strains of *L. fermentum* (J23 and J28), belonging to the Laboratory of Chemistry and Biotechnology of Dairy Products ceparium were obtained. This laboratory is located at the Research Center for Food and Development (CIAD), from Hermosillo, Sonora, Mexico. Both strains were previously isolated from Mexican artisanal Cocido cheese, identified by partial sequencing of the 16S rRNA gene and were stored in MRS broth (40% glycerol) at -80 °C (Heredia-Castro *et al.*, 2015). From these frozen pure strain cultures, two consecutive propagations were carried out by inoculating at 1% in Man, Rogosa, Sharpe (MRS) broth (Difcom Le Pont de Claix, France) and incubated in anaerobic conditions at 37 °C during 24 and 12 h, respectively. Subsequently, the cultures were seeded by streak plate method on MRS agar and incubated under the same conditions during 24 h to obtain colonies for further DNA extraction.

2.2. Whole-genome of *L. fermentum* J23 and J28 strains

2.2.1. DNA extraction, library preparation and high-throughput sequencing

Five representative colonies from each strain were taken and diluted into the Wizard® Genomic DNA purification kit buffer and the extraction was performed by following the supplier's procedure. The extracted DNA was resuspended in 50 uL of 10 mM Tris-HCl (pH 7.8) and the purity quality was determined on Nanodrop 2001 spectrophotometer (Thermofisher, CA, USA) at an absorbance ratio of 260/280 nm. Total DNA concentration was determined by spectrofluorometry with the HS dsDNA Assay kit (Thermofisher, USA, CA, OK) on a Qubit 4 equipment (Thermofisher, USA, CA, OK). The DNA was stored at -20 °C until its use for the construction of DNA libraries. Then, the libraries were prepared with the Nextera DNA Flex Library Prep kit (Illumina, CA, USA) following the supplier's procedure and were sequenced with the Illumina Miniseq Platform by using a Miniseq High Output Reagent Kit (300-cycles) with a

paired-end 150 cycle and the resulting raw DNA reads sequences, forward (R1) and reverse (R2), were obtained in fastq format.

2.2.2. *De novo* genome assembly, annotation and phylogenomic analyses

The quality of the raw reads was determined with the FastQC v 0.11.9 program, and they were filtered by quality with the Trimmomatic v 1.2.1 software (Bolger *et al.*, 2014). For this, the sliding window (4:15) and the MINLEN 36 options were set. The reads filtered were used to carry out the *De novo* genome assembly by using the SPAdes v3.11.0 software (Bankevich *et al.*, 2012). Afterwards, the quality of the assembly was determined with the QUAST v4.4 software (Gurevic *et al.*, 2013) and only the scaffolds over than 100 bases were kept. The genome annotation was carried out with the help of the Prokka v1.2 software (Seemann, 2014) and the PATRIC platform (Wattam *et al.*, 2014). The confirmation of the species of the strains J23 and J28 was carried out by means of the Average Nucleotide Identity (ANI) analysis (Yoon *et al.*, 2017), comparing against 15 reference genomes of *L. fermentum* (CP019030, CP016803, CP021964, CP031195, CP033371, CP034099, WHJL01000001, WHOF01000100, CP076446, CP076082, AP024320, JADDMW010000081, SEMJ01000100, CP040910, JAANTB010000099) downloaded from the NCBI database and a negative reference genome *Lactobacillus rhamnosus* (PKJX01000001).

2.3. Analysis of the CRISPR-Cas and prophages

The presence of the CRISPR-Cas system was determined and positively confirmed with the aid of two online platforms, CRISPRCasFinder (Couvin *et al.*, 2018) and CRISPRTyper (Russel *et al.*, 2020). Besides, the last platform was used to obtain a graphic representation of the CRISPR-Cas locus comprised of the *cas* genes and CRISPR arrays. Anti-CRISPR genes were searched within the genome sequenced with the AcrFinder platform (Yi *et al.*, 2020), focusing the search for these genes on both mobile and prophage genetic elements and using the default parameters mode. The CRISPR arrays, consisting of the spacers and repeats, as well as the repeated consensus, were determined and obtained from the CRISPRDetect. The prediction of the RNA secondary structure derived from the repeat consensuses were determined with the RNAFold platform on the default parameters mode. On the other hand, the CRISPR arrays obtained, in gff outputs, were concatenated for further analysis with the CRISPRStudio program (Dion *et al.*, 2018) to compare the spacers in order to obtain the common among the CRISPR arrays and then, to generate their

representative visualizations, which was manually edited with the aid to the Inkscape version 1.1.0 software.

The identification of the spacers was carried out with the CRISPRTarget platform (Biswas *et al.*, 2013); for this, the GenBank and IMVGR phage and plasmid databases were used. Also, with aid of the BLASTN platform, using the non-redundant nucleotide database was used to complement the identification. The similarity between the spacers of the CRISPR-Cas systems of the study strains and other *L. fermentum* strains was performed using the CRISPRdb-blast platform. The identification of spacers that presented complementarity with other regions of the genome different from the CRISPR-Cas locus (self-targeting spacers) were determined with the help of the CRISPRminer platform (Zhang *et al.*, 2018). The spacer sequences mapping was determined by locating their protospacer sequences to find the matches with specific genes of phages and plasmids. The protospacers with extra 10 nucleotides upstream and downstream were aligned to predict the Protospacer Adjacent Motif (PAM) sequence using the WebLogo platform (Crooks *et al.*, 2004). The neighborhood genes close to the CRISPR locus were identified by manual selection from the results of the Prokka annotation of the .fna annotated protein files.

Finally, with the gbk format files obtained from the Prokka annotation, the presence of phages, in a lysogenic state (prophages), was determined by using the PHASTER platform (Arndt *et al.*, 2016). Additionally, the restriction-modification (RM) in the study strains was also assessed as complementary system to the CRISPR-Cas; so that, a gene searching related to RM was carried out using the PATRIC platform.

3. Results

3.1. Genome features of *L. fermentum* J23 and J28 strains

Sequenced genomes sizes of the *L. fermentum* J23 and J24 strains were obtained after the assembling procedure resulting with 2,005,995 bp and 1,978,629 bp, respectively. These sizes are closed to that of the average for those belonging to the *L. fermentum* specie according to the NCBI database, that is 2,011,830 bp out of a total of 102 genomes sequenced to date (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Besides, the percentages of guanine and cytosine (%G+C) were very similar to that reported on the corresponding *L. fermentum* NCBI database (51.8% G+C), being 51.74% and 51.89% for J23 and J28, respectively. The genome was achieved at the scaffold level, for which 382 and 362 scaffolds over 100 bp were obtained for J23 and J28, respectively.

Interestingly, the resulting Average Nucleotide Identity (ANI) values of the study strains J23 and J28 made it possible to determine that they presented a genomic identity of 99.95% from the aligned genome fraction between both strains. This identity value was even higher than those obtained when were compared with the *L. fermentum* reference strains: CP034099 (LMT2-75) with 99.19% and 99.14% for J23 and J28, respectively; and CP040910 (DSM 20052) with 99.27% and 99.23%, for J23 and J28, respectively. It is also important to highlight that the percentage of aligned genome (used to obtain the genomic similarities) between both study strains (90.1 %) was upper than when they were compared to the reference strains (60.65-67.08 %). The high similarity of the study strains may be explained to the fact that both were obtained from the same isolation niche (Heredia-Castro *et al.*, 2015) where they probably maintained or obtained very similar genomic characteristics to be adapted and survive at the same environment (Cen *et al.*, 2020). Thus, the ANI analysis allowed, by means of the information of the complete genome, to taxonomically identify the study strains J23 and J28 as belonging to the *L. fermentum* specie, confirming the results previously reported by Heredia-Castro *et al.* (2015). Actually, $\geq 95\text{-}96\%$ of ANI is an accepted value to identify strains at specie level (Yoon *et al.*, 2017).

On the other hand, the genome annotation was achieved with Prokka that allowed to determine the Coding Sequences (CDS), resulting 1,957 for J23 and 1,929 for J28. These values are similar to that reported for *L. fermentum* in the NCBI, where the CDS average is 1846. These similarities imply that the genomic information obtained was enough to explore the study strains genomes.

Based on the characteristics of the assembly, it is clear that the sequence genome of J23 and J28 *L. fermentum* was characterized. So far, with this information we may also infer that they could have a common CRISPR-Cas system. Nevertheless, it is well known that most of the metabolic functions o capacities are even strain-dependent, which has been demonstrated in previous studies with these same strains (Heredia-Castro *et al.*, 2015; Heredia-Castro *et al.*, 2021; Reyes-Díaz *et al.*, 2018; Santiago-López *et al.*, 2018).

3.2. Identification of the CRISPR-Cas locus

With the aid of the CRISPRCasFinder it was possible to find two CRISPR-Cas loci in each study strain, belonging to I and II types; specifically, it was found the I-E and II-A subtypes. The subtype I-E system presented eight genes: *cas1*, *cas2*, *cas3*, *cas5*, *cas6*, *cas7*, *cse1*, *cse2*. From this group, *cas3* is the representative gene of the type I system, while *cse1* and *cse2* are the genes that define

the I-E subtype (Makarova *et al.*, 2015). On the other hand, the CRISPR-Cas type II-A system consisted by four genes: *cas9*, *csn2*, *cas1*, *cas2*; being the type of CRISPR-Cas system with the smallest quantity of genes (Makarova *et al.*, 2015). In this case, *cas9* is the signature gene that defines type II, while *csn2* defines subtype II-A. Each of the CRISPR-Cas locus found in the study strains genomes contain all the genes necessary for the performance of its respective system. These types, I and II, have been previously identified in *L. fermentum*; from 37 strains attempted, 72 % were identified as presumptive CRISPR-cas system positive; from them, 53.8, 41.0 and 2.56 % corresponded to the I, II and III types, respectively (Brandt *et al.*, 2020).

The CRISPR type I-E loci in the antisense chain of both study strains are depicted in **Figure 1 (A and B)** which were obtained from the CRISPRTyper platform outputs. Interestingly, the analysis with this platform allows to identify as the DEDDh gene instead of the *cas2* gene originally identified with CRISPRCasFinder. DEDDh is a 3'-5' exonuclease that has been found fused with the *cas1* and *cas2* genes; additionally, it has been hypothesized that it could contribute to the activity of Cas3 (Tanmoy *et al.*, 2020). Another hand, it is well known that genes *cas5*, *cas6*, *cas7*, *cse1* and *cse2* encoded the (CRISPR)-Associated Complex for Antiviral Defense (CASCADE) that participates in the processing of crRNA, in recognition of foreign DNA and in DNA cleavage (Cooper *et al.*, 2018). In this context, the proteins Cas5 and Cas6, respectively derived from the *cas5*, and *cas6* gene considered as Repeat-Associated Mysterious Proteins (RAMP), and responsible for the processing of pre-crRNA in the conversion to crRNA. Besides, it is reported that Cas7 (encoded by *cas7* gene), in conjunction with crRNA, is candidate to participate in the recognition of foreign DNA, forming the (foreign DNA)-crRNA-CASCADE complex (Lintner *et al.*, 2011). Thus, this new complex recruits Cas3 (encoded by *cas3* gene) for the foreign DNA interference performed on the single-stranded DNA of the non-target strand from the double-stranded DNA (Cooper *et al.*, 2018).

The graphic representation of the CRISPR type II-A loci for both strains are shown in **Figure 1 (C and D)** and were found in the sense strand of the genome. It is reported that in this system, Csn2 protein (encoded by *csn2* gene) is considered to participate in the acquisition of new spacers together with Cas1 and Cas2 proteins (respectively encoded by *cas1* and *cas2* genes) (Nam *et al.*, 2012) and, also Csn2 with Cas9 proteins cooperate in the recognition of foreign DNA during interference (Ka *et al.*, 2018). Additionally, with the aid to the Prokka software, the genes encoding ribonuclease II were found. This enzyme fulfills several functions in the cell such as the catalysis

of the hydrolysis of RNA chains into components plus smaller fragments, and is involved in the maturation precrRNA. On the other hand, cas9 gene encoded to Cas9 multifunctional protein that participates in the recognition of the foreign DNA and its interference by cutting the blunt ends of the double-stranded DNA (dsDNA) (Cooper *et al.*, 2018; Linter *et al.*, 2011).

Since it was determined two subtypes of the CRISPR-cas system for both strains represent an interesting opportunity because the presence of multiple CRISPR-Cas loci of different types, within the same genome, has been considered as a factor that allows specialization against different types of threats. Likewise, it has been pointed out that several cas genes, in the same genome, can favor the negative effect on the immunity generated by the anti-CRISPR proteins encoded in the genome of some phages (Weissman *et al.*, 2018). In this sense, the analysis of the study genomes with the AcrFinder platform made it possible to determine the absence of anti-CRISPR genes related to prophages or other mobile genetic elements (MGE). Some MGE have anti-CRISPR genes (Acr and Aca genes) that encode proteins capable of inhibiting the activity of the CRISPR-Cas system avoiding interference from foreign DNA (Yi *et al.*, 2020). Therefore, the absence of anti-CRISPR genes is a point in favor of the potential activity of this system against phages and other MGEs.

On the other hand, the presence of CRISPR-Cas systems of the same type with multiple spacers in common between the corresponding arrays, may be due to the fact that both strains were kept in a very similar ecological niche with the same type of threats from alien genetic agents (Koskella *et al.*, 2014). These results are consistent with the ANI analysis, which indicated that these strains are closely related phylogenetically. However, *in vitro* and *in vivo* studies with J23 and J28 have shown that both strains behave differently during experiments. Therefore, we cannot consider it to be the same strain, but rather two strains closely related to each other genotypically but with relatively different phenotypic capacities.

3.3. CRISPR arrays repetitive sequences analysis

The CRISPR type II-A array presented longer repetitive sequences and shorter and fewer spacers than the CRISPR-Cas type I-E array. Similar results have been reported for these same systems in strains of *L. paracasei* and *L. rhamnosus* (Pujato *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2020). All the characteristics of the CRISPR arrays for both study strains are resumed in **Table 1**. The repeats showed sequences at a range of 89.06-98.49 % of conservation within its own array. The repeats lengths were equal in the systems belonging to the same type: 36 bp for both II-A types and 28 bp

for both I-E types. The repetitive sequences showed variations of a single nucleotide, mainly at the 3' end of the CRISPR-Cas type I-E arrays. Likewise, the last repetitive sequences, in all CRISPR arrays, presented the highest accumulation of variations, even in the center of the repeated sequence, reaching up to 5 variations in both subtypes. The consensus sequences of the repeats, from both strains, compared against the CRISPRFinder database, allowed to find sequences shared with *L. fermentum* NCC2970 (NZ_CP017151), F-6 (NC_021235) and SNUV175 (NZ_CP019030).

On the other hand, the RNAFold platform allowed to predict the RNA secondary structure from the repeats' consensuses (**Figure 2**). This representation shows the formation of two loop-shaped motifs made up of unpaired bases, as well as a hairpin-shaped motif made up of paired bases in both study strains. These motif types are product of the partially palindromic nature of the repeats, leading to the hairpin-shaped formations because of the bases' complementarity, instead of the loop-shaped forms due to the non-complementary sequences. These secondary structures are necessary for the generation and loading of crRNA in most CRISPR-Cas systems (Kunin *et al.*, 2007).

The structural stability profiles of the RNA secondary structures for both strains were obtained with the analysis of the Minimum Free Energy (MFE) of their consensus repetitions, represented with red-color graphs to express a high probability of structural stability, while green-color graphs were used to indicate those structures with high stability. The MFE analysis allowed to determine most of the secondary structures showing high stability which were represented in red.

3.4. Spacers sequences identification

The presence of CRISPR arrays spacer sequences of the bacterial strains represent a record of previous attacks by foreign DNA (Wheatley and MacLean, 2021). The spacer sequences identification allows to know the type of exogenous genetic agents that bacteria has faced against (Barrangou *et al.* 2013). The **Figure 3** shows the CRISPR arrays spacers arrangement of the study strains, where the spacers with the same sequence are depicted by squares with the same color pattern while different spacers are shown with different color patterns. In this way, it can be visually determined that spacers of both strains are the same, about sequence, order, and quantity in the type I-E CRISPR arrays. The type II-A CRISPR arrays spacers were different about order, sequence, and amount of both strains with 21 and 27 spacers for J28 and J23, respectively. On the other hand, only four spacers were equal at the right side of both arrays.

The spacers' identities showed similarity to phage and plasmid DNA (see **Table 2-4**). Only one type I-E CRISPR array spacer was used for identification analysis since both strains' spacers were equal. In the case of the type II-A system both strains' spacers were studied due to being different. Regarding type I-E system, most of the spacers were not identified and only 10 from 29 spacers (~30 %) were achieved resulting nine to be homologue to phages and one to a plasmid, as shown in **Table 2**. Notably, the analysis performed with BLASTn and CRISPRdb-Blast allow to determine that all the sequences of the spacers of this locus are totally shared by CRISPR-Cas type I-E system from eight other sequenced strains of *L. fermentum*, which were USM 8633 (CP045034.1), GR1007 (CP071001. 1), GR1008 (CP071000.1), GR1009 (CP070999.1) and GR1103 (CP070858.1) from fermented meat sausage; FTDC 8312 (CP021104.1) from fecal sample, and VRI-003 (CP020353.1) from commercial probiotic culture.

With regards to type II-A system, from 27 spacers of strain J23, 21 were identified and 20 of them matched to bacteriophages sequences (**Table 3**). In addition, from 21 spacers of strain J28, 14 were identified and 12 from them matched to bacteriophage sequences (**Table 4**). From these results, it could be inferred that type II-A system of both strains, J23 and J28, might have participated in defense against a bacteriophage infection. The analysis performed using BLASTn and CRISPRdb-blast allow to determine that only the second oldest spacer shared by both loci, of the study strains, presented partial identity with a spacer of the CRISPR-Cas type II-A system of *L. fermentum* LDTM 7301 (CP031195.1).

The study-strains genome analysis with the PHASTER platform allowed to determine the presence of one incomplete prophage region for both strains. This indicates that they contain a number of genes lower than that necessary for the phage formation what implies that it is unlikely that such prophage may be incapable to entry into the lytic cycle (Arndt *et al.*, 2016; Howard-Varona *et al.*, 2017). The importance of this identification lies in the fact that their integration, release, and shedding are linked to various effects on the host strain, such as gene disruption and transmission of antibiotic resistance genes (Argov *et al.*, 2017). The absence of complete prophage regions is likely to be related to an active CRISPR-Cas system in these study strains; actually, it is well known that an active CRISPR-Cas system has direct relation to the lower amounts of foreign DNA finds (Butiuc-Keul *et al.*, 2020) as it was observed in the present study.

Analysis with the CRISPRminer platform allowed determining the absence of self-targeting spacers in the genomes of the study strains, which implies that their CRISPR-Cas system most likely does not participate in gene regulation or autoimmunity. In this sense, the presence of self-targeting spacers is associated with cellular apoptosis due to the damage of genomic DNA that initiates in the target regions of the self-targeting spacers. This autoimmunity effect has also been related to the loss of all cas genes as in the case of *Lacticaseibacillus* NCFM (Stern *et al.*, 2010). Therefore, it can be considered that the absence of this type of spacers implies that the CRISPR-Cas system of the study strains has a low possibility of generating autoimmunity and thus would not affect cell viability.

3.5. PAM sequences of CRISPR-Cas type I-E and II-A systems

PAM is a short-conserved sequence of exogenous DNA and is essential for its protospacer recognition in most CRISPR-Cas systems types that must be perfect; so that, modifications in its sequence can affect the interference process of foreign DNA (Gleditzsch *et al.*, 2019). In this sense, the alignment of the sequences that flank protospacers obtained from the CRISPRTarget platform, allowed to determine the PAM conserved sequence for both types I-E and II-A showing a nucleotide composition rich of adenine. Thus, the PAM in type I-E system was found at the 5' end of the protospacer, finding two possible 3-bases sequences: 5'-AAT- 3' and 5'-AAC-3'. On the other hand, that of type II-A system was found at the 3' end of the aligned protospacers of both strains with a 4-5 bases length; thus, the PAM sequence in J23 was 5'-GAAA-3', while in J28 several probable sequences were found: 5'-TGAAA-3', 5'-CTGAAA-3', 5'-TTAAA-3', 5'-TTAAC-3'. The PAM sequence in type II-A system is detected by the Cas9 protein as a first step in the recognition of foreign DNA on the non-target strand (Guan *et al.*, 2017) while in type I-E is different due to its location and related Cas enzymes, where the CASCADE complex takes on detecting PAM. It is also important to clarify the point that, in recent years, it has been considered to name as Spacer Acquisition Motif (SAM) to that PAM sequence detected in the acquisition stage and as Target Interference Motif (TIM) to that detected in the interference (Gleditzsch *et al.*, 2019); in this context, the PAM sequences recognized in the present study, are referred to TIM related with the recognition of the protospacer on the interference stage. These results about PAM give useful information that may be required to determine the CRISPR-Cas system activity and to edit the bacteria genome by using its own system (Crawley *et al.*, 2018; Hidalgo-Cantabrana *et al.*, 2018).

3.6. Restriction-Modification system genes

As the CRISPR-Cas, the Restriction-Modification (R-M) system has also demonstrated to act as a defense mechanism against phages (Enikeeva *et al.*, 2010; Szczepankowska, 2013), but also may display other functions such as stabilization of genomic islands, roles in the nutrition of the bacteria, immigration control, maintenance of species identity, control of speciation, among others (Vasu and Nagaraja, 2013). In the present study, the R-M genes were found in both study strains genomes with the aid of the Patric platform. As it is well known, these genes consist of restriction enzymes and DNA methylases resulting in different types of R-M systems (I to IV types), which vary in type and number of genes (Ershova *et al.*, 2015). In this sense, I and III types of R-M system were identified in the study strains. The type I system was only found in J23 strain and contained three typical genes of its structure (*hsdS*, *hsdM* and *hsdR*) encoding a multifunctional protein; *hsdS* encodes the specificity subunit, *hsdM* encodes the DNA methyltransferase subunit; and *hsdR* encodes the restriction subunit R. Despite of the great similarity of both strain genomes, the type I system was not found in J28 strain, which suggests that these genes are part of accessory or cloud genes, not shared by all same-species members. Regarding the type II system, only the gene *YeeA2*, that encodes for the *YeeA* methylase subunit, was found. Nevertheless, the type III system, found in both study strains, consisted of two genes: *res* that encodes a restriction enzyme and *Mod Mtase* that encodes a DNA methylase protein; both united to form a complex of modification and cutting of DNA.

The R-M system has been reported to be compatible with the CRISPR-Cas system and they may work together to potentially increase resistance against phages. This collaboration is not essential for countering the viruses attack; however, they may participate together in different manner. Thus, while the CRISPR-Cas system is capable of degrading the methylated phage DNA, the R-M system can contribute to the destruction of phage DNA containing anti-CRISPR genes (Dupuis *et al.*, 2013). Therefore, the presence of the R-M and CRISPR-Cas systems in J23 and J28 *L. fermentum* strains increases the possibility of being used as starter cultures resistant against phages.

4. Conclusion

The *Limosilactobacillus fermentum* strains J23 and J28 genomes were sequenced at the scaffold level, resulting with high similarity between them. Besides, the CRISPR-Cas loci was found in its complete structure for both genomes, so it was feasible to characterize them by the aid of different

software finding eight cas genes for the type I-E and four cas genes for type II-A, specialized on interacting with double-stranded DNA as a mechanism defense against mobile genetic agents such as DNA phages (lysogenic and lytic) or plasmids. Specific spacers of foreign DNA were identified and they positively matched to specific genes' regions encoding for hypothetical and structural proteins, as well as genes for lysine, integrase, among others. Besides, the presence the R-M genes were identified exposing this system as mechanism that will contribute together with the CRISPR-Cas system to counting the foreign genetic agents attacks. The data obtained suggest that J23 and J28 strains of *L. fermentum* have the potential to be used as starter cultures for different technological or biotechnological uses under optimum conditions or even in environments containing plasmids or phages.

Author's contributions

All authors contributed

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflict of Interest.

References

- Argov, T., Azulay, G., Pasechnik, A., Stadnyuk, O., Ran-Sapir, S., Borovok, I., Herskovits, A.A. (2017). Temperate bacteriophages as regulators of host behavior. Current Opinion in Microbiology. 38, 81-87.
- Arndt, D., Grant, J.R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., Wishart, D.S. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. Nucleic acids research. 44, W16-W21. Link: <https://phaster.ca/>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Pevzner, P.A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. Journal of Computational Biology. 19, 455-477.
- Barrangou, R. (2013). CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. 4, 267-278.

- Bikard, D., Hatoum-Aslan, A., Mucida, D., Marraffini, L.A. (2012). CRISPR interference can prevent natural transformation and virulence acquisition during in vivo bacterial infection. *Cell host & microbe.* 12, 177-186.
- Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria: their applications in foods. *J. Bacteriol Mycol.* 6, 89-94.
- Biswas, A., Gagnon, J.N., Brouns, S.J., Fineran, P.C., Brown, C.M. (2013). CRISPRTarget: bioinformatic prediction and analysis of crRNA targets. *RNA Biology.* 10, 817-827.
Link. http://crispr.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics.* 170.
- Brandt, K., Nethery, M. A., O'Flaherty, S., Barrangou, R. (2020). Genomic characterization of *Lactobacillus fermentum* DSM 20052. *BMC genomics.* 21, 1-13.
- Briggiler-Marcó, M. B., Moineau, S., Quibroni, A. (2012). Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage.* 2, 149-158.
- Butiuc-Keul, A., Farkas, A., Carpa, R., Iordache, D. (2021). CRISPR-Cas System: The Powerful Modulator of Accessory Genomes in Prokaryotes. *Microbial Physiology,* 1-16.
- Cen, S., Yin, R., Mao, B., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., Chen, W. (2020). Comparative genomics shows niche-specific variations of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from human, *Drosophila melanogaster*, vegetable and dairy sources. *Food Bioscience,* 35, 100581.
- Cooper, L.A., Stringer, A.M., Wade, J.T. (2018). Determining the specificity of cascade binding, interference, and primed adaptation in vivo in the *Escherichia coli* type I-E CRISPR-Cas system. *MBio.* 9, e02100-17.
- Couvin, D., Bernheim, A., Toffano-Nioche, C., Touchon, M., Michalik, J., Néron, B., Pourcel, C. (2018). CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic acids research.* 46, W246-W251. Link: <https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/>
- Crawley, A.B., Henriksen, E.D., Stout, E., Brandt, K., Barrangou, R. (2018). Characterizing the activity of abundant, diverse and active CRISPR-Cas systems in lactobacilli. *Scientific Reports.* 8, 1-12.

- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., Brenner, S.E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research*. 14, 1188-1190. Link. <https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>
- Dion, M.B., Labrie, S. J., Shah, S. A., Moineau, S. (2018). CRISPRStudio: a user-friendly software for rapid CRISPR array visualization. *Viruses*. 10, 602.
- Dupuis, M.È., Villion, M., Magadán, A.H., Moineau, S. (2013). CRISPR-Cas and restriction-modification systems are compatible and increase phage resistance. *Nature Communications*. 4, 1-7.
- Enikeeva, F.N., Severinov, K.V., Gelfand, M.S. (2010). Restriction-modification systems and bacteriophage invasion: Who wins? *Journal of Theoretical Biology*. 266, 550-559.
- Ershova, A.S., Rusinov, I.S., Spirin, S.A., Karyagina, A.S., Alexeevski, A.V. (2015). Role of restriction-modification systems in prokaryotic evolution and ecology. *Biochemistry (Moscow)*. 80, 1373-1386.
- Gleditzsch, D., Pausch, P., Müller-Esparza, H., Özcan, A., Guo, X., Bange, G., Randau, L. (2019). PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: diversified mechanisms and structures. *RNA Biology*. 16, 504-517.
- Guan, J., Shi, X., Burgos, R., Zeng, L. (2017). Visualization of phage DNA degradation by a type I CRISPR-Cas system at the single-cell level. *Quantitative Biology (Beijing, China)*. 5, 67.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 29, 1072-1075.
- Heredia-Castro, P.Y., Méndez-Romero, J.I., Hernández-Mendoza, A., Acedo-Félix, E., González-Córdova, A.F., Vallejo-Cordoba, B. (2015). Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from artisanal Mexican cheese. *Journal of Dairy Science*. 98, 8285-8293.
- Heredia-Castro, P.Y., Reyes-Díaz, R., Rendón-Rosales, M.Á., Beltrán-Barrientos, L.M., Torres-Llanez, M.J., Estrada-Montoya, M.C., Vallejo-Cordoba, B. (2021). Novel bacteriocins produced by *Lactobacillus fermentum* strains with bacteriostatic effects in milk against selected indicator microorganisms. *Journal of Dairy Science*. 104, 4033-4043.

- Hidalgo-Cantabrana, C., Goh, Y.J., Pan, M., Sanozky-Dawes, R., Barrangou, R. (2019). Genome editing using the endogenous type I CRISPR-Cas system in *Lactobacillus crispatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 116, 15774-15783.
- Howard-Varona, C., Hargreaves, K.R., Abedon, S.T., Sullivan, M.B. (2017). Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *The ISME Journal*. 11, 1511-1520.
- Ka, D., Jang, D.M., Han, B.W., Bae, E. (2018). Molecular organization of the type II-A CRISPR adaptation module and its interaction with Cas9 via Csn2. *Nucleic Acids Research*. 46, 9805-9815.
- Koonin, E. V., and Makarova, K. S. (2019). Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 374, 20180087.
- Koskella, B., and Brockhurst, M. A. (2014). Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*. 38, 916-931.
- Kunin, V., Sorek, R., Hugenholtz, P. (2007). Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biology*. 8, 1-7.
- Labrie, S.J., Samson, J.E., Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*. 8, 317-327.
- Lintner, N. G., Kerou, M., Brumfield, S. K., Graham, S., Liu, H., Naismith, J. H., Lawrence, C. M. (2011). Structural and functional characterization of an archaeal clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated complex for antiviral defense (CASCADE). *Journal of Biological Chemistry*. 286, 21643-21656.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Alkhnbashi, O.S., Costa, F., Shah, S.A., Saunders, S.J., Koonin, E. V. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 13, 722-736.
- Mills, S., Griffin, C., Coffey, A., Meijer, W.C., Hafkamp, B. and Ross, R.P. (2010). CRISPR analysis of bacteriophage-insensitive mutants (BIMs) of industrial *Streptococcus thermophilus* implications for starter design. *Journal of Applied Microbiology*. 108, 945-955.

- Naghmouchi, K., Belguesmia, Y., Bendali, F., Spano, G., Seal, B.S., Drider, D. (2020). *Lactobacillus fermentum*: a bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications. Critical reviews in Food Science and Nutrition. 60, 3387-3399.
- Nam, K.H., Kurinov, I. Ke, A. (2011). Crystal Structure of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-associated Csn2 Protein Revealed Ca²⁺-dependent Double-stranded DNA Binding Activity. Journal of Biological Chemistry. 286, 30759-30768.
- Pujato, S., Galliani, V., Irazoqui, J.M., Amadio, A., Quiberoni, A., Mercanti, D. (2021). Analysis of CRISPR systems of types II-A, I-E and I-C in strains of *Lacticaseibacillus*. International Dairy Journal. 118, 105027.
- Reyes-Díaz, A., Mata-Haro, V., Hernández, J., González-Córdova, A.F., Hernández-Mendoza, A., Reyes-Díaz, R., Vallejo-Cordoba, B. (2018). Milk fermented by specific *Lactobacillus* strains regulates the serum levels of IL-6, TNF- α and IL-10 cytokines in a LPS-stimulated murine model. Nutrients. 10, 691.
- Roberts, A., and Barrangou, R. (2020). Applications of CRISPR-Cas systems in lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews. 44, 523-537.
- Russel, J., Pinilla-Redondo, R., Mayo-Muñoz, D., Shah, S.A., Sørensen, S.J. (2020). CRISPRCasTyper: an automated tool for the identification, annotation and classification of CRISPR-Cas loci. BioRxiv. Link: <https://crisprcastyper.crispr.dk/#/submit>
- Santiago-López, L., Hernández-Mendoza, A., Mata-Haro, V., Vallejo-Córdoba, B., Wall-Medrano, A., Astiazarán-García, H. González-Córdova, A.F. (2018). Effect of milk fermented with *Lactobacillus fermentum* on the inflammatory response in mice. Nutrients. 10, 1039.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics. 30, 2068-2069.
- Stern, A., Keren, L., Wurtzel, O., Amitai, G., Sorek, R. (2010). Self-targeting by CRISPR: gene regulation or autoimmunity? Trends in Genetics. 26, 335-340.
- Szczepankowska, A.K., Górecki, R.K., Kołakowski, P., Bardowski, J.K. (2013). Lactic acid bacteria resistance to bacteriophage and prevention techniques to lower phage contamination in dairy fermentation. Lactic acid bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes. 23-74.

- Tanmoy, A. M., Saha, C., Sajib, M. S. I., Saha, S., Komurian-Pradel, F., van Belkum, A., and Endtz, H. P. (2020). CRISPR-CAS diversity in clinical *Salmonella enterica* Serovar Typhi isolates from South Asian countries. *Genes.* 11, 1365.
- Vasu, K., and Nagaraja, V. (2013). Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 77, 53-72.
- Wattam, A.R., Abraham, D., Dalay, O., Disz, T.L., Driscoll, T., Gabbard, J.L., Sobral, B.W. (2014). PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. *Nucleic acids research.* 42, D581-D591. Link: <https://www.patricbrc.org/>
- Weissbach, H., Etienne, F., Hoshi, T., Heinemann, S.H., Lowther, W.T., Matthews, B., Brot, N. (2002). Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 397, 172-178.
- Weissman, J.L., Fagan, W. F., Johnson, P.L. (2018). Selective maintenance of multiple CRISPR arrays across prokaryotes. *The CRISPR Journal.* 1, 405-413.
- Wheatley, R.M., and MacLean, R.C. (2021). CRISPR-Cas systems restrict horizontal gene transfer in *Pseudomonas aeruginosa*. *The ISME Journal.* 15, 1420-1433.
- Yi, H., Huang, L., Yang, B., Gomez, J., Zhang, H., Yin, Y. (2020). AcrFinder: genome mining anti-CRISPR operons in prokaryotes and their viruses. *Nucleic Acids Research.* 48, W358-W365.
- Yoon, S.H., Ha, S.M., Lim, J., Kwon, S., Chun, J. (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 110, 1281-1286. Link: <https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>
- Zhang, F., Zhao, S., Ren, C., Zhu, Y., Zhou, H., Lai, Y., Huang, Z. (2018). CRISPRminer is a knowledge base for exploring CRISPR-Cas systems in microbe and phage interactions. *Communications Biology.* 1, 1-5. Link. <http://www.microbiome-bigdata.com/> CRISPR miner/
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M., Harris, H., Mattarelli, P., Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae.

Manuscript tables

Table 1. Characteristics of the repeats of the CRISPR matrices of the *L. fermentum* J23 and J28 strains

Strain	Locus CRISPR	Spacers	Repeats	% Conservation	Lengh repetition	Consensus repeated sequence (5'-3')
J23	J23 CRISPR tipo II-A	27	29	91.97	36	GTCTTGGATGAGTGTCAAGTCAGTAGTTCCGAGCAC
	J23 CRISPR tipo I-E	29	29	98.49	28	GTGCTCCCCATGTATATGGGGTGATCCT
J28	J23 CRISPR tipo I-E	25	25	89.06	36	GTCTTGGAGAGTGTCAAGTCAGTAGTTCCGAGTAC
	J28 CRISPR tipo II-A	29	28	98.49	28	GTGCTCCCATGTATATGGGGTGATCCT

Table 2. Characteristics of the spacers of the CRISPR arrays in *L. fermentum* J23 in the CRISPR array of the type II-A system

No.	Spacer (5'→3')	Origin of DNA	Mapping	Score	Accession
1	GTCAGCAAAGTCCAACGCAAGCGGGATCA	Phage JNU_P5	Hypothetical protein	(CT) 24	MN830253
2	CCGACAGCGGTGCCGGATCAACGGTTACCA	Phage phiPYB5	Lysine	(CT) 28	GU323708
3	AATATCTGGAACGGAATGAGCAAGACGGG	Phage ctWBI2	Tail tape measure	(Bn) 4e ⁻⁰⁶ /100%	CP014787.1
4	TCCATCACTATTAAGTAATCATCAAGGGGA	X	X	X	X
5	CAAAGGTCGTAATTGCATAATCACGATCCT	Phage ctwbB5	Minor Capsid Protein	(Bn) 0.061/100%	BK024092.1
6	ACTGATTCACTACGAACTGACTCACGCTGGCA	X	X	X	X
7	CTAAGTTGCGAACGATACCATGAGAAATAT	Phage LfeInf	Hypothetical protein	(CT) 28	KP054477
8	AATTCTCTCCAAAACACAAACTATGTTGG	Phage sp.	X	(CT) 24	IMGVR_UViG_GVMA G-M-3300009161-51
9	AACGCCCGTGAGTTGATAAGCGATCAGCAA	X	X	X	X
10	GCGAGTTGTCGTATAAGTACAAAGACGATC	Phage ctWBI2	X	(Bn) 0.95/100.00%	BK016310.1
11	CCTAAACGTTGACCAACTTCGCGACCGGTC	Phage ctwbB5	Integrasa	(Bn) 0.001/96.67%	BK024092.1
12	GGTCGTCGATACGTTAGACGCGATCAAGGA	Phage JNU_P5	Hypothetical protein	(CT) 26	MN830253
13	GGTGGCCGAATACGACGACGGCGACGAGAT	Rhodococcus sp. AQ5-07 plasmid	X	(CT) 20	NZ_CP046101.1
13		Phage sp.	X	(CT) 22	MGVR_UViG_3300021 339_000008
14	TTTACCATTCCGAGCTTGGCACCTCCTTTC	Phage phiEF-1.1	Portal protein	(CT) 22	MF041990
15	TAGCCACGAACGCGTACGAATCTGCGTACC	Phage LF1	X	(CT) 26	HQ141410
15		Phage ctgFT22	Long terminase		BK026615.1
16	CACAAAGCGCTACAACCGTCGCTAGCGATG	Phage ctwbB5	Tile fiber protein	(Bn) 4e ⁻⁰⁶ /100%	BK024092.1
17	CCAACCTGAGCGCTTGGCCATGTCGACG	X	X	X	X
18	CTAAGGTTGGAACAGATGACTTAACAGTT	Phage ctZ1X1	X	(Bn) 0.32/100%	BK055155.1
19	TGGTGAGATGCCAAGTGTTCGGTCAACGG	Phage JNU_P5	Portal protein	(CT) 28	MN830253
20	TCACGGGACGAGCAGACACTAAAAAACGCC	Phage ct6If1	Tail protein	(Bn) 0.24 /93.32%	BK017285.1
21	ATCCCCGCTAACGTGAGTGCTCTTTAAC	X	X	X	DTR_733120
22	ACCAGCCCCGCTGGGGTTCACCTTGATCG	Phage LfeSau	Tail major protein	(Bn) 3.8 / 92.86%	NC_029068.1
23	GTTC CATTG TGGCCCTGGACGTTGAGTCTG	X	X	X	X
24	AGCGGT CCTCCATCTTGATAGAATGTAT	Phage ctXzz3	Hypothetical protein	(Bn) 0.001/100%	BK048996.1
25	TGTGAAAATTGCTGTCCACATATTGATT	Phage ctwbB5	Hypothetical protein	(Bn) 4e ⁻⁰⁶ /100%	BK024092.1
26	GCGCCGGCGGGCGTAAAGCGCAAGATAAA	Phage ctkWT36	Hypothetical protein	(Bn) 0.005/95.65%	BK018148.1
27	TGCTGACTTACGGTAAAGGCACCTTCGGAC	X	X	X	X

X: Unidentified spacers; CT: Score of identification of Spacers with CRISPRTarget; Bn: E-value and percent identity (%) of spacers identified with BLASTn

Table 3. Characteristics of the spacers of the CRISPR arrays in *L. fermentum* J23 in the CRISPR array of the type I-E system

No.	Spacer (5' → 3')	Origin of DNA	Mapping	Score	Accession
1	GGAAACCGGCCAAGTGGATAAACTGGGTATGTA	X	X	X	X
2	TTTCCAAGCTGGCAATGTACGCATCCCTAA	UGV-GENOME-0262442	X	(CT) 24	0262442
3	CCTTGTGGTGCATTCTACCTGATTGGTCAA	X	X	X	X
4	AAAAGATTGGTAAAACGGCGATTATGGCACTTG	IMGVR_UViG_3300029033_000033	X	(CT)29	Ga0169717_101751
5	ATCTGGAAGGCAACTGGATAATGCTTACTA	<i>Lactobacillus</i> phage	X	(CT)28	MN830252
6	AGGGTACGCTGGCCGGATTGTCTATGGCTA	X	X	X	X
7	TTGACAAGTCGATAATCTGTGTTGACTCTCA	<i>L. reuteri</i> YLR001 plasmid	X	(CT)28	NZ_CP065541.1
8	CGAATAAATTCTGAGGGCATTCTAACGCTTG	X	X	X	X
9	AGCACCGCTAGGGGAATATAGGATCAAGCTGA	Phage fam Siphoviridae sp ct6If	X	(Bn)4e ⁻⁰⁷ 100.00%	BK017285.1
10	TGAGGTTGATTAAATGATTGGGTAGAAGGGTA	X	X	X	X
11	CCTCACCAAAATCCTTACATCTGTCACTCCATA	X	X	X	X
12	TGGATAACCAGGTACAGTTACCGTTGACGATG	X	X	X	X
13	CATGAACCTCAGTATTGGCTGGCACTTGA	X	X	X	X
14	TGTAACCGAACCGAACGTTAGACCATGCTGATA	UGV-GENOME-0295885_1	X	(CT) 30	0295885_1
15	GATGTTGCAGCTCTAAATTACTCGCTCA	X	X	X	X
16	TTAAAACCGCTGCTCATCGACGGTAAAGTCG	X	X	X	X
17	GTTGTTTGAAGCCAAGCTCCGATGATCGAA	X	X	X	X
18	AAACTGACTTAACGGATAAAACCGTCTGTCTAA	<i>Secundilactobacillus paracollinoides</i> plasmid	X	(CT) 24	NZ_CP014917.1
19	CGTATTCGGCGGAACGAAGAAGTTGAGTATA	Phage Lf6Inf	X	(CT) 29	KP054477
20	CCATCGTTAACCTCCCTTAGCCAGATAACA	X	X	X	X
21	ATATGGTTGTCTTCTCCTATACACCGGATAA	X	X	X	X
22	TTCATCAAGACTAAAGTTACGCATCAAGAACG	X	X	X	X
23	AACTCTCAGTCGACGGTTAGAAGGCCGTTGCA	Phage sp.	X	(CT) 24	IMGVR_UViG_3300031656_000013
24	CGGGGGTTTATGATATTGTGGTACCGTGAG	X	X	X	X
25	CAATCGTCTGATCTTGTGAGTTGACGAGTGCTG	X	X	X	X
26	CTCAAGGCCAGGTACGACCTTCGGCAATGACGAGG	UGV-GENOME-0197477	X	(CT) 26	0197477
27	ACTCTAACGGTTAATAGTGTCAACGGGCATCTA	X	X	X	X
28	CAAATCTGGAGTGGCAATCGATGATAACCAA	X	X	X	X

X: Unidentified spacers; CT: Score of identification of Spacers with CRISPRTarget; Bn: E-value and percent identity (%) of spacers identified with BLASTn

L. fermentum: *Limosilactobacillus fermentum*

Table 4. Characteristics of the spacers of the CRISPR arrays in *L. fermentum* J28 in the CRISPR array of the type II-A system

No.	Spacer (5'→3')	Origin of DNA	Mapping	Score	Accession
1	TTGTTGATGTACCTGACTCACGCTGGCA	X	X	X	X
4	GACGCTAGACCAGCTCAACGAGGTTATGAA	Phage ct6lf1	Cell division protein	(Bn) 4e ⁻⁰⁶ /100%	BK017285.1
6	ACTAATGTGATCAAAGTTAACAGATATCG	Plasmid from <i>L. plantarum</i> repA, repB and repC genes	Initial region outside the gene	(Bn) 2e ⁻⁰⁵ /100%	M33531.1
7	GTCGCCGCTAACGTGAGTGCTCTTTAATC	X	X	X	X
10	AACAGATCTGAGTTGAACAGTTGGCCGCG	Phage ctXzz3	Hypothetical protein	(Bn) 2e ⁻⁰⁴ /100%	BK048996.1
11	AACCTTGATTGCCCTAGCGGGTATGCTGAG	Phage ct6lf1	Distal tail protein	(Bn) 0.95/93.1.%	BK017285.1
12	CAGTTCGCCGTTCTGAATAATTGCATTAC	Phage phiPYB5	Phage nucleotide binding protein	(CT) 28	GU323708
13	TTCCGATCGAAAAAATCCAAGCTAACTCAT	X	X	X	X
14	TCGTTGTGATTACTATATCACGGTTATTTC	Plasmid of <i>L. fermentum</i> strain ike38	Non-coding region	(CT) 24	NZ_AP024321.1
15	ACTCGGTATGGACCCGTTGCTCCGGTCG	Phage JNU_P1	Hypothetical protein	(CT) 28	MN830252
16	TACTAAGCCAACCGCGGAACCAACAAAGTG	X	Hypothetical protein	X	X
17	TGCCACTTGATGGCCACGAGATTGTGATCG	X	X	X	X

X: Unidentified spacers; CT: Score of identification of Spacers with CRISPRTarget; Bn: E-value and percent identity (%) of spacers identified with BLASTn *L. plantarum*: *Lactiplantibacillus plantarum*; *L. fermentum*: *Limosilactobacillus fermentum*

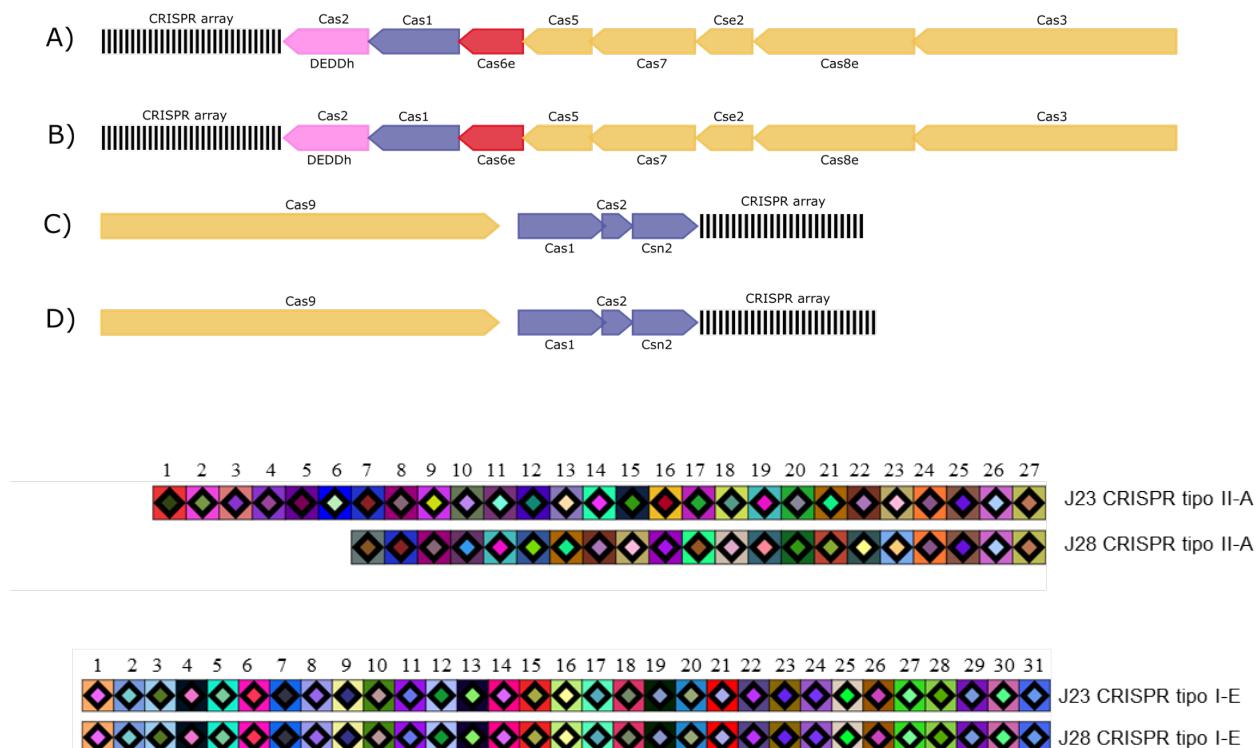
Figure list

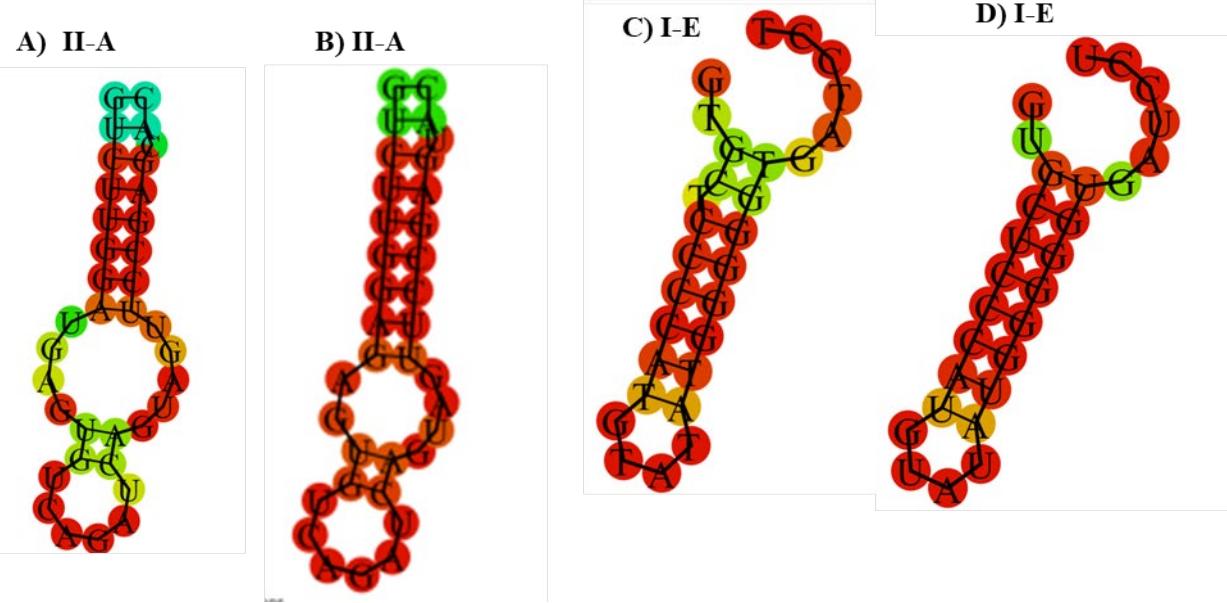
Figure 1. Representative scheme of the CRISPR-Cas type I-E and type II-A system of the study strains J23 and J28. The cas genes are represented with boxes pointing in the direction of transcription, while the CRISPR array is represented with black bars that represent the repeats and blank spaces that represent the spacers. The nomenclature alternatives of the corresponding cas genes are also shown.

Figure 2. Representation of secondary structure of the consensus repeats of the CRISPR matrices.

A) J23, B) J28, C) J23, D) J28

Figure 3. Arrangement of spacers in the CRISPR arrays of *Limosilactobacillus fermentum* J23 and J28 strains. The recently acquired spacers are located on the left flank of the CRISPR array, while the older ones are on the right flank.





4. CONCLUSIONES GENERALES

Con el presente estudio se logró caracterizar fisicoquímica y microbiológicamente al queso fresco artesanal de Sonora elaborado con leche cruda. La alta variabilidad composicional y presencia de diversos grupos bacterianos, evidenciaron la falta de estandarización de procesos y de aplicación de buenas prácticas de manufactura. La gran diversidad bacteriana encontrada, determinada por el análisis metagenómico, dio como resultado la identificación de más de 80 géneros; de los cuales, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* fueron los más abundantes. Por otro lado, se estudió el sistema CRISPR-Cas de las cepas *Limosilactobacillus fermentum* J23 y J28, que fueron seleccionadas por sus capacidades tecnológicas demostradas en estudios previos. Los genomas de dichas cepas fueron secuenciados y se encontró que fueron similares entre sí. El análisis bioinformático de los genomas de las cepas de estudio permitió determinar la presencia de dos locus CRISPR-Cas potencialmente funcionales, pertenecientes a los tipos I-E y II-A como mecanismo de defensa contra fagos. Adicionalmente, se identificaron espaciadores específicos de ADN de agentes genéticos móviles como fagos (lisogénicos y líticos) o plásmidos, los cuales coincidieron positivamente con regiones de genes específicos que codifican proteínas hipotéticas y estructurales, así como genes de lisina, integrasa, entre otros. Además, se identificó la presencia de genes Restricción-Modificación, que es un sistema independiente que puede contribuir con el sistema CRISPR-Cas para potenciar la defensa bacteriana contra los ataques de agentes genéticos extraños. Por lo anterior, las cepas de *Limosilactobacillus fermentum* J23 y J28 tienen el potencial para ser empleadas como cultivos microbianos para diferentes usos tecnológicos o biotecnológicos en condiciones óptimas manteniendo su viabilidad ante la infección por fagos.

5. RECOMENDACIONES

Futuros estudios del sistema CRISPR-Cas de las cepas de *Limosilactobacillus fermentum* J23 y J28, permitirán evaluar la actividad de este sistema a través de pruebas de reto con plásmidos que contengan secuencias específicas detectables por los sistemas del tipo I-E y II-A, encontrados en el presente estudio.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abriouel, H., Pérez Montoro, B., Casado Muñoz, M. D. C., Knapp, C. W., Gálvez, A., and Benomar, N. (2017). In silico genomic insights into aspects of food safety and defense mechanisms of a potentially probiotic *Lactobacillus pentosus* MP-10 isolated from brines of naturally fermented Alorena green table olives. *PLoS one.* 12(6), e0176801.
- Agudelo-López, M. A., Cervantes-Escoto, F., Cesín-Vargas, A., Palacios-Rangel, M. I., and Espinoza-Ortega, A. (2021). Impact of Collective Trademarks in Mexican artisanal cheesemakers. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria.* 22(2).
- Aldrete-Tapia, A., Escobar-Ramírez, C. M., Tamplin, M. L., and Hernández-Iturriaga, M. (2018). Characterization of bacterial communities in Mexican artisanal raw milk “Bola de Ocosingo” cheese by high-throughput sequencing. *Frontiers in Microbiology.* 9, 2598.
- Aldrete-Tapia, A., Escobar-Ramírez, M. C., Tamplin, M. L., and Hernández-Iturriaga, M. (2014). High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. *Food Microbiology.* 44, 136-141.
- Argov, T., Azulay, G., Pasechnik, A., Stadnyuk, O., Ran-Sapir, S., Borovok, I. and Herskovits, A. A. (2017). Temperate bacteriophages as regulators of host behavior. *Current Opinion in Microbiology.* 38, (1) 81-87.
- Barrangou, R. (2013). CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA.* 4(3), 267-278.
- Barrangou, R. (2013). CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA.* 4(3), 267-278.
- Barrangou, R., and Horvath, P. (2012). CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. *Annual Review of Food Science and Technology.* 3, 143-162.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., and Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 315(5819), 1709-1712.
- Bezerra, T. K. A., de Oliveira Arcanjo, N. M., de Araújo, A. R. R., de Queiroz, A. L. M., de Oliveira, M. E. G., Gomes, A. M. P., and Madruga, M. S. (2017). Volatile profile in goat coalho cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. *LWT-Food Science and Technology.* 76, 209-215.
- Biswas, A., Gagnon, J. N., Brouns, S. J., Fineran, P. C., and Brown, C. M. (2013). CRISPRTarget: bioinformatic prediction and analysis of crRNA targets. *RNA Biology.* 10(5), 817-827.
- Biswas, A., Staals, R. H., Morales, S. E., Fineran, P. C., and Brown, C. M. (2016). CRISPRDetect: a flexible algorithm to define CRISPR arrays. *BMC genomics,* 17(1), 1-14.
- Bonanno, A., Tornambè, G., Bellina, V., De Pasquale, C., Mazza, F., Maniaci, G., and Di Grigoli, A. (2013). Effect of farming system and cheesemaking technology on the physicochemical

- characteristics, fatty acid profile, and sensory properties of Caciocavallo Palermitano cheese. *Journal of Dairy Science*. 96(1), 710-724.
- Brandt, K., Nethery, M. A., O'Flaherty, S., and Barrangou, R. (2020). Genomic characterization of *Lactobacillus fermentum* DSM 20052. *BMC Genomics*, 21(1), 1-13.
- Briggiler-Marcó, M. B., and Mercanti, D. J. (2021). Bacteriophages in dairy plants. In *Advances in Food and Nutrition Research* (pp. Pages 1-54). Academic Press
- Briggiler-Marcó, M. B., Moineau, S. and Quibroni, A. (2012). Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage*. 2(3), 149-158.
- Burgain, J., Scher, J., Francius, G., Borges, F., Corgneau, M., Revol-Junelles, A. M., and Gaiani, C. (2014). Lactic acid bacteria in dairy food: surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in Colloid and Interface Science*. 213, 21-35.
- Cao, Y., Fanning, S., Proos, S., Jordan, K., and Srikumar, S. (2017). A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. *Frontiers in Microbiology*. 8, 1829.
- Capra, M. L., Binetti, A. G., Mercanti, D. J., Quibroni, A., and Reinheimer, J. A. (2009). Diversity among *Lactobacillus paracasei* phages isolated from a probiotic dairy product plant. *Journal of Applied Microbiology*. 107(4), 1350-1357.
- Capra, M. L., Mercanti, D. J., Rossetti, L. C., Reinheimer, J. A., and Quibroni, A. (2011). Isolation and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* bacteriophage-resistant mutants. *Journal of Applied Microbiology*, 111(2), 371-381.
- Cervantes, E. F., Villegas, G. A., Cesín, V. A. and Espinoza, A. O. (2008). Los quesos mexicanos genuinos. Patrimonio cultural que debe rescatarse. Editorial Mundi Prensa. México D. F.
- Chibani-Chennoufi, S., Bruttin, A., Dillmann, M. L., and Brüssow, H. (2004). Phage-host interaction: an ecological perspective. *Journal of Bacteriology*. 186(12), 3677-3686.
- Clokie, M. R., Millard, A. D., Letarov, A. V., and Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*. 1(1), 31-45.
- Colombo, M., Nero, L. A., and Todorov, S. D. (2020). Safety profiles of beneficial lactic acid bacteria isolated from dairy systems. *Brazilian Journal of Microbiology*. 1-9.
- Couvin, D., Bernheim, A., Toffano-Nioche, C., Touchon, M., Michalik, J., Néron, B., and Pourcel, C. (2018). CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Research*. 46(W1), 246-251.
- Crawley, A. B., Henriksen, E. D., Stout, E., Brandt, K., and Barrangou, R. (2018). Characterizing the activity of abundant, diverse and active CRISPR-Cas systems in lactobacilli. *Scientific Reports*. 8(1), 1-12.
- Cuevas-González, P. F., Heredia-Castro, P. Y., Méndez-Romero, J. I., Hernández-Mendoza, A., Reyes-Díaz, R., Vallejo-Cordoba, B., and González-Córdova, A. F. (2017). Artisanal Sonoran cheese (Cocido cheese): an exploration of its production process, chemical composition and microbiological quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 97(13), 4459–4466.

- Datsenko, K. A., Pougach, K., Tikhonov, A., Wanner, B. L., Severinov, K., and Semenova, E. (2012). Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system. *Nature Communications*. 3(1), 1-7.
- De la Rosa-Alacará, M.A. Ortiz-Estrada, Á. M., Heredia-Castro, P. Y., Hernández-Mendoza, A., Reyes-Díaz, R., Vallejo-Cordoba, B., and González-Córdova, A. F. (2020). Poro de Tabasco cheese: Chemical composition and microbiological quality during its artisanal manufacturing process. *Journal of Dairy Science*. 103(4), 3025-3037.
- De Oca-Flores, E. M., Castelán-Ortega, O. A., Estrada-Flores, J. G., and Espinoza-Ortega, A. N. (2009). Oaxaca cheese: Manufacture process and physicochemical characteristics. *International Journal of Dairy Technology*. 62(4), 535-540.
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J. E., Labonté, J., Fremaux, C., Boyaval, P., and Moineau, S. (2008). Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, 190(4), 1390-1400.
- Dupuis, M. È., Barrangou, R., and Moineau, S. (2015). Procedures for generating CRISPR mutants with novel spacers acquired from viruses or plasmids. In CRISPR (pp. 195-222). Humana Press, New York, NY.
- Dy, R. L., Przybilski, R., Semeijn, K., Salmond, G. P., and Fineran, P. C. (2014). A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin–antitoxin mechanism. *Nucleic Acids Research*. 42(7), 4590-4605.
- Escobar-Zepeda, A., Sanchez-Flores, A., and Baruch, M. Q. (2016). Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology*. 57, 116-127.
- Feyereisen, M., Mahony, J., Lugli, G. A., Ventura, M., Neve, H., Franz, C. M., and Van Sinderen, D. (2019). Isolation and characterization of *Lactobacillus brevis* phages. *Viruses*. 11(5), 393.
- FIRA. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (MX). Tendencias y Oportunidades de Desarrollo de la Red Leche en México (2015). Disponible en: <https://www.fira.gob.mx/InfEspDtoXML/>
- Garneau, J. E., and Moineau, S. (2011). Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microbial Cell Factories*. 10(1), 1-10.
- Goh, Y. J., Goin, C., O'Flaherty, S., Altermann, E., and Hutkins, R. (2011, December). Specialized adaptation of a lactic acid bacterium to the milk environment: the comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* LMD-9. In *Microbial cell factories* (Vol. 10, No. 1, pp. 1-17). BioMed Central.
- Gonçalves, M. T. P. G., Benito, M. J., de Guía Córdoba, M., Alvarenga, N., and de Herrera, S. R. M. S. (2017). Yeast community in traditional Portuguese Serpa cheese by culture-dependent and-independent DNA approaches. *International Journal of Food Microbiology*. 262, 63-70.
- González-Córdova, A. F., Yescas, C., Ortiz-Estrada, Á. M., Hernández-Mendoza, A. and Vallejo-Cordoba, B. (2016). Invited review: Artisanal Mexican cheeses. *Journal of Dairy Science*. 99(5), 3250-3262.
- Grissa, I., Vergnaud, G., and Pourcel, C. (2007). CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2), W52-

W57.

- Guan, J., Shi, X., Burgos, R., and Zeng, L. (2017). Visualization of phage DNA degradation by a type I CRISPR-Cas system at the single-cell level. *Quantitative Biology*. 5(1), 67-75.
- Gutiérrez-Méndez, N., Rodríguez-Figueroa, J. C., González-Córdova, A. F., Nevárez-Moorillón, G. V., Rivera-Chavira, B., and Vallejo-Cordoba, B. (2010). Phenotypic and genotypic characteristics of *Lactococcus lactis* strains isolated from different ecosystems. *Canadian Journal of Microbiology*. 56(5), 432-439.
- Gutiérrez-Méndez, N., Valenzuela-Soto, E., González-Córdova, A. F., and Vallejo-Cordoba, B. (2008). α -Ketoglutarate biosynthesis in wild and industrial strains of *Lactococcus lactis*. *Letters in Applied Microbiology*. 47(3), 202-207.
- Heredia Castro, P. (2011). Caracterización del proceso de producción del queso Cocido artesanal y de las principales bacterias ácido lácticas generadoras de aroma. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora, México.
- Heredia-Castro, P. Y., Méndez-Romero, J. I., Hernández-Mendoza, A., Acedo-Félix, E., González-Córdova, A. F., and Vallejo-Cordoba, B. (2015). Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from artisanal Mexican cheese. *Journal of Dairy Science*. 98(12), 8285-8293.
- Heredia-Castro, P. Y., Reyes-Díaz, R., Rendón-Rosales, M. Á., Beltrán-Barrientos, L. M., Torres-Llanez, M. J., Estrada-Montoya, M. C., and Vallejo-Cordoba, B. (2021). Novel bacteriocins produced by *Lactobacillus fermentum* strains with bacteriostatic effects in milk against selected indicator microorganisms. *Journal of Dairy Science*. 104(4), 4033-4043.
- Hernández M., Andablo A., Ochoa J. 2016. Multifuncionalidad y gobernanza en la región centro de Sonora. En: Cavallotti B. Globalización, seguridad alimentaria y ganadería familiar, editorial Juan Pablos, México.
- Hernández, M. 2012. Elementos para la activación de una cadena láctea en los DDR 142-Ures y 145-Mazatlán. Una propuesta bajo la perspectiva alimentaria localizada, en Extensionismo y gestión territorial del desarrollo para el desarrollo rural. Construyendo país desde el territorio. En: Caracuda A., Delgadillo J., Fernández M., Menéndez C., Robles H. y Zavala R. 2012. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) e INCA-Rural, México, pp. 60-92.
- Hoai, T. D., Nishiki, I., and Yoshida, T. (2016). Properties and genomic analysis of *Lactococcus garvieae* lysogenic bacteriophage PLgT-1, a new member of Siphoviridae, with homology to *Lactococcus lactis* phages. *Virus Research*. 222, 13-23.
- Horvath, P., Coûté-Monvoisin, A. C., Romero, D. A., Boyaval, P., Fremaux, C., and Barrangou, R. (2009). Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *International Journal of Food Microbiology*. 131(1), 62-70.
- Horvath, P., Gasiunas, G., Siksnys, V., and Barrangou, R. (2013). Applications of the versatile CRISPR-Cas systems. In *CRISPR-Cas Systems* (pp. 267-286). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Horvath, P., Romero, D. A., Coûté-Monvoisin, A. C., Richards, M., Deveau, H., Moineau, S. and Barrangou, R. (2008). Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*. 190(4), 1401-1412.

- Jeantet, R., Croguennec, T., and Schuck, P. (2016). Handbook of Food Science and Technology 3. En Croguennec, T., and Schuck, P. (Eds) Food Biochemistry and Technology. (pp. 41-60).
- Jore, M. M., Lundgren, M., Van Duijn, E., Bultema, J. B., Westra, E. R., Waghmare, S. P., and Brouns, S. J. (2011). Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nature Structural and Molecular Biology*. 18(5), 529-536.
- Kleppen, H. P., Bang, T., Nes, I. F. and Holo, H. (2011). Bacteriophages in milk fermentations: diversity fluctuations of normal and failed fermentations. *International Dairy Journal*. 21(9), 592-600.
- Kortright, K. E., Chan, B. K., and Turner, P. E. (2020). High-throughput discovery of phage receptors using transposon insertion sequencing of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 117(31), 18670-18679.
- Kumar, S. S., and Ghosh, A. R. (2019). Assessment of bacterial viability: a comprehensive review on recent advances and challenges. *Microbiology*. 165(6), 593-610.
- Kunin, V., Sorek, R., and Hugenholtz, P. (2007). Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biology*. 8(4), 1-7.
- Kutter, E. (2009). Phage host range and efficiency of plating. In *Bacteriophages* (pp. 141-149). Humana Press.
- Labrie, S. J., Samson, J. E., and Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*. 8(5), 317-327.
- Ledeboer, A. M., Bezemer, S., De Haard, J. J. W., Schaffers, I. M., Verrips, C. T., Van Vliet, C., and Frenken, L. G. J. (2002). Preventing phage lysis of *Lactococcus lactis* in cheese production using a neutralizing heavy-chain antibody fragment from llama. *Journal of Dairy Science*. 85(6), 1376-1382.
- Leon, L. M., Mendoza, S. D., and Bondy-Denomy, J. (2018). How bacteria control the CRISPR-Cas arsenal. *Current Opinion in Microbiology*. 42, 87-95.
- Mahony, J., Ainsworth, S., Stockdale, S., and van Sinderen, D. (2012). Phages of lactic acid bacteria: the role of genetics in understanding phage-host interactions and their co-evolutionary processes. *Virology*. 434(2), 143-150.
- Mahony, J., Tremblay, D. M., Labrie, S. J., Moineau, S., and van Sinderen, D. (2015). Investigating the requirement for calcium during lactococcal phage infection. *International journal of Food Microbiology*. 201, 47-51.
- Makarova, K. S., and Koonin, E. V. (2015). Annotation and classification of CRISPR-Cas systems. *CRISPR*. 47-75.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., and Koonin, E. V. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 13(11), 722-736.
- Martínez-Yrízar, A., Felger, R. S., and Bürquez, A. (2010). Los ecosistemas terrestres de Sonora: un diverso capital natural. Diversidad biológica del estado de Sonora. Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, 129-156.
- Mayo, B., Rodríguez, J., Vázquez, L., and Flórez, A. B. (2021). Microbial Interactions within the

- cheese ecosystem and their application to improve quality and safety. *Foods*. 10(3), 602.
- Miller, E., Yeoman, C. J., Tringe, S. G., Flint, H. J., and Edward, B. A. (2011). Phage-bacteria relationships and CRISPR elements revealed by a metagenomic survey of the rumen microbiome. *Environmental Microbiology*. 14(1), 207–227.
- Mills, S., Coffey, A., McAuliffe, O. E., Meijer, W. C., Hafkamp, B., and Ross, R. P. (2007). Efficient method for generation of bacteriophage insensitive mutants of *Streptococcus thermophilus* yoghurt and mozzarella strains. *Journal of microbiological methods*, 70(1), 159-164.
- Mills, S., Griffin, C., Coffey, A., Meijer, W. C., Hafkamp, B. and Ross, R. P. (2010). CRISPR analysis of bacteriophage-insensitive mutants (BIMs) of industrial *Streptococcus thermophilus* implications for starter design. *Journal of Applied Microbiology*. 108(3), 945-955.
- Moineau, S., Fortier, J., Ackermann, H. W. and Pandian, S. (1992). Characterization of lactococcal bacteriophages from Quebec cheese plants. *Canadian Journal of Microbiology*. 38(9), 875-882.
- Montel, M. C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmasures, N., and Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*. 177, 136-154.
- Mozzi, F., and Vignolo, G. M. (2010). Bacteriophages of lactic acid bacteria. En Rodriguez, A., García, P., and Raya, R. (Eds). *Biotechnology of Lactic acid Bacteria: Novel applications*, (pp. 255-276).
- Murugesan, S., Reyes-Mata, M. P., Nirmalkar, K., Chavez-Carbajal, A., Juárez-Hernández, J. I., Torres-Gómez, R. E., and García-Mena, J. (2018). Profiling of bacterial and fungal communities of Mexican cheeses by high throughput DNA sequencing. *Food Research International*, 113, 371-381.
- Neve, H., Kemper, U., Geis, A., and Heller, K. J. (1994). Monitoring and characterization of lactococcal bacteriophages in a dairy plant. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 46(2), 1
- Ochoa, J.L. 2016. Acción colectiva en la quesería artesanal de Suaqui Grande Sonora. Un análisis desde la perspectiva de los Sistemas Agroalimentarios Localizado. Ganadería, Sociedad y Recursos Naturales. En: Cavallotti B.A., Valverde B.R., Cesín, J. A. 2016. Universidad Autónoma Chapingo, México, pp. 162-182
- Ortíz Estrada, A. Diversidad y dinámica de las poblaciones microbianas durante la manufactura y almacenamiento del queso Chihuahua. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora, México.
- Parente, E., Cogan, T. M., and Powell, I. B. (2017). Starter cultures: general aspects. In *Cheese* (pp. 201-226). Academic Press.
- Perin, L. M., Sardaro, M. L. S., Nero, L. A., Neviani, E., and Gatti, M. (2017). Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and-independent methods. *Food*

- Microbiology. 65, 160-169. 67-178.
- Petrie, K. L. (2020). There're CRISPRs in My Yogurt: A Discovery-Based CURE at the Intersection of Industrial Food Production and the Human Microbiome. *Frontiers in Microbiology*. 11.
- Pfeiler, E. A., and Klaenhammer, T. R. (2007). The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*. 15(12), 546-553.
- Pomeón, T., and Cervantes, F. (2012). El sector lechero y quesero en México en las últimas décadas. En F. Cervantes y A. Villegas (Coords). *La leche y los quesos artesanales en México*, (pp. 7-49), México, Angel Porrua.
- Pujato, S. A., Quiberoni, A., and Mercanti, D. J. (2018). Bacteriophages on dairy foods. *Journal of applied microbiology*. 126(1), 14-30.
- Pujato, S., Galliani, V., Irazoqui, J. M., Amadio, A., Quiberoni, A., and Mercanti, D. (2021). Analysis of CRISPR systems of types II-A, IE and IC in strains of *Lacticaseibacillus*. *International Dairy Journal*. 118, 105027.
- Quiberoni, A. Suárez, V. B., Binetti, A.G. and Reinheimer, J.A. (2011). Bacteriophage Biological Aspects. En Fuquay, J. W., Fox, P. F. and McSweeney, P. L. (Eds) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press.
- Rangel Ortega, S. C. (2011). Identificación y caracterización de los consorcios microbianos del queso crema tropical. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora, México.
- Renye Jr, J. A., Somkuti, G. A., Van Hekken, D. L., and Prieto, V. G. (2011). Characterization of microflora in Mexican Chihuahua cheese. *Journal of Dairy Science*. 94(7), 3311-3315.
- Renye, J. A., Somkuti, G. A., Vallejo-Córdoba, B., Van Hekken, D. L., and González-Córdova, A. F. (2008). Characterization of the microflora isolated from queso fresco made from raw and pasteurized milk. *Journal of Food Safety*. 28(1), 59-75.
- Reyes-Díaz, A., Mata-Haro, V., Hernández, J., González-Córdova, A.F., Hernández-Mendoza, A., Reyes-Díaz, R., Vallejo-Cordoba, B. (2018). Milk fermented by specific *Lactobacillus* strains regulates the serum levels of IL-6, TNF- α and IL-10 cytokines in a LPS-stimulated murine model. *Nutrients*. 10, 691.
- Reyes-Díaz, R., González-Córdova, A. F., del Carmen Estrada-Montoya, M., Méndez-Romero, J. I., Mazorra-Manzano, M. A., Soto-Valdez, H., and Vallejo-Cordoba, B. (2020). Volatile and sensory evaluation of Mexican Fresco cheese as affected by specific wild *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science*. 103(1), 242-253.
- Richter, C., Chang, J. T., and Fineran, P. C. (2012). Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated (Cas) systems. *Viruses*. 4(10), 2291-2311.
- Roberts, A., and Barrangou, R. (2020). Applications of CRISPR-Cas systems in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 44(5), 523-537.
- Russel, J., Pinilla-Redondo, R., Mayo-Muñoz, D., Shah, S. A., and Sørensen, S. J. (2020). CRISPRCasTyper: an automated tool for the identification, annotation and classification of CRISPR-Cas loci. *bioRxiv*.

- Sanzky-Dawes, R., Selle, K., O'Flaherty, S., Klaenhammer, T., and Barrangou, R. (2015). Occurrence and activity of a type II CRISPR-Cas system in *Lactobacillus gasseri*. *Microbiology*. 161(9), 1752-1761.
- Santiago-López, L., Hernández-Mendoza, A., Mata-Haro, V., Vallejo-Córdoba, B., Wall-Medrano, A., Astiazarán-García, H., and González-Córdova, A. F. (2018a). Effect of milk fermented with *Lactobacillus fermentum* on the inflammatory response in mice. *Nutrients*. 10(8), 10
- Santiago-López, L., Hernández-Mendoza, A., Mata-Haro, V., Vallejo-Cordoba, B., and González-Córdova, A. F. (2018b). Immune response induced by fermented milk with potential probiotic strains isolated from artisanal Cocido cheese. *Food and Agricultural Immunology*. 29(1), 911-929.39.
- Santos-Espinosa, A., Beltrán-Barrientos, L. M., Reyes-Díaz, R., Mazorra-Manzano, M. Á., Hernández-Mendoza, A., González-Aguilar, G. A., and González-Córdova, A. F. (2020). Gamma-aminobutyric acid (GABA) production in milk fermented by specific wild lactic acid bacteria strains isolated from artisanal Mexican cheeses. *Annals of Microbiology*. 70(1), 1-11.
- Shmakov, S. A., Sitnik, V., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Severinov, K. V., and Koonin, E. V. (2017). The CRISPR spacer space is dominated by sequences from species-specific mobilomes. *MBio*. 8(5), e01397-17.
- Shmakov, S. A., Wolf, Y. I., Savitskaya, E., Severinov, K. V., and Koonin, E. V. (2020). Mapping CRISPR spaceromes reveals vast host-specific viromes of prokaryotes. *Communications biology*, 3(1), 1-9.
- Sillankorva, S. M., Oliveira, H. and Azeredo, J. (2012). Bacteriophages and their role in food safety. *International Journal of Microbiology*. 20(1), 1-13.
- Stachler, A. E., Wörtz, J., Alkhnbashi, O. S., Turgeman-Grott, I., Smith, R., Allers, T., .and Marchfelder, A. (2020). Adaptation induced by self-targeting in a type IB CRISPR-Cas system. *Journal of Biological Chemistry*. 295(39), 13502-13515.
- Sun, Z., Harris, H. M., McCann, A., Guo, C., Argimón, S., Zhang, W., and O'Toole, P. W. (2015). Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nature Communications*. 6(1), 1-13.
- Torres-Llanez, M. J., Vallejo-Cordoba, B., Díaz-Cinco, M. E., Mazorra-Manzano, M. A. and González-Córdova, A. F. (2006). Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. *Food Control*. 17(9), 683-690.
- Tunick, M. H., Van Hekken, D. L., Iandola, S. K., and Tomasula, P. M. (2012). Characterization of Queso Fresco during storage at 4 and 10° C. *Journal of Food Research*, 1(1), 308.
- Tyson, G. W., and Banfield, J. F. (2008). Rapidly evolving CRISPRs implicated in acquired resistance of microorganisms to viruses. *Environmental Microbiology*. 10(1), 200-207.
- Valenzuela-Cruz, 2018. Identificación de microbiota predominante del queso cocido, perfil típico de compuestos volátiles y perfil sensorial. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora, México.
- Vallejo-Cordoba, B., Castro-López, C., García, H. S., González-Córdova, A. F., and Hernández-Mendoza, A. (2020). Postbiotics and paraprobiotics: a review of current evidence and

- emerging trends. *Adv. Food Nutr. Res.* 94, 1-34.
- Van Hekken, D., and Farkye, N. Y. (2003). Hispanic cheeses: The Quest for Queso. *Food Technology*, 57, 32–38.
- Van Reckem, E., Geeraerts, W., Charmpis, C., Van der Veken, D., De Vuyst, L., and Leroy, F. (2019). Exploring the link between the geographical origin of European fermented foods and the diversity of their bacterial communities: The case of fermented meats. *Frontiers in Microbiology*. 10, 2302.
- Vendramin, V., Treu, L., Campanaro, S., Lombardi, A., Corich, V., and Giacomini, A. (2017). Genome comparison and physiological characterization of eight *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Italian dairy products. *Food Microbiology*. 63(7), 47-57.
- Verreault, D., Gendron, L., Rousseau, G. M., Veillette, M., Massé, D., Lindsley, W. G. and Duchaine, C. (2011). Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(2), 491-497.
- Villaseñor Medina, A. (2012). Calidad e inocuidad en las queserías artesanales de una comunidad rural de Sonora: Un análisis sociológico. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora, México.
- Villegas de Gante, A., F. Cervantes-Escoto, A. Cesín-Vargas, A. Espinoza-Ortega, A. Hernández-Montes, A. Santos-Moreno, and A. R. Martínez-Campos. 2014. Atlas de los Quesos Mexicanos Genuinos.
- Villegas, A. y Cervantes Escoto, F. (2011). La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estudios Sociales*. 19(38), 145-164.
- Viscardi, M., Capparelli, R., Di Matteo, R., Carminati, D., Giraffa, G., and Iannelli, D. (2003). Selection of bacteriophage-resistant mutants of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Microbiological Methods*. 55(1), 109-119.
- Wang, G., Liu, Q., Pei, Z., Wang, L., Tian, P., Liu, Z., and Chen, W. (2020). The diversity of the Crispr-cas system and prophages present in the genome reveals the co-evolution of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* and phages. *Frontiers in Microbiology*. 11, 1088.
- Wang, S., Kong, J., Gao, C., Guo, T., and Liu, X. (2010). Isolation and characterization of a novel virulent phage (phiLdb) of *Lactobacillus delbrueckii*. *International Journal of Food Microbiology*. 137(1), 22-27.
- Wiedenheft, B., Sternberg, S. H., and Doudna, J. A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*. 482(7385), 331-338.
- Wright, A. V., Nuñez, J. K., and Doudna, J. A. (2016). Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell*, 164(1-2), 29-44.
- Zago, M., Orrù, L., Rossetti, L., Lamontanara, A., Fornasari, M. E., Bonvini, B. and Giraffa, G. (2017). Survey on the phage resistance mechanisms displayed by a dairy *Lactobacillus helveticus* strain. *Food Microbiology*. 66(14), 110-116.
- Zhang, Y., Zhao, G., Ahmed, F. Y. H., Yi, T., Hu, S., Cai, T., and Liao, Q. (2020). In silico Method in CRISPR/Cas System: An Expedite and Powerful Booster. *Frontiers in Oncology*. 10(1), 1920.

Zinno, P., Janzen, T., Bennedsen, M., Ercolini, D. and Mauriello, G. (2010). Characterization of *Streptococcus thermophilus* lytic bacteriophages from mozzarella cheese plants. International Journal of Food Microbiology. 138(1), 137-144.