



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

UNIDAD ACADÉMICA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

“Descripción metagenómica de la comunidad bacteriana en queso fresco sinaloense de producción artesanal”

Tesis que presenta:

Biom. Joel Tohevaris Garcia Guerrero

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biológicas

Directores de tesis

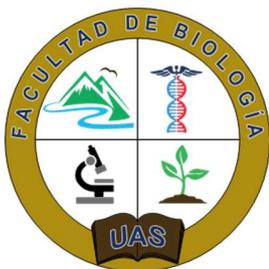
Dra. Luz Isela Peinado Guevara

Dr. Samuel Campista León

Asesores

Dr. Vicente Olimón Andalón

M. en C. Yamel Guadalupe Rubio Rocha



Culiacán, Sinaloa, México, a 28 de agosto de 2023



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



DEDICATORIA

A:

Mi madre, María Ramona Guerrero Aguilar, más allá de estas palabras, mi corazón agradece profundamente todo tu amor y cariño brindado a lo largo de mi vida. Has sido una piedra angular que me recuerda a persistir en la dificultad y me enorgullezco enormemente de ser tu hijo.

A:

Mis hermanas, Claudia Janet Garcia Guerrero y Anel Giselda Garcia Guerrero, mis “amarillas” favoritas de todo el mundo, agradezco en demasía a la vida por permitirme compartir una vida de hermandad con ustedes. Los momentos vividos, nuestros conflictos y nuestras alegrías, en nuestras altas y bajas, y, sobre todo, por todo su apoyo dado que me ha permitido ser la persona que soy el día de hoy.

A:

Mi hermano, Abdul Nassar Garcia Guerrero, me viste iniciar este camino, del cual expresaste tu orgullo hacia mí por emprenderlo, pero la vida no te permitió verme concluirlo. Agradezco infinitamente los años compartidos como hermanos, tu amor, tus consejos y la influencia que has dejado en mi vida, siendo tanta que dejo una pizca de ella en mí pensar y actuar. Honro tu memoria y recuerdo en estas palabras, aunque breves, simbolizan mi agradecimiento, afecto y amor hacia ti.

A:

Mis sobrinos, Yurithzy Anahí León Garcia y José Iori León Garcia, en un tono menos formal, muchas gracias por ser los sobrinos geniales y divertidos que son, por levantarme el ánimo y siempre querer estar conmigo. Espero seguir siendo un buen ejemplo para ustedes. Vamosh!

AGRADECIMIENTOS

De forma inicial, agradezco a mis directores de tesis, Dra. Luz Isela Peinado Guevara y Dr. Samuel Campista León. Este agradecimiento va más allá de todo el apoyo académico y personal brindado como directores de esta tesis. Extiendo estos agradecimientos al principio, dando las gracias por apostar a un joven estudiante de segundo grado de Biomedicina y brindarle una oportunidad para formar parte de su grupo de trabajo y pulirlo a lo largo de estos años de trabajo juntos y ser fundamentales en mi desarrollo académico y profesional.

En continuación, agradezco las observaciones y sugerencias realizadas de la M. en C. Yamel Guadalupe Rubio Rocha y del Dr. Vicente Olimón Andalón a esta tesis.

Al Dr. Bruno Gómez-Gil Rodríguez Sala y a la técnica M. en C. Julissa Enciso por su apoyo en el proceso de secuenciación masiva de ADN requerido en este proyecto de investigación.

A mis amigos de generación, empezando por mi buen amigo y estimado compañero de laboratorio José Uriel López Espinoza por su amistad y apoyo para la realización de los análisis realizados. Asimismo, a Edgar Alberto Gámez Duarte y Marlen Ibarra López, por hacer la maestría más amena.

A mis amigos y compañeros de Ecología Molecular y Biotecnología, iniciando por Gilberto Antonio Espinoza Ibarra, Jesús Alberto Osuna Muñoz y Flor de María del Rio González, por todos los buenos momentos de trabajo y amistad juntos. Continuando con Oliver Daniel Sarabia Inzunza, Ricardo Alán Herrera López, José Enrique Verdugo Escárcega, Ángel Edsgardo Ruiz Ramírez, Cecilia Soto Cisneros, Claudia Patricia Ávila Gaxiola, María Fernanda Aguilar y Elvia Jazmín Armenta Gutiérrez por su apoyo y compañerismo brindado.

Por todo, gracias

Índice general

Índice de Figuras	iv
Índice de Cuadros.....	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1. Origen y transformación del Queso	4
2.2. Fases en la elaboración del queso	4
2.2.1. Acidificación	5
2.2.2. Coagulación.....	5
2.2.3. Modificaciones post-coagulación	6
2.2.4. Maduración.....	6
2.3. Clasificación de variedades de queso	7
2.4. Quesos artesanales	7
2.5. Quesos mexicanos	8
2.5.1. Queso fresco	8
2.5.2. Queso Panela.....	9
2.5.3. Queso Oaxaca	9
2.5.4. Queso Chihuahua	10
2.5.5. Queso Bola de Ocosingo.....	10
2.5.6. Queso Poro de Balancán	10
2.5.7. Queso Crema de Chiapas	11
2.5.8. Queso Cotija.....	12
2.6. Diversidad microbiana en quesos mexicanos	12
2.7. Microbioma y Microbiota	13
2.8. Secuenciación de ADN como herramienta de exploración de la taxonomía y diversidad microbiana	14
2.8.1. Contextos históricos de las técnicas de clasificación bacteriana	14
2.8.2. Secuenciación de ADN	14
2.8.3. Secuenciación de alto rendimiento.....	15

2.8.4. Metagenómica como instrumento para la exploración de la diversidad microbiana	15
III. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	17
IV. JUSTIFICACIÓN	19
V. HIPÓTESIS.....	20
VI. OBJETIVOS.....	21
VII. METODOLOGÍA.....	22
7.1. Selección de muestras	22
7.2. Tipo de estudio	22
7.3. Muestra e individuos de estudio	22
7.4. Tipo de muestreo.....	22
7.5. Criterios de inclusión.....	23
7.6. Criterios de exclusión	23
7.7. Criterios de eliminación	23
7.8. Selección de sitios de muestreo y colecta de muestra	23
7.9. Análisis de amplicones del ARN ribosomal 16S.....	24
7.9.1. Extracción de ADN.....	24
7.9.2. Cuantificación de ADN y evaluación de calidad de extracción.....	25
7.9.3. Secuenciación masiva del fragmento de gen ARN ribosomal 16S.....	25
7.9.4. Tratamiento y análisis de secuenciación	26
7.10. Evaluación de dominancia y composición de microbiota central.....	28
7.11. Detección de patógenos y probióticos.....	28
7.12. Descubrimiento de biomarcadores taxonómicos.....	29
7.13. Predicción de perfiles funcionales	30
7.14. Análisis estadístico	31
7.15. Lugar de realización	31
7.16. Financiamiento.....	31
VIII. RESULTADOS	32
8.1. Descripción de las muestras colectadas y sitios de muestreo	32
8.2. Secuenciación masiva	35
8.3. Composición taxonómica de la comunidad bacteriana en el queso fresco sinaloense artesanal	36

8.4. Diversidad bacteriana y perfiles de composición en el queso fresco sinaloense artesanal.....	39
8.4.1. Curvas de rarefacción y estimación de esfuerzo de muestreo.....	39
8.4.2. Estimación de riqueza de especies y biodiversidad.....	42
8.4.3. Análisis de agrupamiento jerárquico y perfiles de composición.....	45
8.4.4. Exploración de similitudes en perfiles de composición.....	48
8.5. Dominancia de familias y composición de la microbiota bacteriana	50
8.6. Caracterización de taxones bacterianos patógenos	52
8.7. Identificación de Taxones Probióticos	55
8.8. Descubrimiento de biomarcadores taxonómicos	58
8.8.1. Biomarcadores asociados a clima	58
8.8.2. Biomarcadores asociados a urbanización	59
8.8.3. Biomarcadores asociados a región geográfica.....	60
8.8.4. Biomarcadores asociados al tipo de sitio.....	61
8.9. Predicciones de perfiles y funciones metabólicas.....	63
8.9.1. Comparación de módulos y vías KEGG	63
8.9.2. Diferencias en vías metabólicas.....	66
IX. DISCUSIÓN	68
X. CONCLUSIONES	77
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	79
XII. ANEXOS	106
12.1. Reporte de Evaluación de Similitud y Originalidad.....	106

Índice de Figuras

Figura		Pág.
1	Mapa de ubicación de los sitios de muestreo monitoreados en este estudio.	34
2	Frecuencias relativas de filos bacterianos observados en queso fresco sinaloense artesanal.	37
3	Frecuencias relativas de familias observadas en queso fresco sinaloense artesanal.	38
4	Curvas de rarefacción de muestras de queso fresco sinaloense artesanal.	41
5	Métricas de diversidad alfa por sitio muestreado.	45
6	Agrupamiento jerárquico UPGMA a dos vías con mapa de calor de las abundancias relativas a nivel familia.	47
7	Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) por Unifrac Generalizado de los perfiles de composición bacteriana.	49
8	Gráfico Krona de las abundancias relativas (%) de las familias constituyentes de la microbiota central del queso fresco sinaloense artesanal.	51
9	Agrupamiento jerárquico UPGMA a dos vías con mapa de calor de las abundancias relativas de patógenos.	54
10	Agrupamiento jerárquico UPGMA a dos vías con mapa de calor de las abundancias relativas de probióticos.	57
11	Gráfico LEfSe de los biomarcadores taxonómicos asociados a clima.	58
12	Gráfico LEfSe de los biomarcadores taxonómicos asociados a urbanización.	59
13	Gráfico LEfSe de los biomarcadores taxonómicos asociados a la región.	61
14	Gráfico LEfSe de los biomarcadores taxonómicos asociados al tipo de sitio.	62
15	Predicción funcional diferencial (<i>PICRUSt/MinPath/LEfSe</i>) de los módulos KEGG obtenidos en Proteobacteria Dominantes y Firmicutes Dominantes.	65
16	Predicción funcional diferencial (<i>PICRUSt/MinPath/LEfSe</i>) de las vías KEGG obtenidas en Proteobacteria Dominantes y Firmicutes Dominantes.	67

Índice de Cuadros

Cuadro		Pág.
1	Sitios de muestreo explorados en este estudio.	33
2	OTUs observadas en este estudio a diferentes niveles taxonómicos.	35
3	Familias representativas observadas en el queso fresco sinaloense artesanal.	39
4	Métricas de diversidad alfa de las muestras de queso fresco sinaloense artesanal.	43
4	Métricas de diversidad alfa de las muestras de queso fresco sinaloense artesanal (Continuación).	44

Abreviaturas

ACE: Estimadores de Cobertura basados en Abundancia (del inglés, *Abundance-based Coverage Estimators*).

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARNr: Ácido Ribonucleico ribosomal.

FDR: Tasas de Falsos Descubrimientos (del inglés, *False-Discovery Rates*).

KEGG: Enciclopedia de Kioto de Genes y Genomas (del inglés, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

KO: Ortología KEGG (del inglés, *KEGG Orthology*).

LEfSe: Análisis Discriminante Lineal con Tamaño de Efecto (del inglés *Linear Discriminant Analysis Effect Size*).

LDA: Análisis Discriminante Lineal (del inglés *Linear Discriminant Analysis*).

MinPath: Conjunto Mínimo de Vías (del inglés, *Minimal set of Pathways*).

OTUs: Unidades Taxonómicas Operacionales (del inglés, *Operational Taxonomic Units*).

pb: pares de bases.

PCoA: Análisis de Coordenadas Principales (del inglés, *Principal Coordinates Analysis*)

PICRUSt: Investigación Filogenética de Comunidades por Reconstrucción de Estados No Observados (del inglés, *Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States*).

UPGMA: Método de Grupos de Pares No Ponderados con Media Aritmética (del inglés, *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

RESUMEN

Introducción: El queso fresco sinaloense artesanal, arraigado en la gastronomía, cultura y economía local, carece de investigación científica respecto a su microbiota y la relación con calidad y seguridad de estos lácteos. Este estudio se enfoca en este vacío explorando la estructura y diversidad de la comunidad bacteriana. **Objetivo:** Describir la composición bacteriana presente en el queso fresco sinaloense de producción artesanal utilizando técnicas de metagenómica dirigida y bioinformática. **Metodología:** Se obtuvieron 30 muestras de 10 comunidades sinaloenses diversas. Con secuenciación V3 ARNr 16S se exploró la comunidad bacteriana. Con herramientas bioinformáticas y estadísticas se abordó asignación taxonómica, detección de patógenos y probióticos, identificación de biomarcadores taxonómicos y predicción funcional. **Resultados:** La secuenciación masiva reveló 978 OTUs, destacando los filos dominantes Proteobacteria y Firmicutes. La composición varió por clima, urbanización, región y sitio. Biomarcadores revelaron asociación de variables ambientales y geográficas en la comunidad bacteriana. Patógenos y probióticos se identificaron, funciones metabólicas incluyeron síntesis proteica, metabolismo energético y de carbohidratos, con vínculos patogénicos. **Conclusiones:** Este estudio profundo de la microbiota en el queso fresco Sinaloense Artesanal resalta a Proteobacteria y Firmicutes como claves en su estructura bacteriana, influyendo en su calidad. Presencia de patógenos y probióticos sugiere relevancia en seguridad alimentaria y salud. Consistencia geográfica señala uniformidad valiosa en la microbiota. Patrones climáticos y geográficos indican cómo el ambiente influye. El análisis funcional sugiere implicaciones nutritivas y sensoriales.

ABSTRACT

Introduction: Artisanal Sinaloan fresh cheese, rooted in local gastronomy, culture and economy, lacks scientific research regarding its microbiota and the relationship with quality and safety of these dairy products. This study addresses this gap by exploring the structure and diversity of the bacterial community. **Objective:** To describe the bacterial composition present in Sinaloan artisanal fresh cheese using directed metagenomics and bioinformatics techniques. **Methodology:** Thirty samples from 10 different communities in Sinaloa were obtained. With 16S rRNA V3 sequencing, the bacterial community was explored. Using bioinformatics and statistical tools, taxonomic assignment, detection of pathogens and probiotics, identification of taxonomic biomarkers, and functional prediction were applied. **Results:** Mass sequencing revealed 978 OTUs, highlighting the dominant phyla Proteobacteria and Firmicutes. The composition varied by climate, urbanization, region, and site. Biomarkers revealed association of environmental and geographic variables in the bacterial community. Pathogens and probiotics were identified, metabolic functions included protein synthesis, energy and carbohydrate metabolism, with pathogenic links. **Conclusions:** This in-depth study of the microbiota in Artisanal Sinaloense Fresh Cheese highlights Proteobacteria and Firmicutes as keys to its bacterial structure, influencing its quality. Presence of pathogens and probiotics suggests relevance in food safety and health. Geographic consistency signals valuable uniformity in the microbiota. Weather and geographic patterns indicate how the environment influences. Functional analysis suggests nutritional and sensory implications.

I. INTRODUCCIÓN

El queso, una joya culinaria y nutricional obtenida a partir de la fermentación de la leche, adquiere formas y sabores diversos en todo el mundo. Su creación se enfoca en preservar los componentes primordiales de la leche, transformándose en un manjar altamente nutritivo con cualidades que deleitan el paladar (Gobbetti et al., 2018). Su origen se remonta a Asia Menor, específicamente a la antigua Turquía alrededor del 7,000 A.C., y se alza como uno de los pocos alimentos ricos en microorganismos vivos y activos. Los grupos microbianos que intervienen en su elaboración, compuestos por bacterias, levaduras y hongos filamentosos (mohos) (ASM, 2015), juegan roles ecológicos esenciales en la coagulación, maduración y transformación de componentes clave como grasas, proteínas y aminoácidos, configurando las propiedades sensoriales únicas del queso (Von Neubeck et al., 2015).

Las complejas interacciones químicas y enzimáticas entre el queso y su comunidad bacteriana residente, denominada microbiota del queso, son responsables de su sabor distintivo. La amplia gama de factores, como la naturaleza de las caseínas, la grasa y los carbohidratos en la leche base, junto con las modificaciones bioquímicas impulsadas por las bacterias colonizadoras de la matriz del queso, engloban una red determinante en la creación de sabores y texturas. Estas bacterias pueden provenir de la contaminación ambiental, el uso de leche no pasteurizada o ser agregadas intencionadamente como iniciadores microbianos (Khalid y Marth, 1990; Smit et al., 2005; Milani et al., 2020). Un ejemplo paradigmático es el de las bacterias ácido-lácticas, que inducen la acidificación y precipitación de la proteína-caseína en la leche, separando la cuajada y el suero (Fox y McSweeney, 2004).

Dentro de la diversidad quesera, el queso fresco se distingue como un ícono en México y otros países de América Latina, y su popularidad está en aumento en Estados Unidos (Torres-

Llanez et al., 2006). Su capacidad de ser consumido inmediatamente después de su elaboración heterogénea a partir de leche cruda de vaca que permite la incorporación de formas y sabores regionales, poseen un atractivo distintivo (Van Hekken y Farkye, 2003). Sin embargo, esta diversificación también puede conducir a la ausencia de seguimiento y cumplimiento de normativas, acarreado la presencia de microorganismos potencialmente patógenos y el riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos (González-Córdova et al., 2016; Méndez-Romero et al., 2021). Aunque la regulación vigente, como la NOM-183-SCFI-2012 (DOF, 2012), enmarca los controles microbiológicos convencionales, no aborda la trascendencia de la composición global de la comunidad microbiana en el producto final (Murugesan et al., 2018).

En la actualidad, la exploración de los consorcios microbianos se materializa a través de la metagenómica, un análisis del ADN total presente en una muestra. Este enfoque, conocido como Metagenómica, ofrece nuevas perspectivas sobre las comunidades microbianas y su dinámica (Handelsman et al., 1998; Escobar-Zepeda et al., 2016). Las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento han develado un entendimiento más profundo de estos ecosistemas microbianos, incluida la secuenciación de amplicones, que ha emergido como el método más prominente para analizar comunidades microbianas, aplicable a diversas muestras. Los genes marcadores esenciales, como el ADN ribosomal 16S para procariotas y el 18S y espaciadores transcritos internos (ITS) para eucariotas, son fundamentales en este enfoque (Klindworth et al., 2013; Liu et al., 2021).

La trascendencia de esta investigación radica en la posibilidad de promover la seguridad alimentaria, la calidad y la potencial innovación en la producción de queso fresco en Sinaloa, México. Con el fin de salvaguardar la salud pública y reforzar la industria quesera local, se busca comprender la interacción de la microbiota con este producto emblemático. La

implementación de regulaciones adaptadas a la región y el aprovechamiento de la diversidad microbiana podrían no solo garantizar la seguridad de los consumidores, sino también enriquecer la experiencia culinaria y respaldar el arraigo cultural de Sinaloa. En este sentido, la investigación tiene el potencial de elevar la calidad y la apreciación de los productos locales en la región, consolidando así su identidad gastronómica.

II. ANTECEDENTES

2.1. Origen y transformación del Queso

El queso, un alimento nacido de la leche fermentada, despliega una diversidad sorprendente de sabores y formas en todo el globo terrestre, manteniendo el propósito fundamental de conservar la riqueza proteica y grasa de la leche. A lo largo de su evolución, el queso ha trascendido su función básica, transformándose en una delicia culinaria de alta categoría, dotada de cualidades sensoriales únicas que armonizan con las preferencias palatales y aportan un valor nutricional sobresaliente. La variedad se revela en torno a un estimado de 1,000 tipos distintos de queso en todo el mundo (Fox y McSweeney, 2004; Gobbetti et al., 2018). La gestación de este alimento se encuentra arraigada en la región del Creciente Fértil, un tramo geográfico enmarcado por los ríos Tigris y Éufrates hasta la costa mediterránea del sur de la actual Turquía, cuyo inicio data de aproximadamente 8,000 años atrás durante la Revolución Agrícola. El discernimiento de las bondades nutritivas de la leche derivada de animales domesticados dio pie a la idea de compartir este valioso recurso lácteo entre los humanos y su progenie. Las cabras y las ovejas, caracterizadas por su naturaleza gregaria y dócil, se erigieron como las primeras especies proveedoras de leche, aunque el ganado bovino ha asumido el rol predominante en la producción lechera global, representando cerca del 85% del suministro total de leche en el mundo (principalmente de la especie *Bos taurus*) (Fox y McSweeney, 2004).

2.2. Fases en la elaboración del queso

La confección de queso se desglosa en diversas etapas fundamentales, cada una de las cuales ejerce un papel crucial en la consecución de sus características distintivas. Estas fases

cruciales son: acidificación, coagulación, modificaciones post-coagulación y maduración (Fox y McSweeney, 2004; Bintsis y Papademas, 2017).

2.2.1. Acidificación

El proceso inicial de acidificación, cuyo eje radica en el uso de bacterias lácticas autóctonas o cultivos de suero natural, desencadena una serie de procesos químicos esenciales para el sabor y la textura del queso. Si bien métodos tradicionales subsisten en ciertas variedades artesanales, la introducción global de cultivos iniciadores seleccionados ha conferido mayor control sobre el proceso y la calidad del producto final. Estos iniciadores pueden ser de cepas mixtas, que combinan distintas cepas de bacterias ácido-lácticas, o de cepas definidas, que contienen variantes conocidas de estas bacterias (Fox y McSweeney, 2004; Bintsis y Athanasoulas, 2015; Bintsis y Papademas, 2017). Los roles de la acidificación son múltiples:

- Controlar el desarrollo de microorganismos patógenos o deteriorantes.
- Influir en la actividad enzimática durante la maduración, moldeando el sabor y la calidad del queso.
- Disolver el fosfato de calcio coloidal, regulando el contenido de calcio en la cuajada y su proporción soluble, factores esenciales para la textura.
- Promover la separación de fases, determinando la composición del queso y el crecimiento de la microbiota.
- Afectar la actividad del coagulante y su retención en la cuajada, influyendo en la tasa de proteólisis en la maduración (McSweeney, 2007).

2.2.2. Coagulación

La etapa de coagulación, esencial para todas las variedades de queso, se materializa a través de múltiples enfoques, incluyendo proteólisis limitada por proteinasas seleccionadas, acidificación a pH 4.6 o a pH aproximado de 5.2 en combinación con calentamiento a 90 °C.

La coagulación puede engendrar gelificaciones ácidas o con cuajo, siendo esta última técnica la responsable de más del 75% de la producción quesera global. En torno al 70% de las variedades de queso, son elaboradas mediante coagulación enzimática, mientras que otras, como Cottage y Quark, son fruto de la coagulación ácida, en la cual las caseínas α y β se funden en un gel insoluble con la grasa incrustada en esta matriz proteica (Fox y McSweeney, 2004; Fox y Guinee, 2013; Bintsis y Papademas, 2017).

2.2.3. Modificaciones post-coagulación

Tras el logro de la cuajada o coágulo, se desencadenan pasos adicionales específicos para cada variedad de queso, desembocando en la concentración de aproximadamente diez veces de componentes como caseína, grasa y fosfato cálcico micelar. Dichos pasos pueden incluir el corte del gel en partículas de cuajada, el escaldado (calentamiento de las partículas en suero), el cheddarizado (tritución de bloques de cuajada), el lavado de cuajada, el estiramiento de pasta hilada, el moldeado de forma y peso, el drenado por prensado y la salazón (Fox y McSweeney, 2004; Bintsis y Papademas, 2017).

2.2.4. Maduración

Aunque algunas variedades de queso son apreciadas en su frescura, la mayoría atraviesa un período de maduración, que oscila entre 2 semanas (Mozzarella) y 2 años (Parmigiano-Reggiano o Cheddar extramaduro). Si bien las características únicas de los quesos se empiezan a desarrollar durante la elaboración, la maduración desempeña un rol crucial en la refinación de sus propiedades. Aunque la cuajada puede variar en cada variedad, los cambios bioquímicos esenciales que ocurren durante la maduración y, en consecuencia, las propiedades sensoriales, están en gran medida predefinidos por el proceso de creación, así como por factores como la composición, humedad, contenido de sodio y pH, además de los tipos de iniciadores y microorganismos secundarios agregados (Fox y McSweeney, 2004).

A medida que se explora el laberinto de la creación quesera, queda claro que cada fase posee un propósito distintivo en la producción de este manjar culinario. El entendimiento más profundo de estas etapas y su influencia en la calidad y características del queso brinda una base esencial para la optimización de su elaboración y la exploración de nuevas posibilidades gastronómicas.

2.3. Clasificación de variedades de queso

La clasificación de las diversas variedades de queso se fundamenta en una serie de atributos, según McSweeney et al. (2017). Estos criterios comprenden la textura, influenciada en gran medida por el contenido de humedad, el método de coagulación, que a menudo se toma como criterio principal y los índices de maduración. Davids (1965) aborda la clasificación basada en el contenido de humedad, con <25% para variedades muy duras, 25–36% para duras, 36–40% para semiduras y >40% para blandas. Fox (1993) sugiere la clasificación en superfamilias según el agente coagulante, incluyendo quesos de cuajo, quesos ácidos (como Cottage, Quark y Crema) y calor/ácido (por ejemplo, Ricotta, Manouri). Fox et al. (2000) y Fox y McSweeney (2004) amplían la categorización de quesos coagulados con cuajo, basándose en agentes de maduración característicos y tecnología de fabricación.

2.4. Quesos artesanales

Los quesos artesanales se definen como productos lácteos producidos a pequeña escala, utilizando leche producida en la granja y siguiendo las técnicas tradicionales de elaboración del queso propias de cada región (Kamimura et al., 2019). Los quesos artesanales son muy apreciados por los consumidores y tienen un importante significado social, económico y cultural. Su trascendencia económica es debida a sus propiedades específicas según la región en la que se elaboran (Rodrigues et al., 2020). En México, los quesos artesanales reflejan rasgos culturales, territoriales, históricos y de estilo de vida propios de las regiones donde

son preparados (Morales et al., 2011; De la Rosa-Alcaraz et al., 2020). Hasta la fecha, alrededor de 40 variedades diferentes de queso han sido reconocidas como quesos mexicanos artesanales genuinos (Villegas de Gante et al., 2014), siendo las variedades Cocido de Sonora, Oaxaca, Chihuahua, Crema de Chiapas, Bola de Ocosingo y Poro de Tabasco algunas de las más destacadas (De la Rosa-Alcaraz et al., 2020). Un emblema de este impacto es el queso Cotija, galardonado internacionalmente por su calidad (Escobar-Zepeda et al., 2016).

2.5. Quesos mexicanos

La tradición quesera en México se remonta a más de 500 años atrás, con la llegada de la colonización española que trajo consigo procesos culturales y técnicas de producción. A pesar de su historia relativamente breve, México cuenta con más de 40 variedades de queso, elaborados siguiendo recetas europeas pero adaptadas a los gustos del Nuevo Mundo. La amplia gama de quesos mexicanos abarca desde los frescos hasta los semiañejos y añejos, con el queso fresco representando cerca del 80% de la producción (Jiménez-Guzmán et al., 2009; Torres-Vitela et al., 2012; González-Córdoba et al., 2016). En particular, el queso Panela, Oaxaca, Chihuahua y otros, capturan la diversidad y tradición de la gastronomía mexicana.

2.5.1. Queso fresco

El queso fresco, popular en México y Latinoamérica, adopta variantes como Aro, Molido y Ranchero (Torres-Llanez et al., 2006; Cervantes-Escoto et al., 2013; González-Córdoba et al., 2016). Su proceso de fabricación, aunque similar en muchos aspectos, resulta en una variedad de composiciones fisicoquímicas debido a diferencias regionales (Van Hekken y Farkye, 2003; González-Córdoba et al., 2016).

2.5.2. Queso Panela

El queso Panela, similar al Feta griego, se distingue por su suavidad, dulzura y forma moldeada en canasta. Se elabora con leche de vaca, cabra o una mezcla de ambas, también se elabora con leche descremada. Al elaborarse generalmente con leche pasteurizada, su manufactura puede llevar algún grado de automatización. A pesar de esto, también se produce en menor cantidad a partir de leche cruda por queseros artesanales. (Jiménez-Guzmán et al., 2009; Saxer et al., 2013; Cervantes-Escoto et al., 2013; González-Córdoba et al., 2016).

2.5.3. Queso Oaxaca

El queso Oaxaca, conocido como queso de Bola, de Hebra o Quesillo, comprende una de las variedades más populares y de mayor consumo a nivel nacional, con producción distribuida por todo el país tanto a niveles industriales como artesanales. Durante el proceso de elaboración de este queso, la cuajada se acidifica hasta alcanzar un pH de 5.3 y luego se amasa en agua caliente y se estira. Se forman tiras finas a partir del queso en formación, que se enfrían en agua con sal y luego se cortan en segmentos. Posteriormente, los segmentos se trenzan en la típica forma de bola o nudo, que puede pesar desde unos pocos gramos hasta varios kilogramos. El proceso de producción artesanal es similar al queso Mozzarella, y requiere un conocimiento específico de varios pasos críticos durante el proceso de elaboración que deben ser reconocidos por el artesano, como la acidez necesaria para obtener un queso estirable o la cantidad de sal que se debe agregar. Estas habilidades queseras son esenciales para minimizar la variabilidad entre diferentes lotes de producción y sus características sensoriales y estructurales. Debido a su producción a partir de leche cruda, sus notas de sabor son lácteas, mantecosas, ácidas y fermentadas (Caro et al., 2011; Villanueva-Carvajal et al., 2012; Cervantes-Escoto et al., 2013; Villegas de Gante et al., 2014; González-Córdoba et al., 2016).

2.5.4. Queso Chihuahua

El queso Chihuahua, también conocido como queso Menonita o Chester, posee raíces en la comunidad menonita. Se produce principalmente a partir de leche de vaca pasteurizada, ya sea entera o con un contenido de grasa estandarizado. El origen de este queso está ligado a las comunidades menonitas que emigraron de Canadá a México en la década de 1920 y se asentaron en el estado de Chihuahua. Actualmente, también se produce en regiones donde no existen asentamientos menonitas, lo que ha resultado en la existencia de muchas variaciones que, aunque se consideran genuinas, poseen su propio conjunto único de características (Cervantes-Escoto et al., 2013; González-Córdoba et al., 2016).

2.5.5. Queso Bola de Ocosingo

El queso Bola de Ocosingo se destaca por su peculiar proceso de elaboración, que involucra la superposición de dos quesos. Esta tradición arraigada en la comunidad contribuye a su carácter distintivo. Tiene una forma esférica dura y pesa aproximadamente 1 kg. Este fue el primer queso de marca colectiva en México, y recientemente se ha buscado una protección más amplia, como una clasificación *Denominación de Origen Protegida* para este queso. Su distinción como marca colectiva se basa en su producción artesanal que utiliza leche cruda exclusivamente de ganado cebú-pardo suizo en Ocosingo (Cervantes Escoto et al., 2008; González-Córdoba et al., 2016).

2.5.6. Queso Poro de Balancán

El queso Poro de Balancán es producido únicamente por queseros artesanales ubicados en los municipios de Balancán, Tenosique, Jonuta y Emiliano Zapata en Tabasco, México. Este queso se encuentra protegido como marca colectiva. Es un queso fresco, aunque puede madurar involuntariamente hasta en 4 semanas si su distribución es lenta. Se vende en pequeñas piezas rectangulares y recubiertas de cera y celofán amarillo. También está

desmineralizado y se desmenuza porque la cuajada y el queso se superponen durante el proceso de moldeado. Por lo tanto, parece estar separado en capas y en ocasiones tiene pequeños poros, de ahí su nombre. Su apariencia es un efecto común de la microbiota típicamente presente. Para su fabricación, solo se utiliza leche cruda de la variedad de ganado cebú-pardo suizo. Sus procesos de elaboración específicos son cruciales para conseguir su acidez y sabor característicos (Cervantes Escoto et al., 2013; Aldrete-Tapia et al., 2014; González-Córdoba et al., 2016).

2.5.7. Queso Crema de Chiapas

El queso Crema de Chiapas, con variaciones según la región. Su sabor es ácido y su pasta fresca, blanda y prensada. Este tipo de queso se obtiene a través de una coagulación ácido-enzimática prolongada de la leche cruda de vaca y tiene características sensoriales únicas debido a las bacterias ácido-lácticas endógenas en la leche de esta región. La elaboración comienza con la maduración de la leche durante 3 a 5 h a temperatura ambiente (≥ 25 °C) para que la microflora natural se multiplique; luego, se agrega cuajo y se produce la coagulación durante aproximadamente 2 a 8 h para producir una cuajada altamente ácida. Luego, la cuajada se corta y se deja reposar durante la noche. Al día siguiente, la cuajada se coloca en bolsas de algodón que se cuelgan para escurrir el suero. Al final de este período de escurrido, la cuajada alcanza un pH de 4.5 y está lista para amasarse, salarse, moldearse y prensarse en una prensa rústica de madera o metálica. Se comercializa en piezas rectangulares recubiertas con un empaque de 3 capas: film plástico, papel de aluminio y celofán amarillo o rojo. Es uno de los quesos artesanales mexicanos con marca colectiva y con potencial para obtener una *Denominación de Origen Protegida* (Cervantes Escoto et al., 2008; Villegas de Gante et al., 2014; González-Córdoba et al., 2016).

2.5.8. Queso Cotija

El queso Cotija, con diversas formas y raíces históricas. Aunque su nombre está ligado al pueblo de Cotija, Michoacán, la producción tradicional se concentra en una pequeña región ubicada a lo largo de la cordillera oriental de la Sierra de Jalmich, entre los estados de Jalisco y Michoacán. Sin embargo, versiones similares se producen en diferentes condiciones y con distintos procesos de elaboración, principalmente en los estados de Jalisco, Michoacán, Veracruz y Chiapas, donde generalmente se consideran quesos de imitación. En 2005 se buscó y logró la designación como marca colectiva, con el objetivo de diferenciar el auténtico queso Cotija de sus imitaciones. Por lo tanto, el queso se clasificó según su región oficial de origen. Posteriormente, con el apoyo de grupos académicos, se reguló su fabricación artesanal y estandarizada, lo que resultó en la creación y aprobación de un reglamento normativo. A la fecha, el queso Cotija regional es el único queso en México cuya producción artesanal está regulada exclusivamente por una norma oficial mexicana (COFOCALEC, 2011; Escobar-Zepeda et al., 2016; González-Córdoba et al., 2016).

2.6. Diversidad microbiana en quesos mexicanos

El estudio de la composición microbiana en quesos mexicanos específicos ha revelado una riqueza de especies. En el caso del queso Chihuahua, Renye et al. (2011) identificaron especies como *Streptococcus thermophilus*, *S. macedonicus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc mesenteroides*. La investigación de Caro et al. (2013) en queso Oaxaca reveló la presencia predominante de *Lactobacillus* spp., siendo *Lb. plantarum* la especie más abundante. La composición bacteriana del queso Poro está dominada por *S. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* (Aldrete-Tapia et al., 2014), mientras que en el queso Cotija se observaron diversidad bacteriana y fúngica, incluyendo taxones como

Lactobacillus spp., *Leuconostoc* spp., *Weisella* spp., *Candida etchellsii*, *Pichia kudriavzevii* y *Moniliella suaveolens* (Escobar-Zepeda et al., 2016).

El entendimiento más holístico de la diversidad microbiana en quesos mexicanos proviene del estudio exhaustivo de Murugesan et al. (2018), quienes emplearon secuenciación de ADN de alto rendimiento para analizar 14 variedades de queso consumidas frecuentemente en México. Estas variedades, recolectadas de diferentes estados, mostraron comunidades microbianas centrales compuestas por géneros bacterianos como *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Aerococcus* y *Weisella*. En el reino fúngico, se destacan *Galactomyces reessii*, *Scheffersomyces stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae*, incluyendo su variante vinícola rml 1-1^a. Se presume que estos miembros microbianos están involucrados en varias etapas del proceso de producción, contribuyendo a la diversidad sensorial y cualidades de los quesos. Además, estas comunidades bacterianas y fúngicas interactúan positiva y negativamente, influenciando la composición final de la biota microbiana en los quesos mexicanos.

Este análisis revela la rica diversidad microbiana que contribuye a las características únicas de los quesos mexicanos, destacando la importancia de comprender las interacciones microbianas en la producción y maduración de estos productos lácteos tradicionales.

2.7. Microbioma y Microbiota

El concepto de microbioma fue inicialmente acuñado por los destacados microbiólogos Lederberg y McCray (2001), con el propósito de conceptualizar la "comunidad ecológica compuesta por microorganismos comensales, simbioses y patógenos que comparten, en una relación intrincada, nuestro entorno corporal". Con el paso del tiempo, este término ha evolucionado y ha dado paso a las definiciones actuales de "microbiota" y "microbioma". En

el ámbito actual de la microbiología, "microbiota" se emplea para referirse a la población de microorganismos presentes en un entorno específico, mientras que "microbioma" abarca no solo a los microorganismos en sí, sino también a su hábitat, información genética y al contexto ambiental que los rodea (Marchesi y Ravel, 2015).

2.8. Secuenciación de ADN como herramienta de exploración de la taxonomía y diversidad microbiana

2.8.1. Contextos históricos de las técnicas de clasificación bacteriana

A lo largo de la historia de la microbiología, se han empleado diversas estrategias para la investigación y clasificación de bacterias, que abarcan desde métodos tradicionales, como la utilización de medios de cultivo selectivos y pruebas bioquímicas, pasando por enfoques serológicos y tinciones (Duquenne, 2018). Si bien estas aproximaciones han sido valiosas en la obtención de información sobre la microbiota que puede ser cultivada en laboratorio, su exactitud y aplicabilidad se han visto superadas con el tiempo por métodos de mayor complejidad y sofisticación, como son las técnicas moleculares que se basan en la extracción y secuenciación del ADN genómico (Jo et al., 2020).

2.8.2. Secuenciación de ADN

Durante la década de los 70's, Maxam y Gilbert desarrollaron la secuenciación química, seguido por la innovadora técnica de terminación de cadena de Sanger (Maxam y Gilbert, 1977; Sanger et al., 1977). Este último método marcó un hito en la Biología al permitir secuencias más extensas en un período de tiempo más reducido y con una mayor fiabilidad de secuencia obtenida. Con el transcurso de los años, la secuenciación ha experimentado un proceso de evolución, consolidándose como un pilar esencial en la investigación de los ácidos nucleicos (Buermans y den Dunnen, 2014).

2.8.3. Secuenciación de alto rendimiento

La secuenciación de alto rendimiento, también conocida como “*Next Generation Sequencing*” (NGS), se ha convertido en la piedra angular de la secuenciación genómica al abordar de manera masiva y simultánea fragmentos cortos de ADN, conocidos como "lecturas" o "*reads*" (Jo et al., 2020). Esta revolución tecnológica ha tenido un impacto notable al ampliar de manera extraordinaria la capacidad de secuenciación, reduciendo tiempo y costo por base secuenciada (Buermans y den Dunnen, 2014). Como resultado, se ha visto la aparición de una variedad de plataformas con distintas características, las cuales han habilitado la investigación y el manejo de información en campos que abarcan desde la prevención, el diagnóstico y el tratamiento hasta el monitoreo de diversas enfermedades (Liu et al., 2012). Las tecnologías de secuenciación han revolucionado el panorama de las ciencias biológicas, ofreciendo una perspectiva sin precedentes de sistemas biológicos que antes resultaban inaccesibles. Gracias a su eficiencia, capacidad de reproducción y velocidad, se han ampliado considerablemente las posibles aplicaciones, abarcando la caracterización de la diversidad y las funciones de microbiomas complejos en una variedad de entornos (Ghurye et al., 2016).

2.8.4. Metagenómica como instrumento para la exploración de la diversidad microbiana

La metagenómica, como un campo interdisciplinario, ha surgido como una respuesta a esta evolución tecnológica, fusionando la genética molecular, la ecología microbiana y el análisis de datos (Ferravante et al., 2021). Esta disciplina se divide en dos enfoques clave para obtener secuencias genómicas. Por un lado, la metagenómica dirigida se basa en la secuenciación de marcadores moleculares específicos, como el gen ARNr 16S, que es conocido por su universalidad y aplicaciones filogenéticas. Este gen codifica la subunidad menor del ARNr

y se ha convertido en el marcador por excelencia para la identificación bacteriana debido a su capacidad para ofrecer información filogenética y desglosar la diversidad microbiana en una variedad de entornos (Fischer et al., 2016; Huse et al., 2008; Yuan et al., 2015). Esta técnica de secuenciación se basa en la amplificación y secuenciación de regiones específicas de este gen, lo que permite determinar con precisión la composición de la microbiota en muestras de diferentes entornos, revelando así la riqueza bacteriana en esos lugares. La metagenómica "shotgun" se enfoca en la secuenciación de genomas completos, lo que permite el estudio integral de genes de organismos presentes en una muestra, incluyendo especies eucariotas, procariotas y virus. Este enfoque no se limita a marcadores específicos, sino que aborda todos los genes presentes en una comunidad microbiana, lo que proporciona una comprensión más completa de la composición y las funciones de las comunidades microbianas presentes en diversos entornos (Quince et al., 2017). Al estudiar los genomas completos, la metagenómica shotgun permite desentrañar las interacciones y funciones de los microorganismos con un nivel de detalle sin precedentes, lo que contribuye a avanzar en la comprensión de la ecología microbiana y su relevancia en la ciencia biológica

III. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

El queso fresco sinaloense de producción artesanal es un alimento tradicional de gran importancia cultural y económica en la región. Sin embargo, existe una falta de conocimiento científico en relación con la comunidad bacteriana presente en este producto y su influencia en la calidad, seguridad alimentaria y características organolépticas.

La diversidad bacteriana en el queso fresco sinaloense puede estar influenciada por diversos factores, como las prácticas de producción artesanal y las condiciones ambientales. La falta de estudios metagenómicos exhaustivos limita la comprensión de las especies bacterianas presentes y su potencial contribución a la formación de compuestos beneficiosos o indeseables en el queso.

Además, las interacciones microbianas y los factores ambientales pueden desempeñar un papel fundamental en la composición y dinámica de la comunidad bacteriana en el queso fresco sinaloense. Sin embargo, la investigación sobre estas interacciones y su impacto en la calidad del producto es escasa.

La falta de información científica en torno a la comunidad bacteriana del queso fresco sinaloense limita el desarrollo de estrategias específicas de control y mejora para garantizar su calidad y seguridad alimentaria. Es necesario abordar esta brecha de conocimiento y comprender en profundidad la diversidad bacteriana presente, así como las interacciones y factores que influyen en ella, con el fin de mejorar la calidad y la seguridad del queso fresco sinaloense de producción artesanal.

Preguntas de investigación:

1. ¿Cuál es la composición y diversidad bacteriana presente en el queso fresco sinaloense de producción artesanal?

2. ¿Qué taxones bacterianos están presentes en el queso fresco sinaloense y cómo impactan en la calidad y la seguridad alimentaria del producto?

IV. JUSTIFICACIÓN

Este estudio posee una sólida base científica debido a la importancia de comprender en profundidad la comunidad bacteriana presente en el queso fresco sinaloense de producción artesanal. La descripción exhaustiva de la diversidad bacteriana y su función es fundamental para predecir los mecanismos que subyacen a la calidad y características organolépticas del producto. El análisis metagenómico dirigido, permitirá identificar las especies bacterianas presentes y su potencial capacidad para sintetizar metabolitos de relevancia alimentaria.

Este estudio tendrá implicaciones prácticas y aplicables en la producción y calidad del queso fresco sinaloense. El conocimiento adquirido permitirá el diseño de estrategias específicas de control y mejora basadas en la comprensión de la comunidad bacteriana involucrada en el proceso de producción. Estas estrategias podrían incluir la selección de cepas bacterianas beneficiosas, el ajuste de condiciones ambientales óptimas y la implementación de prácticas de higiene adecuadas para garantizar la seguridad alimentaria y la calidad del queso fresco sinaloense de producción artesanal. En última instancia, este estudio contribuirá al avance científico en el campo de la microbiología alimentaria y proporcionará una base sólida para la promoción de prácticas productivas más eficientes y sostenibles en la industria del queso artesanal.

V. HIPÓTESIS

El queso fresco sinaloense de producción artesanal alberga una diversa comunidad bacteriana constituida por los filos Firmicutes y Proteobacteria, cuya composición se asocia a factores ambientales y geográficos.

VI. OBJETIVOS

Objetivo general:

Describir la composición, estructura y diversidad bacteriana presente en el queso fresco sinaloense de producción artesanal.

Objetivos específicos:

1. Analizar y describir la composición taxonómica de la comunidad bacteriana en el queso fresco sinaloense artesanal.
2. Estimar la diversidad y abundancia de patógenos y probióticos presentes, y examinar las posibles relaciones entre estos grupos microbianos con factores ambientales específicos.
3. Identificar biomarcadores taxonómicos asociados a distintas variables, como el clima, la urbanización, la región geográfica y el tipo de sitio de muestreo.
4. Predecir perfiles y funciones metabólicas relevantes.

VII. METODOLOGÍA

7.1. Selección de muestras

Las muestras utilizadas en este estudio fueron colectadas en 10 diversas comunidades, abarcando una variedad geográfica para asegurar la representatividad de los resultados. Estas comunidades incluyen: 1. Concordia, Concordia; 2. Villa Unión, Mazatlán; 3. Mazatlán, Mazatlán; 4. El Quelite, Mazatlán; 5. Carboneras, Culiacán; 6. Culiacán Rosales, Culiacán; 7. Camotete, Badiraguato; 8. La Reforma, Angostura; 9. Los Mochis, Ahome y 10. Ejido Mochis, Ahome.

7.2. Tipo de estudio

Este proyecto de tesis adoptó un enfoque de investigación que combina las características de un estudio exploratorio, descriptivo, transversal y observacional. Estas dimensiones metodológicas fueron elegidas para cumplir con los objetivos planteados, permitiendo un análisis completo y enriquecedor de la variedad de quesos estudiados.

7.3. Muestra e individuos de estudio

Para asegurar la representatividad y confiabilidad de los resultados, en total, se consideraron 30 muestras (n=30), con la lógica distribución de 3 muestras por cada uno de los 10 sitios de colecta.

7.4. Tipo de muestreo

El muestreo por conveniencia fue adoptado para la selección de las muestras. Esta metodología se eligió debido a su practicidad y eficiencia en la obtención de muestras representativas de las variedades de queso fresco artesanal disponibles en las comunidades seleccionadas.

7.5. Criterios de inclusión

Las muestras seleccionadas para este estudio cumplen con criterios específicos de inclusión:

- Pertenecen a la variedad de queso fresco.
- Son producidas de manera artesanal, respetando las técnicas tradicionales.
- Son elaboradas sin el uso de cultivos iniciadores.
- Se elaboran utilizando leche de vaca como ingrediente principal.
- Solo se incluyeron muestras producidas en el estado de Sinaloa

7.6. Criterios de exclusión

Para garantizar la coherencia y relevancia de las muestras, se aplicaron criterios de exclusión:

- Se excluyeron muestras que involucraran etapas de producción de tipo industrial.
- Muestras elaboradas utilizando cultivos iniciadores no fueron consideradas en el estudio.
- Aquellas muestras que no cumplieran con el uso exclusivo de leche de vaca fueron excluidas.

7.7. Criterios de eliminación

Durante el proceso de colecta y selección, se implementaron criterios de eliminación para asegurar la calidad y validez de los datos:

- Muestras que mostraron signos de deterioro alimenticio durante la colecta o transporte fueron eliminadas.
- Aquellas muestras cuyo procesamiento no se realizó de manera adecuada durante la etapa experimental fueron excluidas del análisis.

7.8. Selección de sitios de muestreo y colecta de muestra

La definición de los sitios de muestreo se basó en un criterio meticuloso, considerando la urbanización, la región en el estado, la venta y/o producción artesanal del queso fresco y el

tipo de clima. Durante la temporada de otoño de 2022, se procedió a la colecta de tres muestras de queso fresco en cada uno de los sitios de muestreo seleccionados. Los datos relativos a la elevación y el tipo de clima se obtuvieron mediante las fuentes fiables Elevation Finder (Disponible en <https://www.freemaptools.com/elevation-finder.htm>) y Climate Zones - Koppen-Geiger (Disponible en https://ggis.un-igrac.org/layers/igrac:other_climate_2007_koppen_geiger), respectivamente. Con el objetivo de mantener la integridad de las muestras, estas se transportaron rigurosamente bajo cadena de frío (2-8 °C) al Laboratorio de Microbiología y Biología Aplicada de la Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Sinaloa, hasta su posterior procesamiento.

7.9. Análisis de amplicones del ARN ribosomal 16S

7.9.1. Extracción de ADN

La extracción del ADN total se realizó empleando el ZymoBIOMICSTM DNA Miniprep Kit (Zymo Research Corp. CA, EU), el cual se ajustó al protocolo destinado a muestras de queso y biofluidos ricos en proteínas. No obstante, se modificó la cantidad de queso recomendada por el fabricante, utilizando 0.6 g de queso del núcleo de cada muestra. Para llevar a cabo una adecuada degradación proteica, se emplearon 40 µL de Proteinasa K 20 µg/µL a una temperatura de 55 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se aplicó una hora de agitación vigorosa mediante vapuleo por perlas en un vortex para asegurar una ruptura completa de la matriz del queso. Para lograr una eliminación eficaz de la grasa, se empleó una centrifuga refrigerada a 8 °C, centrifugando a 10,000 × g durante 1 minuto, resultando en la deposición superficial de la grasa. Para obtener la fase líquida, se removió con cuidado la película superficial usando una puntilla estéril.

7.9.2. Cuantificación de ADN y evaluación de calidad de extracción

La cuantificación del ADN extraído se efectuó con el kit QuantiFluor® ONE dsDNA System en un Quantus™ Fluorometer (Promega Ltd. Madison, WI, EU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones ≥ 5 ng/ μ L se consideraron adecuadas para la secuenciación masiva (Illumina Inc., 2013). Con el propósito de detectar inhibidores de la Taq polimerasa, se llevaron a cabo reacciones de PCR punto final de las regiones hipervariables V4-V6, siguiendo las condiciones detalladas por Campista-León et al. (2022). La visualización de los productos de PCR y la integridad del ADN total extraído se evaluaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 64 V durante 1.5 h, tiñendo con 1 μ L de GelRed™ 1X (Biotium, San Francisco, CA, EU).

7.9.3. Secuenciación masiva del fragmento de gen ARN ribosomal 16S

Una vez confirmada la calidad de la extracción de ADN, se subcontrató el servicio de secuenciación al Laboratorio de Genómica Microbiana del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD A.C.), Unidad Mazatlán. En dicho laboratorio, se llevaron a cabo las etapas esenciales de preparación de las librerías siguiendo el protocolo de Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (parte # 15044223 Rev.B; Illumina Inc., San Diego, CA, EU; Illumina Inc., 2013).

El proceso de preparación de las librerías constó de cuatro etapas fundamentales. En la primera etapa, se realizó la amplificación de la región V3 del gen ARNr 16S mediante PCR, utilizando oligonucleótidos específicos y adaptadores de Illumina. Esta amplificación selectiva permitió enfocarse en la región de interés y asegurar la precisión en la obtención de los fragmentos genéticos.

Seguido de ello, se procedió a la purificación de los amplicones mediante lavado con perlas magnéticas AMPureXP. Esta etapa fue esencial para eliminar fragmentos no deseados y

concentrar los amplicones específicos, lo que garantizó una muestra de alta calidad para la secuenciación.

En la tercera etapa, se llevó a cabo una segunda PCR con el propósito de generar la librería de secuenciación. Durante este proceso, se incorporaron adaptadores de secuenciación e índices de muestras individuales, lo que permitió identificar y distinguir cada muestra de manera precisa en el análisis posterior.

La cuantificación precisa de los amplicones se realizó utilizando el kit Quantification Assay de Thermo Scientific en un fluorómetro Qubit®, asegurando así que la cantidad de material genético en la librería fuera adecuada para el proceso de secuenciación.

Una vez completadas estas etapas, se procedió a la preparación de un pool con todas las librerías. Estas fueron ajustadas a concentración equimolar y la concentración total se estableció en 4 nM. Luego de esta etapa, se realizó la desnaturalización del pool y se procedió a diluirlo a una concentración final de 2 pM.

Finalmente, la secuenciación se llevó a cabo utilizando el kit Mid-output Flow cell de 300 ciclos en la plataforma MiniSeq™. El proceso de secuenciación se realizó en modo pair-end (2x150 pb), lo que permitió obtener secuencias de alta calidad y profundidad, siendo un componente esencial para el análisis posterior de los datos genómicos.

7.9.4. Tratamiento y análisis de secuenciación

Después de finalizar el proceso de secuenciación, los archivos FASTQ resultantes se sometieron a una serie de etapas exhaustivas de tratamiento y análisis utilizando la plataforma Microbiome Taxonomic Profiling (MTP) de EzBioCloud (Yoon et al., 2017; Disponible en <https://www.ezbiocloud.net/contents/16smtp>).

En primer lugar, se implementó un preprocesamiento inicial de las lecturas obtenidas. Esto implicó la eliminación de oligonucleótidos no deseados y la exclusión de secuencias con

valores de calidad PHRED inferiores a 25, con el objetivo de asegurar que solo se trabajara con lecturas de alta calidad.

La fusión de las lecturas pareadas se llevó a cabo mediante el uso del software VSEARCH, empleando los parámetros predeterminados definidos por Rognes et al. (2016). Una vez completado el proceso de fusión, se procedió a la extracción de lecturas no redundantes a través del método de Denoising. Estas lecturas no redundantes se utilizaron posteriormente en la asignación taxonómica utilizando nuevamente VSEARCH. En este paso, se realizó una búsqueda y cálculo de similitud de secuencias contra la base de datos PKSSU4.0 de EzBioCloud, siguiendo los criterios de similitud taxonómica propuestos por Yarza et al. (2014). Estos criterios incluyeron umbrales de similitud para las categorías taxonómicas, como especie, género, familia, orden, clase y filo.

Para garantizar la calidad del análisis, se procedió a la detección y eliminación de secuencias quiméricas utilizando el software UCHIME (Edgar et al., 2011). La generación de unidades taxonómicas operativas (OTUs) se realizó mediante el enfoque Referencia Abierta (Open Reference) siguiendo la metodología de Rideout et al. (2014). En este sentido, las secuencias que alcanzaron un nivel de similitud del 97% fueron agrupadas a nivel de especie. Cabe destacar que las secuencias que no cumplían con este umbral se agruparon mediante el método UCLUST (Edgar, 2010).

La culminación de estas estrategias de análisis y tratamiento generó el conjunto final de OTUs, que representa una caracterización taxonómica detallada de la comunidad microbiana presente en las muestras. A partir de este conjunto de OTUs, se calculó una serie de métricas de diversidad alfa, incluyendo OTUs observadas, ACE, Chao1, Shannon, Simpson y Diversidad Filogenética. Estas métricas proporcionaron una visión completa de la diversidad y composición de la comunidad microbiana bajo investigación.

7.10. Evaluación de dominancia y composición de microbiota central

Para llevar a cabo la evaluación de la dominancia y composición de la microbiota, se empleó la paquetería de R "microbiome" (Lahti y Shetty, 2018). Esta herramienta permitió calcular de manera precisa las métricas de dominancia, así como identificar los taxones dominantes presentes en cada muestra bajo estudio. Además, se realizó la determinación de los taxones que formaban parte de la microbiota central, conocida como la "core microbiota".

La evaluación de la dominancia microbiana proporcionó información fundamental sobre la abundancia relativa de los diferentes grupos taxonómicos presentes en cada muestra. Esto permitió una comprensión más profunda de cómo ciertos taxones pueden dominar la composición de la microbiota en diferentes contextos.

Uno de los aspectos clave del análisis fue la identificación de la microbiota central, que comprende los taxones microbianos que están presentes de manera constante en todas o la mayoría de las muestras. La identificación de esta "core microbiota" es esencial para comprender los componentes fundamentales de la comunidad microbiana y su posible función en el ecosistema estudiado.

Para presentar de manera clara y visual la abundancia de la microbiota central y su estructura jerárquica, se empleó la creación de un gráfico Krona (Ondov et al., 2011). Este gráfico permitió representar de manera eficaz y jerarquizada la distribución y abundancia de los diferentes taxones que conforman la microbiota central. Esta visualización fue esencial para comunicar los resultados de manera accesible y comprensible.

7.11. Detección de patógenos y probióticos

Para llevar a cabo la detección de patógenos y probióticos, se partió de la tabla de taxonomía previamente generada. En primer lugar, se realizó una búsqueda específica de patógenos utilizando un proceso de filtrado. Esta búsqueda se basó en la Comprehensive List Of

Bacterial Pathogens Infecting Humans (Bartlett et al., 2022), en la cual se listan patógenos bacterianos que afectan a los seres humanos. Esta lista proporcionó una referencia esencial para identificar los taxones relacionados con patógenos en las muestras.

Por otro lado, la búsqueda de probióticos se realizó con un enfoque en ciertos géneros microbianos con propiedades probióticas bien documentadas. Específicamente, los géneros considerados fueron *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc* y la especie *Streptococcus thermophilus*. Estos microorganismos han sido ampliamente estudiados y reconocidos por sus efectos beneficiosos para la salud (Holzapfel y Wood, 2014), y su identificación en la muestra podría proporcionar información valiosa sobre posibles componentes probióticos presentes en el ecosistema microbiano estudiado.

7.12. Descubrimiento de biomarcadores taxonómicos

Para el descubrimiento de biomarcadores taxonómicos, se aplicó el método de Análisis Discriminante Lineal con Tamaño de Efecto (LEfSe), como propuesto por Segata y colaboradores (2011). Este proceso se llevó a cabo en el módulo Huttenhower Lab Galaxy Server 2.0, accesible en <http://galaxy.biobakery.org/>. El objetivo principal fue establecer asociaciones entre taxones bacterianos y variables específicas, tales como tipo de clima, nivel de urbanización, tipo de sitio y región.

Antes de iniciar el análisis, las abundancias de los taxones fueron normalizadas a un total de 11,000 lecturas. El método LEfSe se dividió en varias etapas clave. En primer lugar, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis factorial entre las clases de las variables mencionadas. Posteriormente, se llevaron a cabo pruebas por pares de Wilcoxon entre las subclases identificadas. Para determinar los biomarcadores significativos, se estableció un valor de corte en una puntuación logarítmica de LDA (Análisis Discriminante Lineal) igual a 2 ($\text{LDA} \log_{10} = 2$).

Es importante destacar que se implementó una estrategia de análisis multiclase "todos contra todos" con un enfoque estricto, lo que permitió una evaluación exhaustiva entre los taxones bacterianos y las variables consideradas. Los resultados obtenidos a partir de este análisis, que reflejan las relaciones más significativas entre los taxones y las variables, se visualizaron mediante la herramienta de generación de gráficos incorporada en el módulo LEfSe.

7.13. Predicción de perfiles funcionales

Para la predicción de perfiles funcionales, se utilizó el módulo Comparative MTP Analyzer disponible en EzBioCloud. En este análisis, se compararon dos conjuntos de perfiles metabólicos funcionales: Proteobacteria Dominantes y Firmicutes Dominantes. Antes de llevar a cabo el análisis, ambos conjuntos se normalizaron a un total de 11,000 lecturas.

En este proceso, se emplearon los programas por defecto del módulo PICRUSt (*Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States*) y MinPath (*Minimal set of Pathways*). Estas herramientas son ampliamente reconocidas en el campo (Langille et al., 2013; Ye y Doak, 2009).

Para asignar posibles funciones metabólicas a los perfiles, se recurrió a la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), una fuente de referencia esencial en biología de sistemas (Kanehisa y Goto, 2000; Kanehisa et al., 2023). Tanto las ortologías KEGG (KO) como módulos y vías KEGG se utilizaron en función de la predicción de genomas basada en las secuencias de fragmentos V3 del gen ARNr 16S.

En este contexto, se empleó LEfSe para evaluar las diferencias entre las abundancias funcionales relativas de los dos conjuntos de perfiles. Específicamente, se estableció un punto de corte para los valores de p y p-FDR (Tasas de Falsos Descubrimientos) a >0.05 para determinar la validez de las diferencias observadas entre las abundancias relativas diferenciales de los módulos y vías.

7.14. Análisis estadístico

Para examinar la similitud en la composición de las comunidades bacterianas presentes en las muestras, se emplearon técnicas de visualización y análisis estadístico. Se crearon gráficos de barras apiladas con frecuencias relativas y se llevaron a cabo Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) utilizando las paqueterías ggplot2 y vegan en el entorno R (Wickham, 2016; Oksanen et al., 2022).

Los perfiles de composición microbiana se generaron a través de agrupamientos jerárquicos que se visualizaron mediante mapas de calor de dos vías. Para esta tarea, se utilizaron paquetes de Python, incluyendo pandas, seaborn, scipy, matplotlib y sklearn (McKinney, 2011; Waskom, 2021; Virtanen et al., 2020; Barrett et al., 2005; Garreta y Moncecchi, 2013).

La generación de la matriz de distancia se basó en cálculos de distancias euclidianas, mientras que los agrupamientos se obtuvieron mediante el Método de Pares no Ponderados con Media Aritmética (UPGMA en inglés). La calidad de los agrupamientos se evaluó a través del cálculo de índices de correlación cofenética para estimar su fidelidad (Carvalho et al., 2019).

7.15. Lugar de realización

Todo el trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología y Biología Aplicada de la Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

7.16. Financiamiento

El proyecto fue financiado por los directores de esta tesis (Dra. Luz Isela Peinado Guevara y Dr. Samuel Campista León) pertenecientes al Cuerpo Académico Ecología Molecular y Biotecnología (UAS-CA-298). El alumno recibió una beca CONAHCYT con el número de identificación 1148193.

VIII. RESULTADOS

8.1. Descripción de las muestras colectadas y sitios de muestreo

En el proceso de recolección, se obtuvieron un total de 30 quesos frescos, distribuidos entre los 10 sitios seleccionados para este estudio. La masa promedio de los quesos fue de 1.423 ± 0.427 kg (IC95%= 1.2606, 1.6852; $t= 0.49634$; $p= 0.62601$). En cuanto a los lugares de muestreo, se realizó un monitoreo exhaustivo en un conjunto de 7 áreas urbanas, que abarcaron Culiacán Rosales, Mazatlán, Los Mochis, Ejido Mochis, Concordia, Villa Unión y La Reforma. Además, se incluyeron 3 áreas rurales significativas: Camotete, El Quelite y Carboneras.

En lo que respecta a la clasificación de tipos de clima, se identificaron 2 sitios caracterizados por tener clima árido cálido, mientras que otros 4 presentaron un clima de estepa semiárida cálida. Asimismo, se registraron 4 ubicaciones bajo la categoría de sabana tropical. Para contextualizar las altitudes de los lugares de muestreo, estas oscilaron desde los 8 metros sobre el nivel del mar en La Reforma, hasta una altitud de 295 msnm en Camotete. De manera general, la mediana de las altitudes fue de 24 msnm, con un primer cuartil en 8 msnm y un tercer cuartil en 121.25 msnm.

Una descripción detallada de los datos obtenidos de los sitios de muestreo puede encontrarse en el Cuadro 1. La Figura 1 muestra la localización geográfica de los mismos. Esta información abarca aspectos como las ubicaciones específicas, las características climáticas, las altitudes correspondientes y otros detalles relevantes que contextualizan la procedencia de las muestras.

Cuadro 1. Sitios de muestreo explorados en este estudio.

Sitio de Muestreo	Tipo de Sitio	Categoría de Urbanización^a	Región	Elevación (msnm)^b	Tipo de Clima^c
Concordia, Concordia	Mixto	Urbano	Sur	122	Aw
Villa Unión, Mazatlán	Mixto	Urbano	Sur	12	BSh
Mazatlán, Mazatlán	Venta	Urbana	Sur	10	BSh
El Quelite, Mazatlán	Producción	Rural	Sur	36	Aw
Carboneras, Culiacán	Producción	Rural	Centro	121	BSh
Culiacán Rosales, Culiacán	Venta	Urbana	Centro	57	BSh
Camotete, Badiraguato	Producción	Rural	Centro-Norte	295	Aw
La Reforma, Angostura	Mixto	Urbano	Centro-Norte	6	BSh
Los Mochis, Ahome	Venta	Urbana	Norte	8	BWh
Ejido Mochis, Ahome	Mixto	Urbano	Norte	8	BWh

^{a,b}Datos tomados del Catálogo Único de Claves de Áreas Geoestadísticas Estatales, Municipales y Localidades del INEGI. ^cClasificación Köppen-Geiger; Aw= Sabana Tropical, BSh= Estepa semiárida cálida. BWh= Árido cálido.

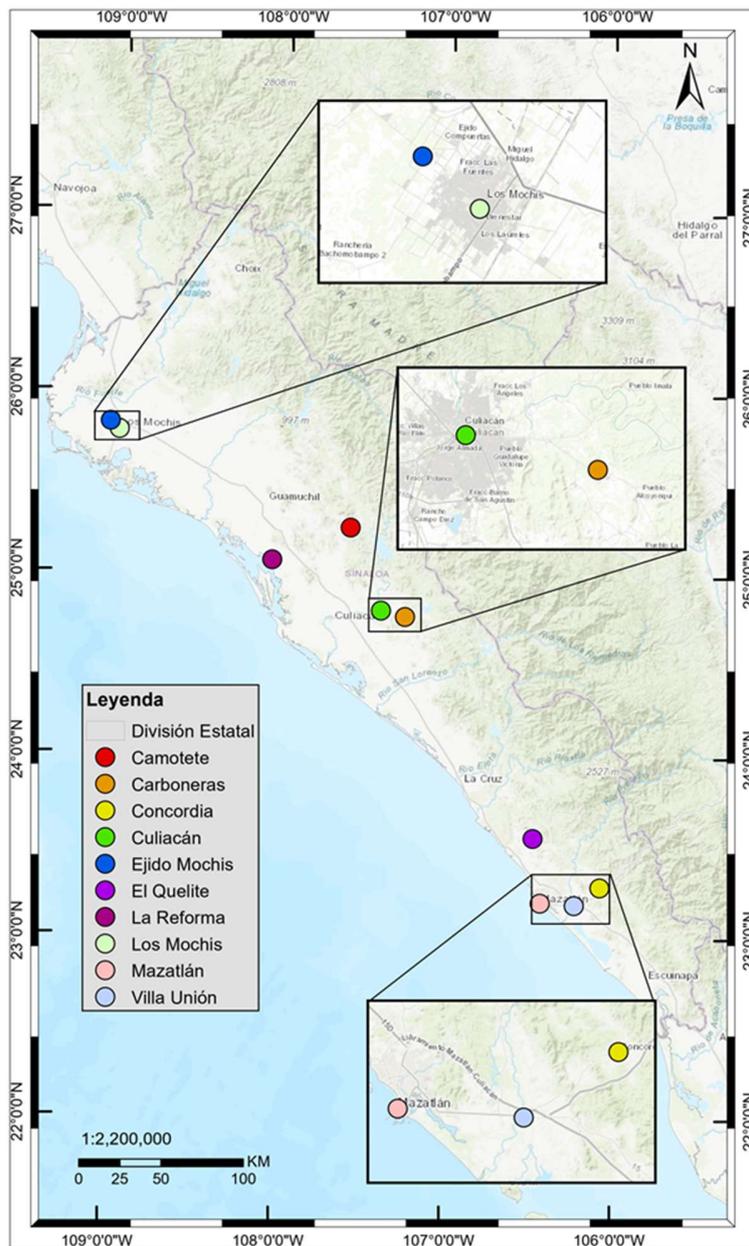


Figura 1. Mapa de ubicación de los sitios de muestreo monitoreados en este estudio. Los círculos de colores indicados en la leyenda indican la posición de los sitios. Se indica una escala de 1:2,200,000 km.

8.2. Secuenciación masiva

La etapa de secuenciación masiva de las 30 muestras de quesos frescos arrojó información significativa y detallada sobre la diversidad microbiana presente en este entorno. En total, se lograron capturar 3,378,356 lecturas pareadas originales, lo que se traduce en un promedio de 112,611.9 lecturas por muestra. Esta abundancia de datos subraya la amplitud de esta exploración y proporciona una base sólida para el análisis.

Con un enfoque en la calidad y la precisión, se filtraron y seleccionaron cuidadosamente 1,122,323 lecturas pareadas, las cuales cumplían con criterios de limpieza y alta calidad, al superar el umbral establecido de $>Q_{25}$. En promedio, esto equivale a 37,420.7 lecturas por muestra, reforzando la consistencia y confiabilidad de los resultados.

Al profundizar en la taxonomía, se identificaron y clasificaron un total de 968 Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) desde género a especie. La distribución y la cantidad de OTUs se encuentran detalladas en el Cuadro 2, proporcionando una referencia esencial para entender la riqueza taxonómica en cada muestra.

Cuadro 2. OTUs observadas en este estudio a diferentes niveles taxonómicos.

Nivel taxonómico	Nro. de OTUs
Filo	11
Clase	25
Orden	55
Familia	117
Género	258
Especie	502

8.3. Composición taxonómica de la comunidad bacteriana en el queso fresco sinaloense artesanal

La exploración de la composición taxonómica a nivel filo de la comunidad bacteriana en el queso fresco sinaloense artesanal evidenció la presencia de 11 filos distintos. Entre éstos, destaca Proteobacteria, que exhibió un rango de abundancia, desde un mínimo del 1.29% hasta un máximo del 99.98%. En segundo lugar, el filo Firmicutes también tuvo una presencia relevante, con una variabilidad de abundancia del 0.01% hasta 98.45%. El filo Deinococcus-Thermus emergió como el tercer filo más abundante, con niveles que oscilaron entre 0% y 9.38% y su punto máximo de abundancia registrado en la muestra CON-01. Los filos Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Fusobacteria, Peregrinibacteria, Saccharibacteria TM7 y Synergistetes, en contraste, presentaron niveles de abundancia inferiores al 0.3%. Para resaltar los filos con frecuencias superiores al 1%, se presenta la Figura 2, que ilustra visualmente sus porcentajes respectivos.

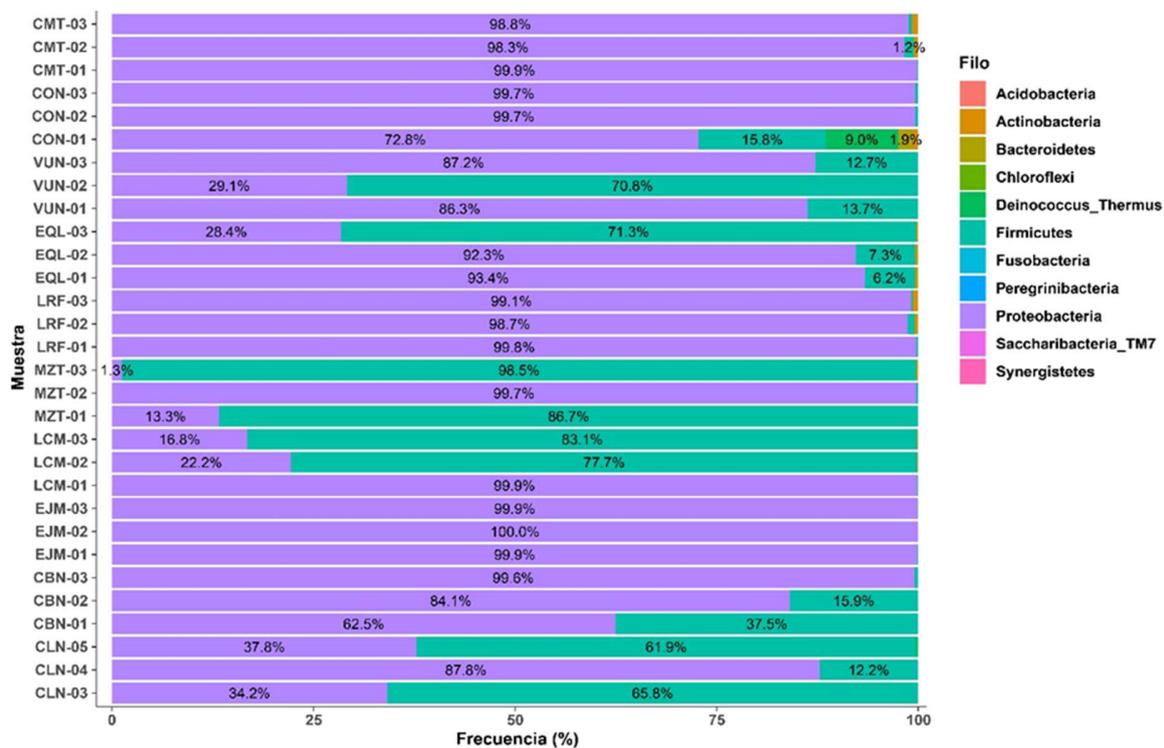


Figura 2. Frecuencias relativas de filios bacterianos observados en queso fresco sinaloense artesanal. La gráfica indica las frecuencias expresadas en porcentajes para aquellos filios >1% en cada muestra. El código de color indica el filo correspondiente.

A nivel de familia, se identificaron en total 117 taxones, de los cuales 18 familias presentaron una abundancia superior al 5%. Entre estas, 8 familias se destacaron por su notable abundancia relativa. Encabezando la lista se encuentra Aeromonadaceae, con una media de abundancia del 21.02% (rango de 0 a 95.26%). La familia Streptococcaceae le siguió de cerca, con una media del 15.29% (rango de 0 a 97.82%), seguida por Vibrionaceae con un promedio de 13.68% (rango de 0 a 85.94%). Otras familias relevantes incluyen Enterobacteriaceae, con un promedio del 9.18% (rango de 0 a 47.05%) y Enterobacterales no clasificados, con una media del 6.52% (rango de 0 a 49.02%). Las familias Moraxellaceae, Erwiniaceae y Staphylococcaceae también presentaron niveles considerables, con promedios de abundancia del 6.10, 6.01 y 5.95%, respectivamente. El porcentaje promedio de lecturas

no clasificadas a nivel de familia fue del 0.8%. Para una visualización más detallada de estos resultados, la Figura 3 ofrece un panorama completo de los porcentajes de abundancia de las familias bacterianas en cada muestra. Adicionalmente, el Cuadro 3 proporciona un desglose de la composición específica de cada familia bacteriana.

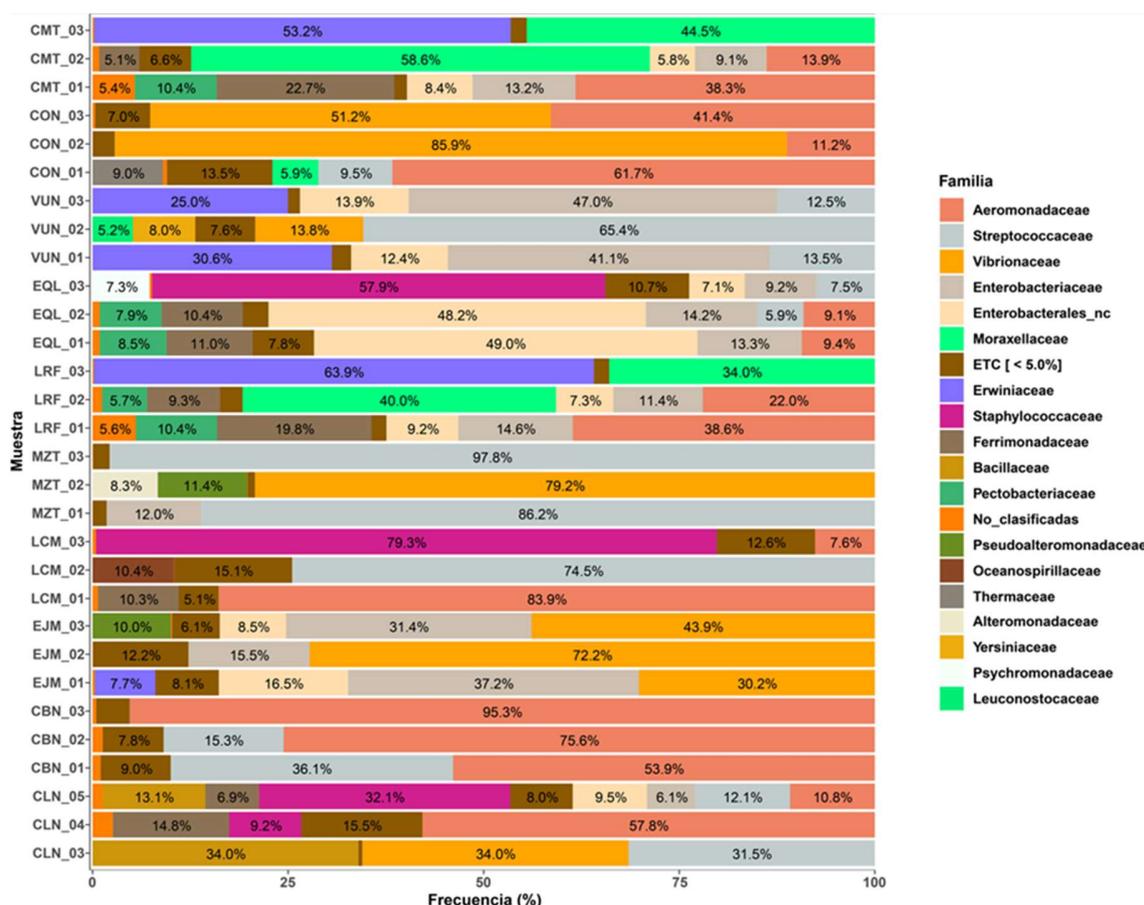


Figura 3. Frecuencias relativas de familias observadas en queso fresco sinaloense artesanal. La gráfica indica las frecuencias expresadas en porcentajes para aquellas familias >5% en cada muestra. El código de color indica la familia correspondiente.

Cuadro 3. Familias representativas observadas en el queso fresco sinaloense artesanal.

Familia	Lecturas*	% de asignación
Aeromonadaceae	193,763	19.51
Streptococcaceae	161,422	16.25
Vibrionaceae	155,390	15.64
Enterobacteriaceae	109,200	10.99
Enterobacterales_nc	83,403	8.40
Moraxellaceae	72,832	7.33
Erwiniaceae	72,154	7.26
Staphylococcaceae	56,837	5.72
Ferrimonadaceae	35,839	3.61
Pectobacteriaceae	16,580	1.67
Bacillaceae	13,655	1.37
Pseudoalteromonadaceae	7,862	0.79
Oceanospirillaceae	5,124	0.52
Psychromonadaceae	2,406	0.24
Alteromonadaceae	2,329	0.23
Yersiniaceae	2,107	0.21
Leuconostocaceae	1,367	0.14
Thermaceae	1,042	0.10

*El cálculo excluye las lecturas no clasificadas a nivel familia y aquellas familias con frecuencias <5% en las muestras (ETC). nc= no clasificadas (otras familias dentro de Enterobacterales).

8.4. Diversidad bacteriana y perfiles de composición en el queso fresco sinaloense artesanal

8.4.1. Curvas de rarefacción y estimación de esfuerzo de muestreo

Las curvas de rarefacción proporcionaron información crucial sobre la profundidad de lecturas requerida para aproximar la asíntota en las muestras. En un 90% de las muestras, se logró alcanzar la suficiente profundidad de lecturas para aproximarse a la asíntota. Para las muestras con más de 200 OTUs observadas, se observó que una profundidad de 35,000 a 40,000 lecturas fue necesaria. Por otro lado, las muestras con menos de 200 OTUs observadas

requerían de 15,000 a 30,000 lecturas para alcanzar la asíntota. Es importante mencionar que las muestras CMT-02, CON-01 y LCM-02 no lograron alcanzar la generación de la asíntota. Estos hallazgos se ilustran en la Figura 4.

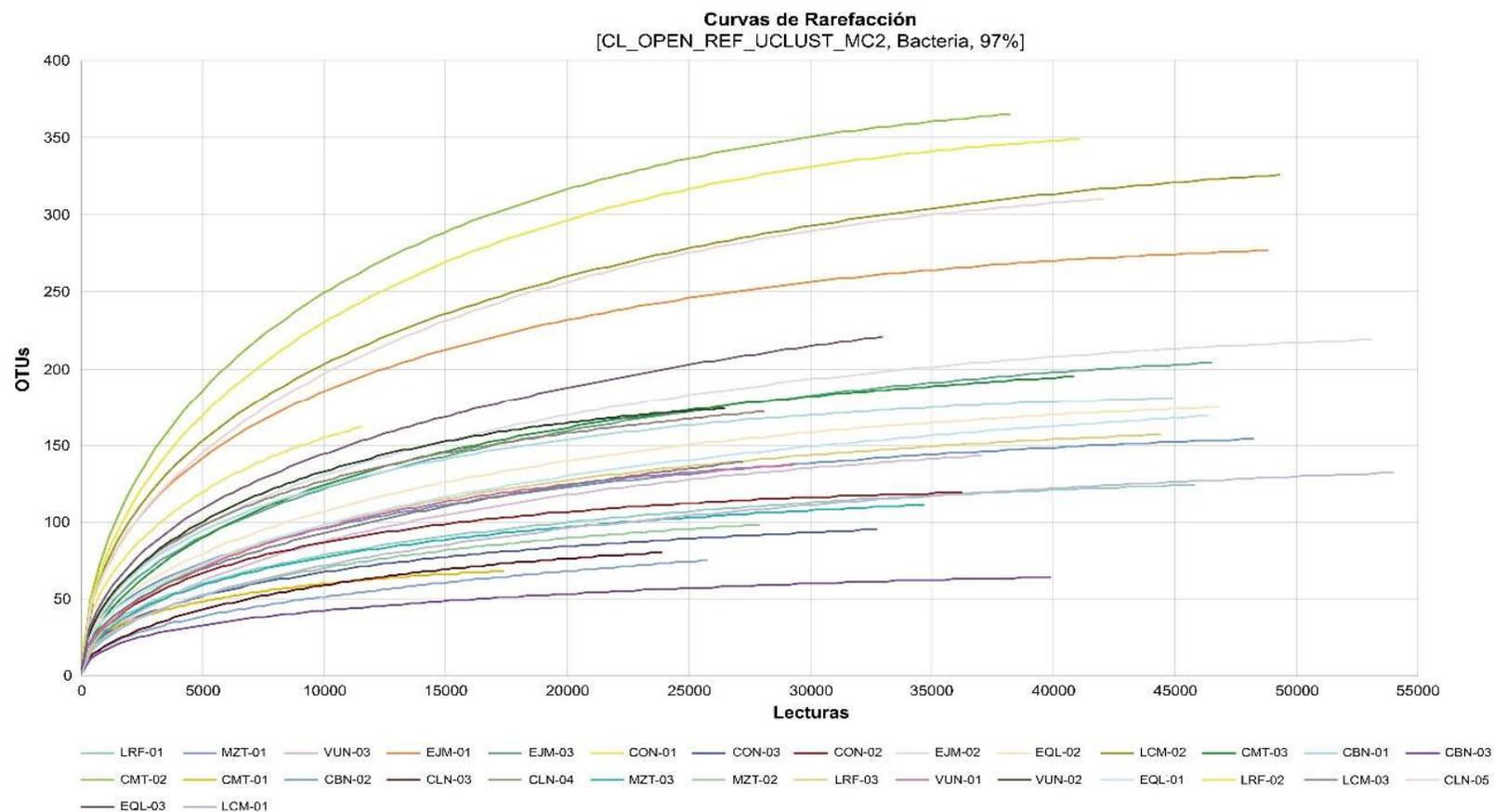


Figura 4. Curvas de rarefacción de muestras de queso fresco sinaloense artesanal. Un código de color identifica la curva correspondiente a cada muestra. CBN= Carboneras, CLN= Culiacán, CMT= Camotete, CON= Concordia, EJM= Ejido Mochis, EQL= El Quelite, LCM= Los Mochis, LRF= La Reforma, MZT= Mazatlán, VUN= Villa Unión.

8.4.2. Estimación de riqueza de especies y biodiversidad

Las estimaciones de riqueza de especies basadas en los índices ACE y CHAO proporcionaron un rango variable de valores, con una mediana de 178.59 para ACE y 171.51 para CHAO. Las muestras CBN-03 y MZT-01 exhibieron la riqueza de especies más baja, mientras que las muestras CMT-02 y LRF-02 presentaron la riqueza más alta. En cuanto a la estimación de biodiversidad, el índice de Shannon osciló entre 0.65 y 3.09, con una mediana de 1.91. Las muestras MZT-01 y CBN-03 mostraron los índices de Shannon más bajos, mientras que las muestras CMT-02 y EJM-02 exhibieron los índices más altos. Por otro lado, el índice de Simpson varió de 0.09 a 0.74, con una mediana de 0.28. Las muestras CMT-02 y MZT-01 tuvieron los valores mínimos, mientras que las muestras LCM-01 y CBN-03 mostraron los valores máximos. Además, la Diversidad Filogenética osciló entre 99 y 321, con una mediana de 182.5. Las muestras CBN-03 y LCM-01 presentaron la diversidad filogenética más baja, mientras que las muestras LRF-02 y CMT-02 mostraron la diversidad filogenética más alta. Es relevante destacar que los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para cada métrica entre los sitios muestreados indicaron la falta de diferencias estadísticas ($p > 0.05$ en cada caso). Las métricas de diversidad alfa, se encuentran detalladas en el Cuadro 4. La representación gráfica de las métricas por sitio muestreado se presenta en la Figura 5.

Cuadro 4. Métricas de diversidad alfa de las muestras de queso fresco sinaloense artesanal.

Muestra	ACE	CHAO	OTUs	Shannon	Simpson	Diversidad Filogenética
CBN-01	179.98	173.28	169	2.09	0.28	148
CBN-02	172.73	163.26	156	1.49	0.45	154
CBN-03	67.08	64.15	62	0.69	0.69	99
CLN-03	109.53	105.53	91	1.51	0.28	110
CLN-04	223.60	212.02	203	1.96	0.30	274
CLN-05	343.68	333.90	318	2.78	0.14	269
CMT-01	81.67	81.80	74	2.07	0.20	117
CMT-02	436.94	425.94	420	3.09	0.10	265
CMT-03	227.78	220.00	208	1.50	0.37	173
CON-01	207.65	197.78	164	2.21	0.28	241
CON-02	80.00	74.07	68	1.07	0.55	122
CON-03	87.92	85.91	75	1.49	0.32	134
EJM-01	328.75	319.40	314	2.69	0.15	249
EJM-02	253.02	244.06	240	1.46	0.51	207
EJM-03	241.91	233.69	224	2.11	0.22	226
EQL-01	202.19	194.58	178	2.02	0.27	252
EQL-02	204.81	195.54	182	2.07	0.27	261
EQL-03	277.01	271.50	233	1.92	0.36	318
LCM-01	157.65	148.30	136	0.82	0.69	210
LCM-02	312.13	293.90	278	1.67	0.50	321
LCM-03	198.56	173.00	143	1.07	0.64	243

ACE= Abundance-based Coverage Estimators (Estimadores de Cobertura basados en Abundancia).

Cuadro 4. Métricas de diversidad alfa de las muestras de queso fresco sinaloense artesanal (continuación).

Muestra	ACE	CHAO	OTUs	Shannon	Simpson	Diversidad Filogenética
LRF-01	147.10	139.68	136	2.14	0.19	152
LRF-02	392.83	382.24	375	3.06	0.09	275
LRF-03	186.21	180.29	171	1.28	0.44	181
MZT-01	100.81	91.83	79	0.65	0.74	123
MZT-02	121.07	115.79	100	1.49	0.37	153
MZT-03	138.73	132.71	116	0.88	0.68	157
VUN-01	168.05	162.79	156	1.98	0.21	182
VUN-02	185.92	178.73	175	1.90	0.33	184
VUN-03	178.18	166.63	155	1.81	0.25	200

ACE= Abundance-based Coverage Estimators (Estimadores de Cobertura basados en Abundancia).

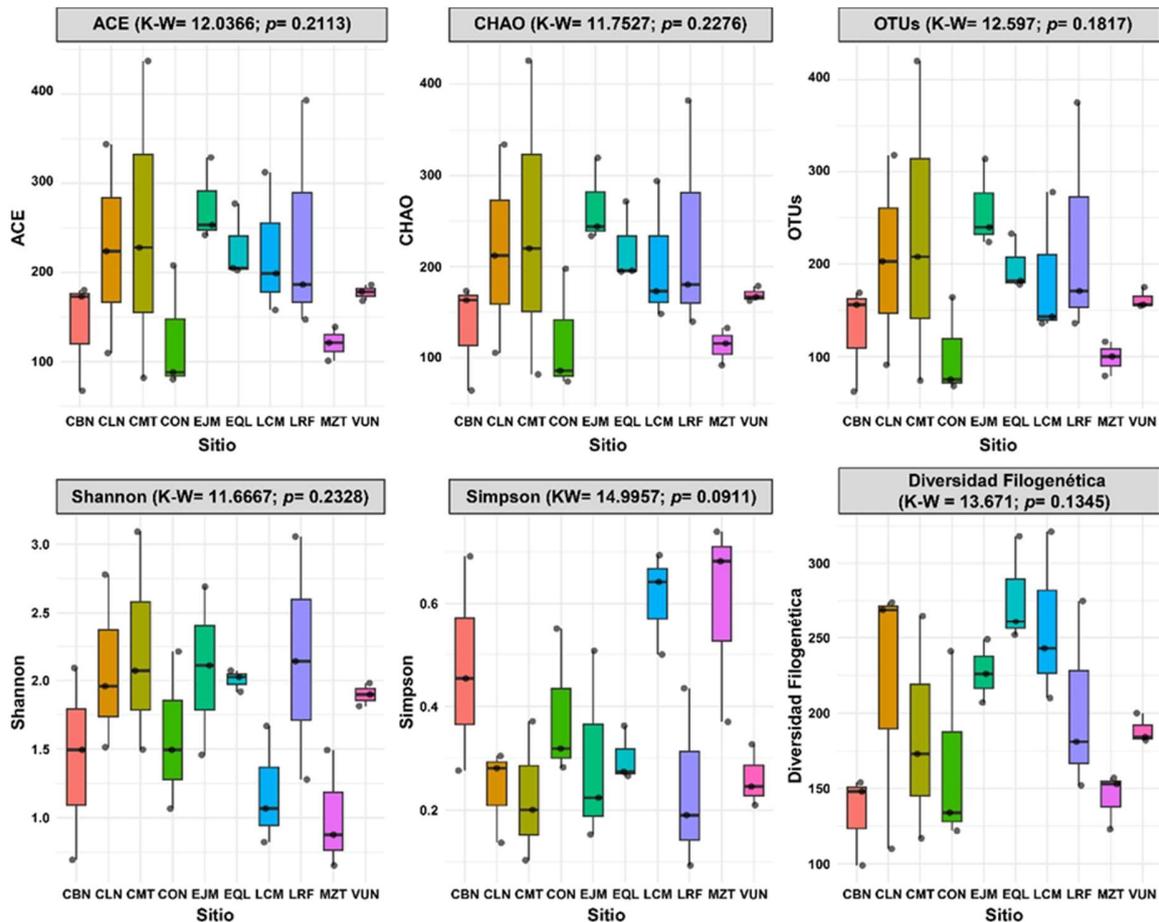


Figura 5. Métricas de diversidad alfa por sitio muestreado. Se muestran los gráficos de cajas de cada una de las métricas con los 10 sitios de muestreo analizados. En la parte superior de cada gráfico se indican los resultados de las pruebas Kruskal-Wallis (K-W) y su valor p .

8.4.3. Análisis de agrupamiento jerárquico y perfiles de composición

El análisis de agrupamiento jerárquico se plasmó en dos dendrogramas (Figura 6), uno basado en las vías de familias bacterianas y otro en muestras de queso. El dendrograma de familias bacterianas presentó un coeficiente de correlación cofenética del 0.9815 y exhibió 8 ramas principales: Aeromonadaceae, Vibrionaceae, Streptococcaceae, Staphylococcaceae, Enterobacteriales no clasificados, Enterobacteriaceae, Moraxellaceae y Erwiniaceae. Las muestras se agruparon en seis clados (I-VI) mediante el dendrograma de muestras (correlación cofenética= 0.7780). Cada clado se definió por patrones de composición

relacionados con familias con mayores abundancias relativas. Los perfiles de composición se distribuyeron de la siguiente manera:

- Perfil Staphylococcaceae: Integrado por las muestras CLN-05, LCM-03 y EQL-03.
- Perfil Aeromonadaceae: Compuesto por los quesos LRF-01, CMT-01, CLN-04, CBN-01/03, LCM-01 y CON-01.
- Perfil Moraxellaceae: Estructurado por LRF-02/03 y CMT-02/03.
- Perfil Streptococcaceae: Definido por CLN-03, VUN-02, LCM-02, MZT-01 y MZT-03.
- Perfil Vibrionaceae: Conformado por EJM-01/03, MZT-02 y CON-02/03.
- Perfil Enterobacterales/Enterobacteriaceae: Generado por las muestras EQL-01/02, VUN-01 y VUN-03.

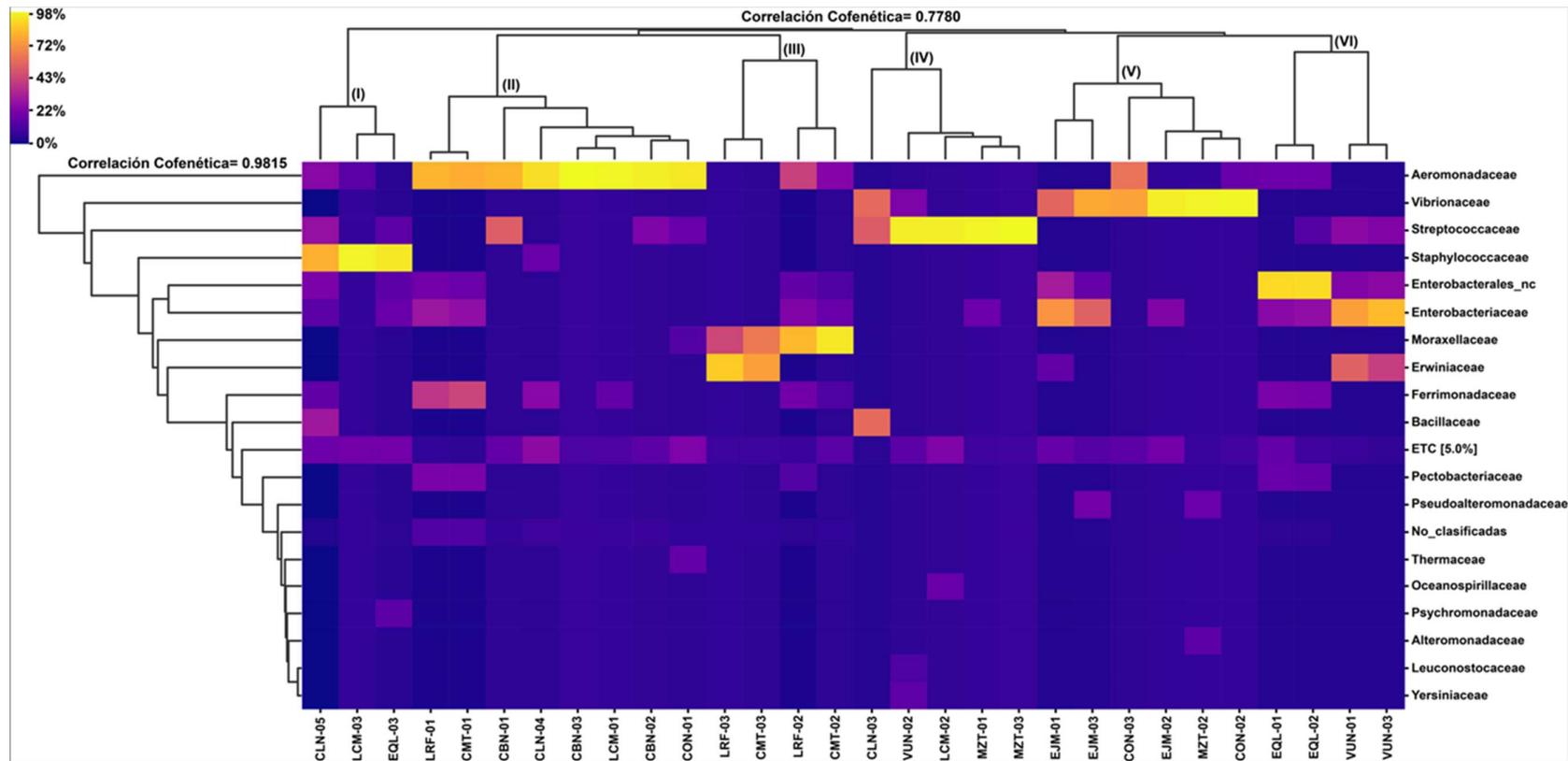


Figura 6. Agrupamiento jerárquico UPGMA a dos vías con mapa de calor de las abundancias relativas a nivel familia. El dendrograma lateral izquierdo agrupa a las familias en función de su abundancia. El dendrograma superior agrupa a las muestras de queso fresco sinaloense artesanal de acuerdo con su composición bacteriana. La escala de color superior izquierda indica la abundancia relativa en porcentaje. Los índices de correlación cofenética se muestran en cada dendrograma. En el dendrograma superior se destacan los seis agrupamientos (I-VI) generadores de perfiles de composición bacteriana. I= Perfil Staphylococcaceae, II= Perfil de Aeromonadaceae, III= Perfil Moraxellaceae, IV= Perfil Streptococcaceae, V= Perfil Vibrionaceae, VI= Perfil Enterobacteriales/Enterobacteriaceae. CBN= Carboneras, CLN= Culiacán, CMT= Camotete, CON= Concordia, EJM= Ejido Mochis, EQL= El Quelite, LCM= Los Mochis, LRF= La Reforma, MZT= Mazatlán, VUN= Villa Unión

8.4.4. Exploración de similitudes en perfiles de composición

El Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) visualizó las similitudes entre los perfiles de composición de la comunidad bacteriana. La Figura 7 representa gráficamente los resultados del PCoA. El componente principal (PC1) explicó el 28.71% de la variación, mientras que el PC2 explicó el 16.57%, acumulando el 45.28% de la variación total. A nivel general, las comunidades bacterianas del queso fresco sinaloense artesanal, con la excepción del sitio de producción Ejido Mochis (EJM), no mostraron una relación definida con el origen geográfico. Esto se evidenció por la variación mayor en la composición bacteriana entre las muestras, con la excepción de las muestras de EJM, que presentaron una menor variación. En conjunto, la variabilidad en la comunidad bacteriana dificulta el agrupamiento basado en el sitio de muestreo.

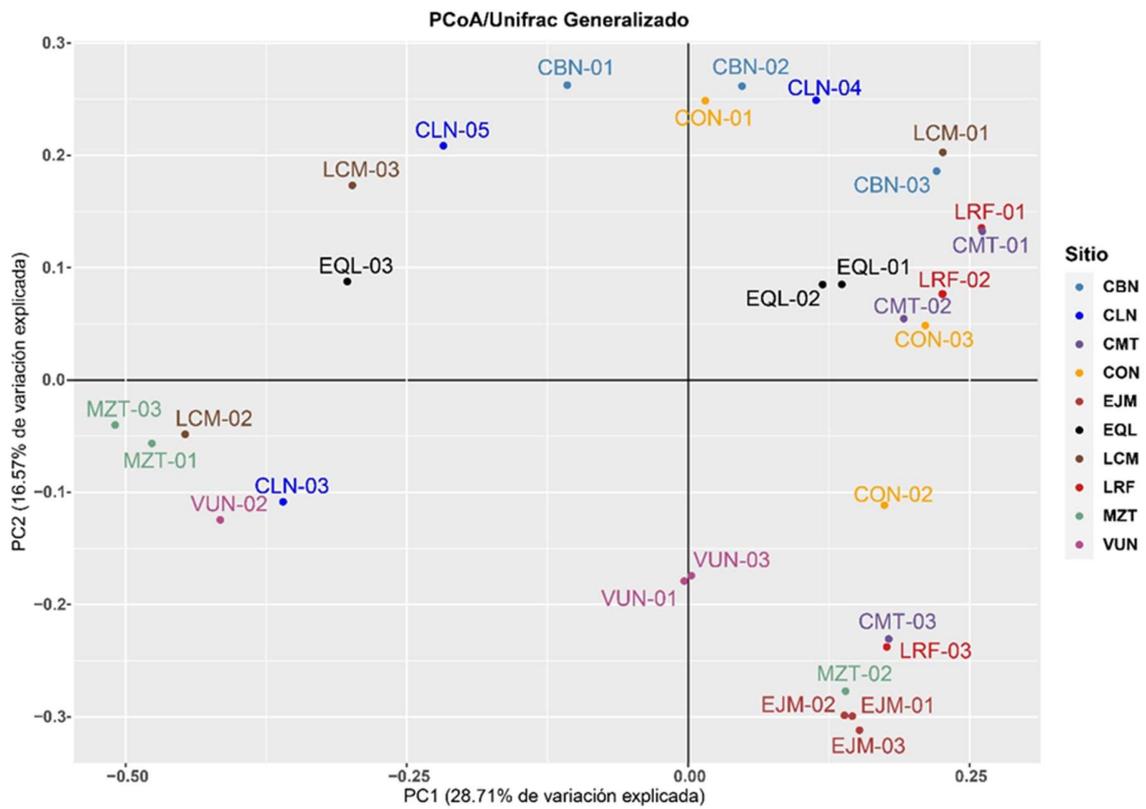


Figura 7. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) por Unifrac Generalizado de los perfiles de composición bacteriana. El gráfico muestra la variación de cada componente y un código de colores representa los sitios de muestreo analizados en este estudio. CBN= Carboneras, CLN= Culiacán, CMT= Camotete, CON= Concordia, EJM= Ejido Mochis, EQL= El Quelite, LCM= Los Mochis, LRF= La Reforma, MZT= Mazatlán, VUN= Villa Unión.

8.5. Dominancia de familias y composición de la microbiota bacteriana

Se destacaron ocho familias como elementos dominantes dentro de las 30 muestras de queso fresco sinaloense artesanal. Entre estas, la familia Aeromonadaceae (CMT-01, LRF-01, CBN-01-03, LCM-01, CLN-04 y CON-01) presentó un rango de dominancia que varió de 0.41 a 0.96. Otras familias como Bacillaceae (CLN-03) exhibieron una dominancia puntual de 0.35. Las Enterobacterales no clasificadas (EQL-01/02) y Enterobacteriaceae (VUN-01/03) demostraron índices de dominancia que fluctuó entre 0.41 a 0.5. En cuanto a Moraxellaceae (LRF-02 y CMT-02), la dominancia osciló entre 0.43 y 0.61. Por su parte, Staphylococcaceae (CLN-05, EQL-03 y LCM-03) mostraron un rango de dominancia de 0.34 a 0.8. Las familias Streptococcaceae (MZT-01, MZT-03, LCM-02 y VUN-02) y Vibrionaceae (CON-03, EJM-03, EJM-02, CON-02 y MZT-02) presentaron índices de dominancia que variaron de 0.66 a 0.98, y de 0.43 a 0.87 respectivamente.

De igual forma, se identificaron 24 familias que constituyeron la microbiota central de las 117 presentes en la tabla de taxonomía. Estas 24 familias representaron un 97.9% de la abundancia total entre las 30 muestras analizadas. Por otro lado, las 93 familias restantes comprendieron un modesto 1.42% de la abundancia total. Un residual 0.68% correspondió a organismos no clasificados a nivel de familia.

Entre las familias con notables abundancias dentro de la microbiota central, con porcentajes superiores al 1%, se encontraron las siguientes: Aeromonadaceae (21.44%), Streptococcaceae (15.6%), Vibrionaceae (13.9%), Enterobacteriaceae y Enterobacterales no clasificadas (10.06% y 6.83% respectivamente), Erwiniaceae (6.49%), Moraxellaceae (6.38%), Staphylococcaceae (6.23%), Ferrimonadaceae (4.4%), Pectobacteriaceae (1.96%) y Bacillaceae (1.83%). Las familias Pseudoalteromonadaceae, Enterococcaceae, Alteromonadaceae, Oceanospirillaceae, Yersiniaceae, Micrococcaceae, Alteromonadales no

clasificadas, Pseudomonadaceae, Shewanellaceae, Oxalobacteraceae, Hafniaceae, Streptomycetaceae y Corynebacteriaceae se encontraron en proporciones menores al 1%.

Para una visualización más clara de los taxones encontrados en la microbiota central, se proporciona una representación jerárquica en la Figura 8.

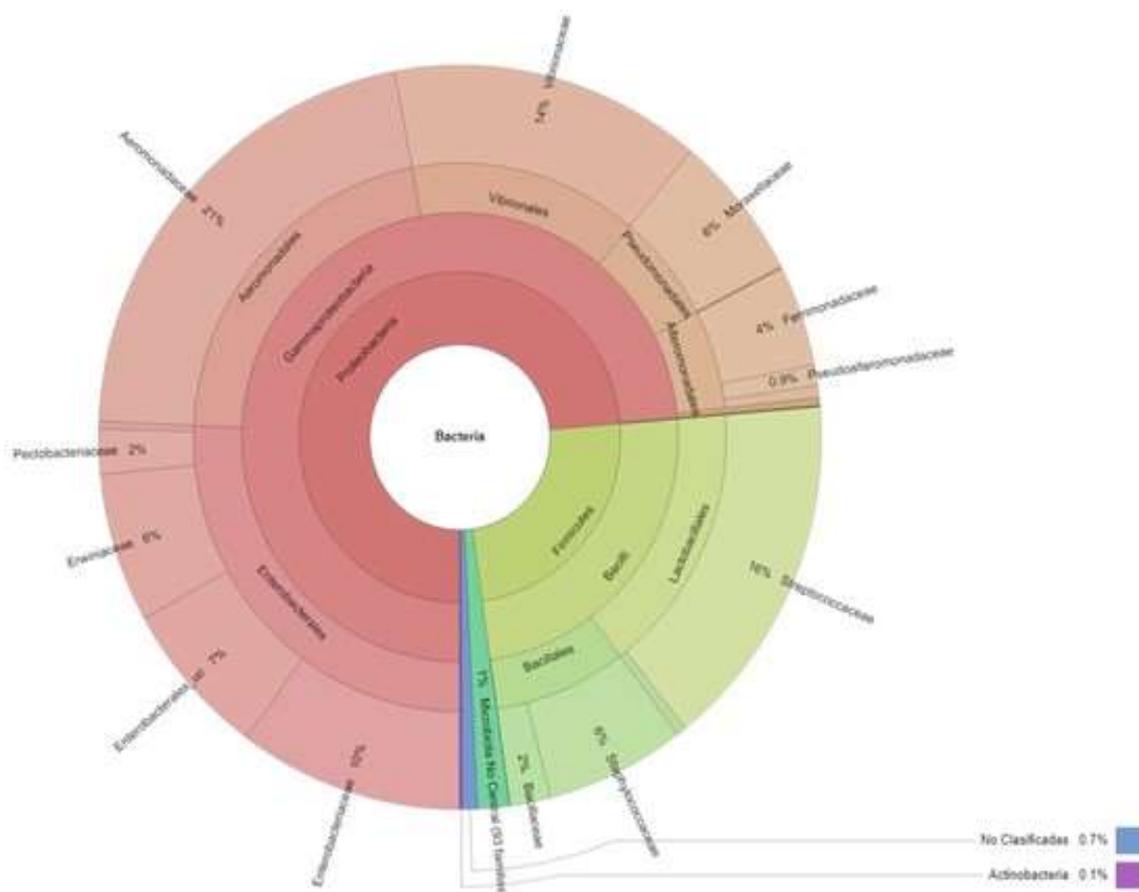


Figura 8. Gráfico Krona de las abundancias relativas (%) de las familias constituyentes de la microbiota central del queso fresco sinaloense artesanal. El gráfico muestra una estructura jerárquica en función de los niveles taxonómicos (reino hasta familia) y de la abundancia relativa para cada taxón mostrado. En el último nivel se indican los porcentajes de abundancia relativa para cada familia. Se muestra sin estructura jerárquica a los organismos no clasificados a nivel familia y a las familias de la microbiota no central.

8.6. Caracterización de taxones bacterianos patógenos

Se identificaron un total de 132 taxones bacterianos que calificaron como patógenos. Este proceso se realizó mediante un filtro utilizando el cuadro No. 6 del “*Comprehensive List Of Bacterial Pathogens Infecting Humans*”, abarcando desde el nivel de especie hasta el de familia. La composición de estos taxones patógenos en cada muestra presentó una variabilidad considerable, con valores que oscilaron entre un máximo de 95.83% y un mínimo de 1.14% (con un promedio de 40.59%, percentil 25 de 10.69% y percentil 75 de 67.74%).

Las muestras que exhibieron las mayores abundancias relativas de taxones patógenos fueron LRF-03 (95.83%), CBN-03 (95.37%) y CMT-03 (94.15%). En contraste, MZT-03, EQL-03 (ambas con 4.01%) y MZT-01 (1.14%) presentaron los valores más bajos en cuanto a la presencia de patógenos.

En el estudio de los taxones patógenos que acumularon abundancias superiores al 1% en las 30 muestras analizadas (con un promedio de 0.2%, percentil 25 de 0.04% y percentil 75 de 1.94%), se destacaron grupos y especies específicas. Entre los más notables, resaltaron el grupo de especies *Aeromonas caviae* (19.14%), *Pantoea agglomerans* (5.44%) y la especie *Acinetobacter ursingii* (3.32%) como los más abundantes. En contraste, el grupo de especies *Serratia liquefaciens*, especies de *Psychobacter* y *Enterobacter* no clasificadas (con porcentajes de 0.37, 0.35 y 0.33% respectivamente) se encontraron en niveles de abundancia más bajos.

Para una comprensión más detallada, se identificaron ocho perfiles de composición de patógenos, denominados I a VIII (Figura 9). Cada perfil se estructuró en función de los taxones y sus respectivas abundancias relativas:

I. Perfil del Grupo *Pantoea agglomerans*, *Acinetobacter ursingii*/no clasificadas, y *Pantoea* no clasificadas (en LRF-03 y CMT-03). II. Perfil del Grupo *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio* no clasificadas (en MZT-02). III. Perfil del Grupo *Aeromonas caviae* (>40%) (CON-03, CMT-01, LRF-01, CON-01, CLN-04, LCM-01 y CBN-01-03). IV. Perfil del Grupo *Pantoea agglomerans*/no clasificadas, Grupo *Raoultella planticola* y *Cedecea davise* (en VUN-01 y VUN-03). V. Perfil de *Aeromonas caviae* <40%/no clasificadas y *Acinetobacter ursingii*/no clasificadas (en CMT-02, LRF-02). VI. Perfil de *Streptococcus salivarius*/no clasificadas (en CLN-03). VII. Perfil del Grupo *Raoultella planticola* y *Cedecea davise* (en EJM-03). VIII. Perfil con <10% de abundancia general de patógenos (en LCM-02/03, CON-02, CLN-05, EQL-01-03, EJM-01/02, MZ7-01/03, EQL-03).

Adicionalmente, se observó que los patógenos con abundancias inferiores al 1% incluyeron *Enterococcus faecalis* (0.025%), *Salmonella* (0.023%), el grupo de especies de *Streptococcus parasanguinis* (0.021%), grupo *Staphylococcus aureus* (0.018%), grupo *Streptococcus pneumoniae* (0.015%), Listeraceae (0.007%), *Streptococcus agalactiae* (0.004%), *Aeromonas hydrophila* (0.003%), grupo *Serratia marcescens* (0.002%). Adicionalmente, se identificaron taxones como *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas*, grupo *Streptococcus dysgalactiae*, grupo *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, Brucellaceae, *Vibrio cidicii*, grupo *Yersinia intermedia*, los grupos de *Pseudomonas putida* y *P. oryzihabitans*, grupo *Pasteurella multocida*, *Streptococcus pyogenes*, grupo *Vibrio parahaemolyticus*, *Pleisomonas shigelloides* y Campylobacteraceae, con abundancias $\leq 0.001\%$.

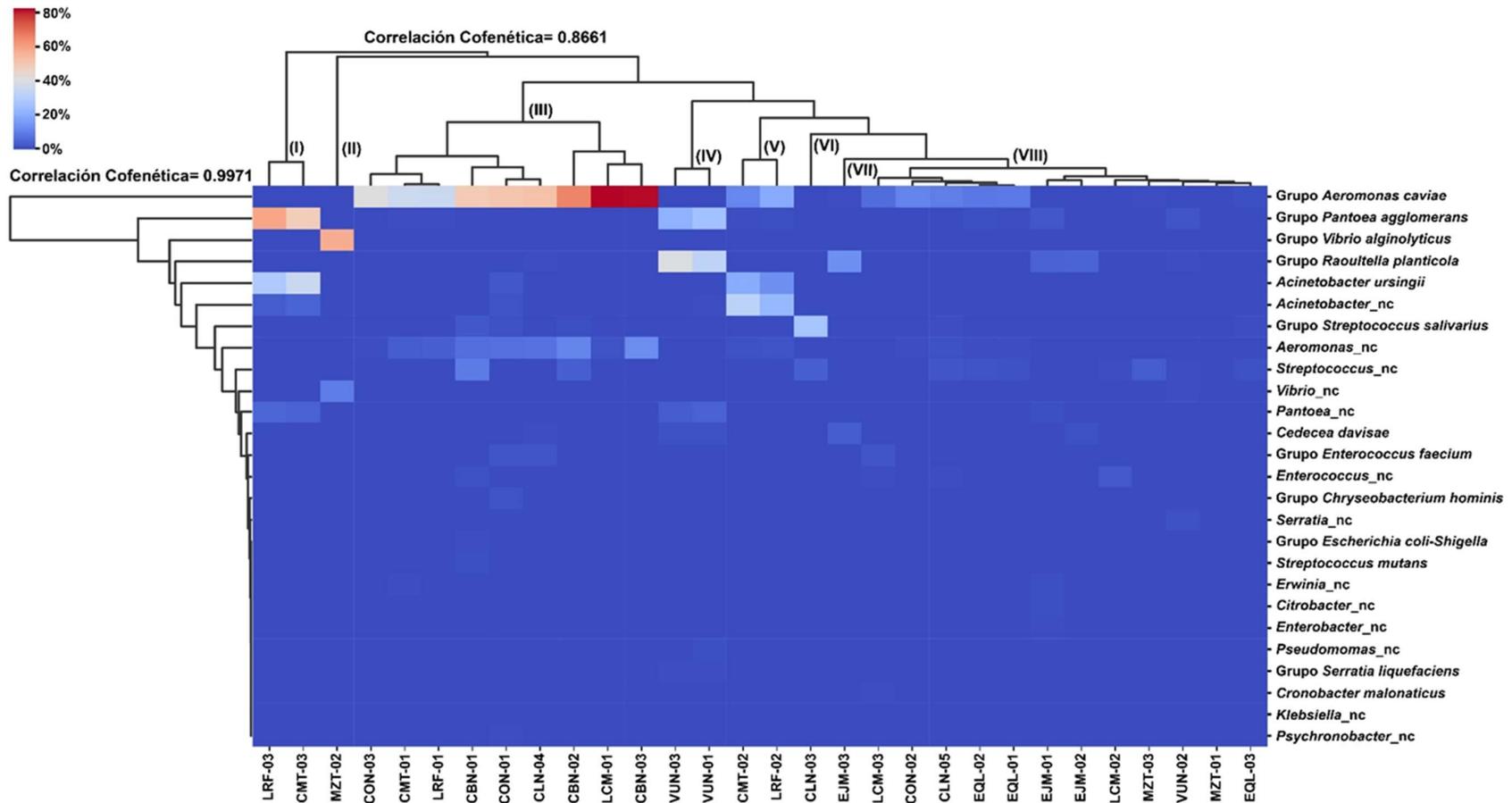


Figura 9. Agrupamiento jerárquico UPGMA a dos vías con mapa de calor de las abundancias relativas de patógenos. I= Perfil Grupo *Pantoea agglomerans*, *Acinetobacter ursingii*/no clasificadas, y *Pantoea no clasificadas*, II= Perfil Grupo *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio no clasificadas*, III= Perfil Grupo *Aeromonas caviae* >40%, IV= Perfil Grupo *Pantoea agglomerans*/no clasificadas, Grupo *Raoultella planticola* y *Cedecea davise*, V= Perfil *Aeromonas caviae* <40%/no clasificadas y *Acinetobacter ursingii*/no clasificadas, VI= Perfil *Streptococcus salivarius*/no clasificadas, VII= Perfil Grupo *Raoultella planticola* y *Cedecea davise* VIII= Perfil <10% de abundancia general de patógenos

8.7. Identificación de Taxones Probióticos

Se lograron identificar un total de 22 taxones pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* que fueron catalogados como probióticos en el análisis de las 30 muestras evaluadas. De este conjunto, únicamente 8 taxones demostraron acumular abundancias relativas superiores al 1% en el conjunto de todas las muestras. Estos taxones probióticos notables incluyen al Grupo *Lactococcus lactis* (11.21%), *Lactococcus piscium* (0.32%), Grupo *Lactococcus raffinolactis* (0.31%), especies de *Lactococcus* no clasificadas (0.24%), Grupo *Lactococcus gravieae* (0.22%), Grupo *Leuconostoc kimchii* (0.12%), *Lactococcus taiwanensis* (0.06%) y el grupo *Lactococcus chungangensis* (0.05%).

Por otro lado, *Leuconostoc mesenteroides*, especies de *Leuconostoc* no clasificadas, grupo *Lactobacillus delbruecki*, *Leuconostoc lactis*, especies de *Lactobacillus* no clasificadas, grupo *Leuconostoc gelidum*, grupo *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus plantarum*, *Leuconostoc carnosum*, *Lactobacillus fermentum*, grupo *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus brevis*, grupo *Lactobacillus gasseri* y grupo *Lactobacillus reuteri* presentaron niveles de abundancia iguales o inferiores a 0.02%.

En un esfuerzo por visualizar y comprender la distribución de estos taxones probióticos en las muestras de queso fresco sinaloense artesanal, se identificaron dos perfiles de composición distintos, los cuales se plasman gráficamente en la Figura 10:

Perfil I: Baja Abundancia de *Lactococcus lactis* (<14%) Este perfil engloba a muestras que presentan una baja prevalencia de *Lactococcus lactis*, totalizando menos del 14% de su composición. Ejemplares representativos que se ajustan a este patrón incluyen CBN-01-03, CLN-03-05, EJM-01-03, CMT-01-03, LRF-01-03, EQL-01-03, CON-01-03, MZT-02, VUN-01/03, así como LCM-01 y LCM-03.

Perfil II: Alta Abundancia de *Lactococcus lactis* ($\geq 54\%$) Este perfil resalta la predominancia de *Lactococcus lactis*, constituyendo más del 54% de la composición bacteriana. Se observa claramente en muestras como VUN-02, LCM-02, MZT-01 y MZT-03.

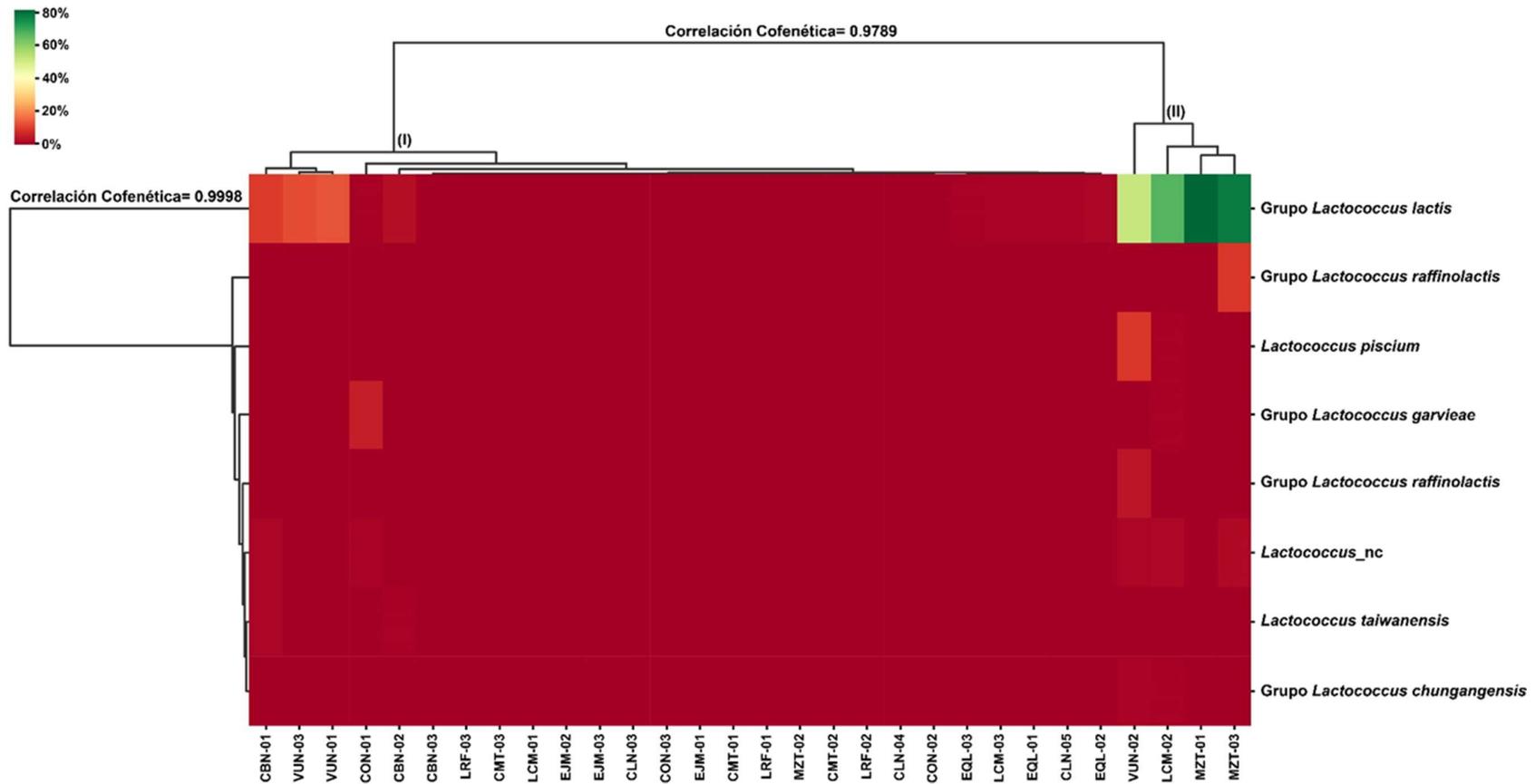


Figura 10. Agrupamiento jerárquico UPGMA a dos vías con mapa de calor de las abundancias relativas de probióticos. El dendrograma lateral izquierdo agrupa a las familias en función de su abundancia. El dendrograma superior agrupa a las muestras de queso fresco sinaloense artesanal de acuerdo con su composición bacteriana. La escala de color superior izquierda indica la abundancia relativa en porcentaje. Los índices de correlación cofenética se muestran en cada dendrograma. En el dendrograma superior se destacan los seis agrupamientos (I-VI) generadores de perfiles de composición bacteriana. I= Perfil de baja abundancia de *Lactococcus lactis* (<14%), II= Perfil de alta abundancia de *Lactococcus lactis* ($\geq 54\%$).

8.8. Descubrimiento de biomarcadores taxonómicos

El análisis exhaustivo llevado a cabo en esta investigación permitió identificar valiosos biomarcadores taxonómicos asociados a distintos factores ambientales y geográficos en las muestras de queso fresco sinaloense artesanal. Estos biomarcadores proporcionan una comprensión más profunda de la influencia de variables como el clima, la urbanización, la región geográfica y el tipo de sitio de muestreo en la composición bacteriana.

8.8.1. Biomarcadores asociados a clima

Dentro del contexto climático, se resaltaron tres biomarcadores significativos (Figura 11) que están específicamente vinculados a los tipos de clima de Sabana Tropical (Aw) y Árido cálido (BWh). Los biomarcadores identificados incluyeron a Micrococcaceae y Micrococcales (con tamaños de efecto LDA menores a -2) para el clima Aw, mientras que para el clima BWh se observó la presencia de Oceanospirillales (con tamaños de efecto LDA superiores a 3).

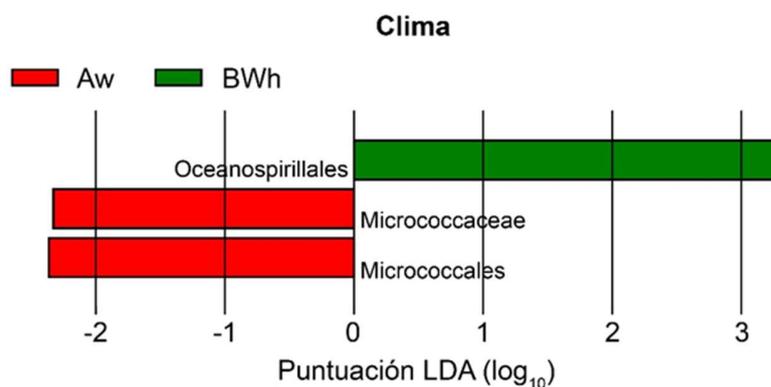


Figura 11. Gráfico LEfSe de los biomarcadores taxonómicos asociados a clima. Aw= Sabana Tropical, BSh= Estepa semiárida cálida. BWh= Árido cálido. LDA= Análisis Discriminante Lineal.

8.8.2. Biomarcadores asociados a urbanización

En relación con los sitios de muestreo urbanos (Figura 12), se encontraron importantes biomarcadores que delimitan las diferencias en la composición bacteriana del queso fresco sinaloense artesanal colectados de ambientes urbanos y rurales. Entre los marcadores detectados se incluyen Vibrionales-Vibrionaceae (con tamaños de efecto LDA superiores a 4), *Vibrio* (LDA > 3), *Pseudoalteromonas*, el grupo *Pseudoalteromonas tetradonis*, *Streptococcus salivarius*, Aeromonadaceae, *Catenovulum*, *C. marinum*, especies de *Vibrio* no clasificadas, Yersiniaceae, Colwelliaceae, *Thalassotalea* y *T. litorea* (LDA > 2). Por otro lado, en los sitios rurales se observaron marcadores como *Streptococcus mutans* (LDA menores a -2), *Streptococcus gallolyticus* y especies no clasificadas de *Aeromonas* (LDA menores a -3).

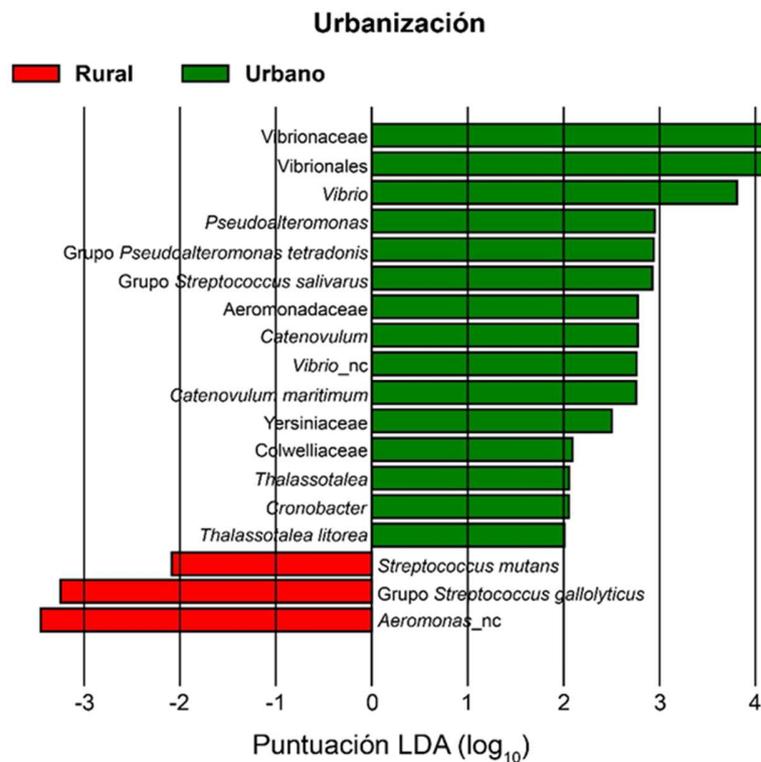


Figura 12. Gráfico LefSe de los biomarcadores taxonómicos asociados a urbanización.

8.8.3. Biomarcadores asociados a región geográfica

La distribución geográfica también influyó en la composición bacteriana, donde se identificaron biomarcadores distintivos para cada región. En la región sur (Figura 13), los marcadores más relevantes abarcaron Lactobacillales, Streptococcaceae, *Lactococcus*, el Grupo *Lactococcus lactis* (LDA > 4), Pseudoalteromonadaceae y Pseudomonadaceae (LDA > 2). Para la región norte, se detectó únicamente la presencia de *Citrobacter portucalensis* (LDA > 2). En la región centro-norte, se destacaron biomarcadores como Moraxellaceae, *Acinetobacter* y especies no clasificadas, *Acinetobacter ursingii* (LDA > 4), especies de *Pantoea* no clasificadas, *Enhydrobacter*, el grupo *Enhydrobacter aerosaccus* (LDA > 3), KB849206, Micrococcales, Micrococcaceae, *Rothia* y especies no clasificadas, *Klebsiella singaporensis*, y géneros no clasificados de Moraxellaceae (LDA > 2). Finalmente, en la región central, se identificaron *Streptococcus* y especies no clasificadas (LDA > 3), así como *Escherichia* y el grupo *Escherichia coli* (LDA > 2) como marcadores distintivos.

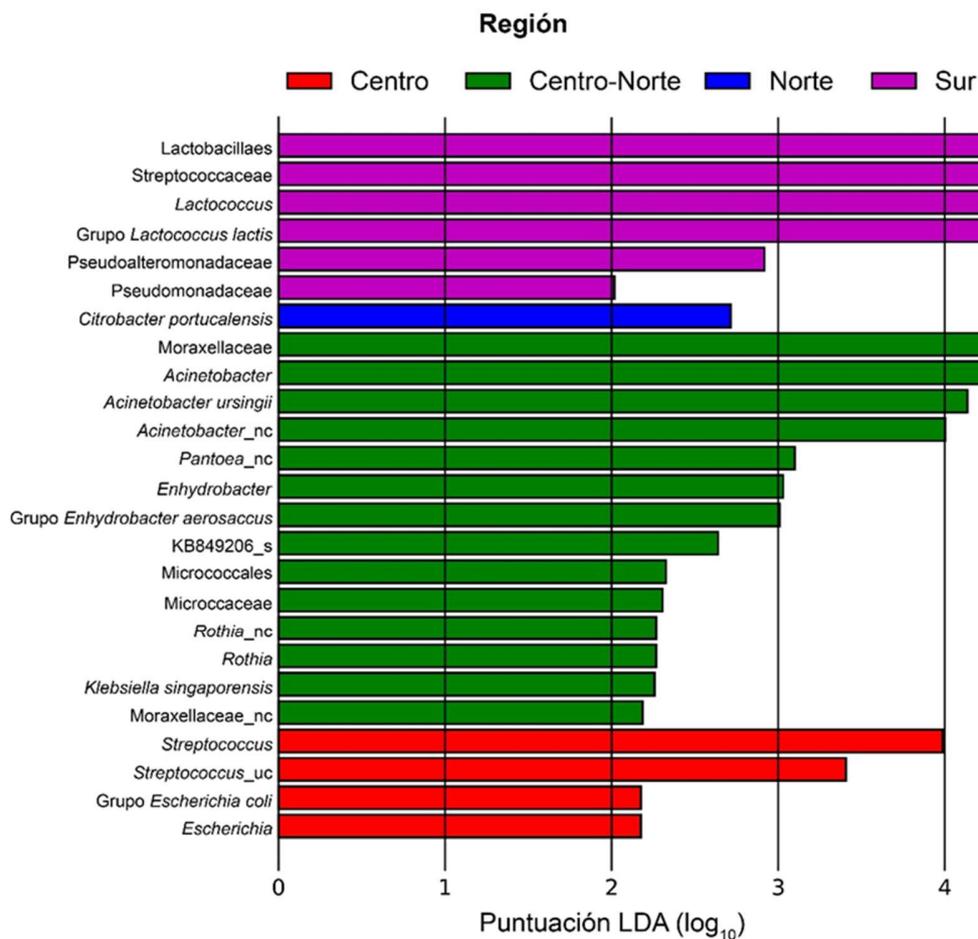


Figura 13. Gráfico LEfSe de los biomarcadores taxonómicos asociados a la región.

8.8.4. Biomarcadores asociados al tipo de sitio

La clasificación según el tipo de sitio también reveló biomarcadores específicos (Figura 14). Para los sitios de venta, se encontraron *Macrocooccus* y el grupo *M. equipercticus* (LDA > 4), *Pseudoalteromonas*, el Grupo *Pseudoalteromonas tetraodonis*, *Vibrio litoralis* y especies de *Vibrio* no clasificadas, *Catenovulum*, *C. maritimum*, Alteromonadaceae y el grupo *Streptococcus raffinolactis* (LDA > 2). Para los sitios de producción, se destacaron el grupo *Streptococcus gallolyticus*, especies de *Streptococcus* no clasificadas (LDA > 3), así como *Streptococcus mutans* (LDA > 2) como taxones distintivos. En los sitios mixtos, donde la

producción y venta coexisten, se observaron Enterobacterales, Vibrionales y Vibrionaceae (LDA > 4), Erwiniaceae, *Pantoea* y especies no clasificadas, el grupo *P. agglomerans* (LDA > 3), *Pantoea*, Pseudomonadaceae y especies de *Nissabacter* no clasificadas (LDA > 3) como grupos bacterianos característicos.

La identificación de estos biomarcadores aporta una comprensión más precisa y contextualizada de cómo los factores ambientales y geográficos se asocian a la composición bacteriana en el queso fresco sinaloense artesanal, ofreciendo perspectivas valiosas para futuras investigaciones y aplicaciones prácticas.

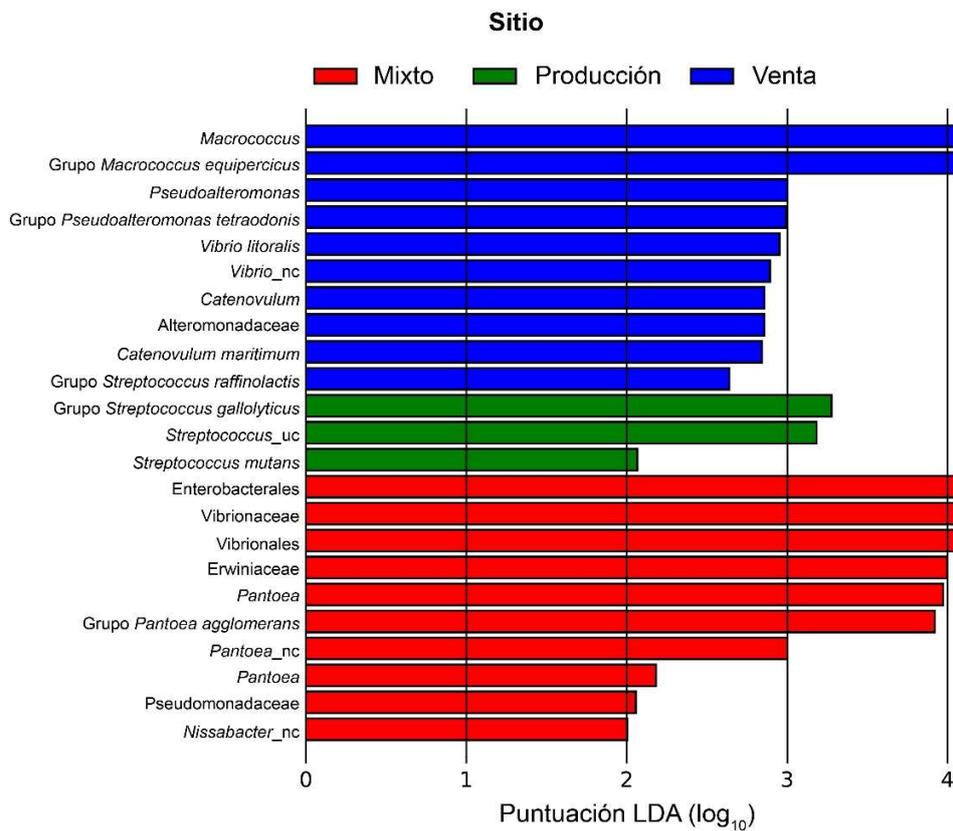


Figura 14. Gráfico LEfSe de los biomarcadores taxonómicos asociados al tipo de sitio.

8.9. Predicciones de perfiles y funciones metabólicas

Un enfoque crucial de este estudio fue la exploración de los perfiles y funciones metabólicas a través de herramientas como PICRUSt y MinPath. Mediante este análisis, se lograron asignar un total de 153 genes con ortologías KEGG, identificados con significancia estadística (valores p y $p\text{-FDR} < 0.05$) y con un tamaño de efecto LDA superior a 3. Estos genes se vinculan a diversas categorías funcionales, ofreciendo una visión profunda de los procesos metabólicos presentes en el queso fresco sinaloense artesanal.

Las funciones metabólicas identificadas abarcan diversas categorías esenciales para la biología bacteriana. Se destaca el metabolismo energético (24.84%) y la síntesis de proteínas (22.88%), fundamentales para el funcionamiento celular. Asimismo, se identificaron genes asociados a exportación y secreción (11.76%), receptores y transportadores (13.73%), reguladores transcripcionales (13.07%), señalización (5.88%) y otras categorías (7.84%).

8.9.1. Comparación de módulos y vías KEGG

Una mirada profunda a la comparación de módulos y vías KEGG entre las Proteobacterias Dominantes y las Firmicutes Dominantes a través del análisis LEfSe reveló diferencias estadísticas significativas (valores p y $p\text{-FDR} < 0.05$) en 26 módulos. Entre estos, destacaron aquellos con mayor abundancia relativa, como Ribosoma (3.54 y 4.46% para Proteobacterias y Firmicutes respectivamente), Biosíntesis de Aminoacil-ARNt (1.6 y 2.06%) y Glicólisis (Embden-Meyerhoff), glucosa => piruvato (1 y 1.41%).

En cuanto a las categorías con mayor número de módulos, se observó una diversidad funcional enriquecedora. Sistema Regulatorio de Dos Componentes (4 módulos), Resistencia a Fármacos (4 módulos) y Sistemas de Secreción (3 módulos) resaltaron como áreas de importancia. Estos hallazgos subrayan la complejidad de las interacciones metabólicas y

adaptativas presentes en las bacterias que conforman el queso fresco sinaloense artesanal (Figura 15).

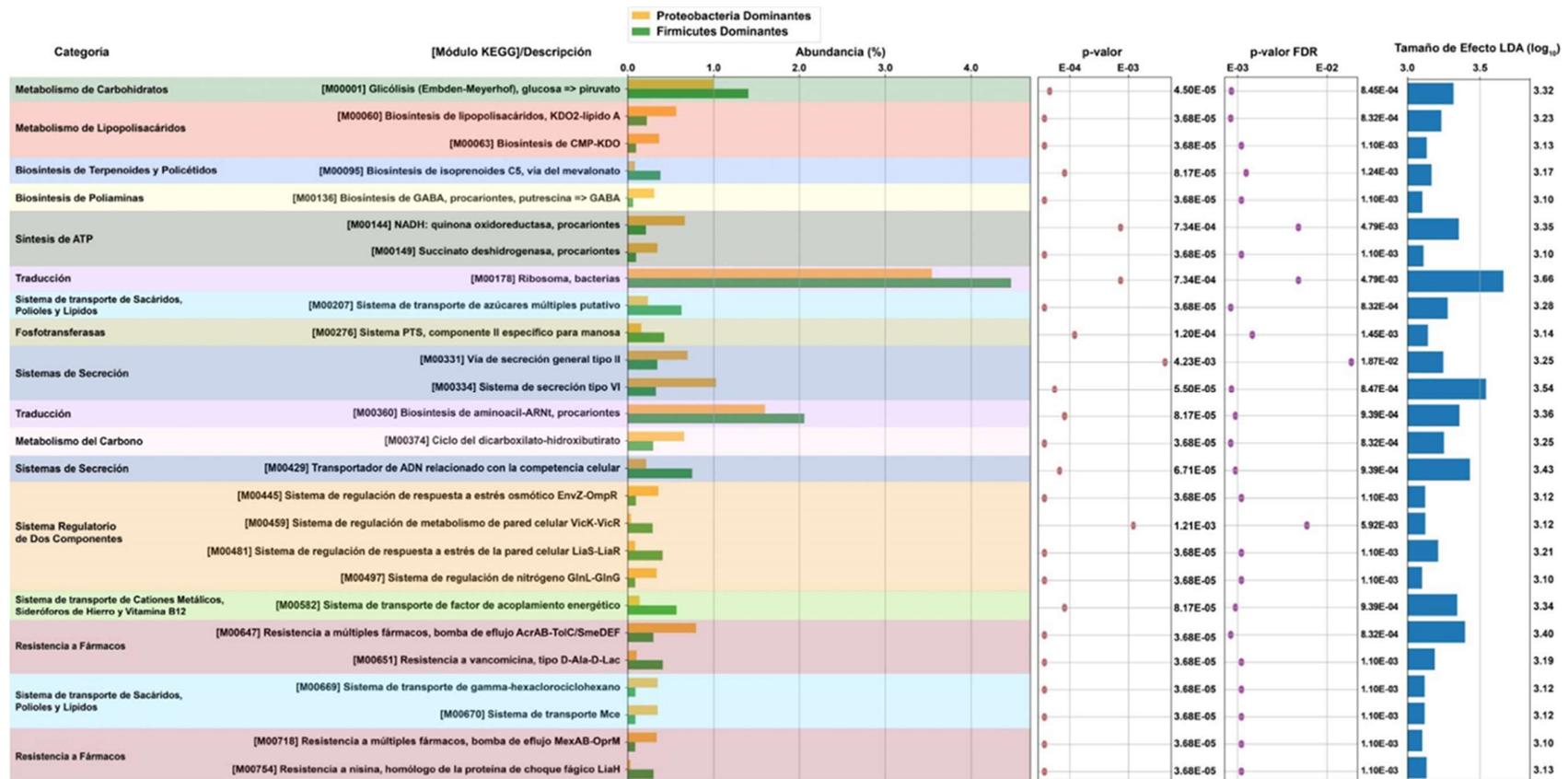


Figura 15. Predicción funcional diferencial (*PICRUSt/MinPath/LEfSe*) de los módulos KEGG obtenidos en *Proteobacteria Dominantes* y *Firmicutes Dominantes*. En la sección izquierda se muestran las categorías de los módulos KEGG, así como la gráfica de barras para los valores de abundancia relativa de módulos (%). Se muestran a la derecha los gráficos de puntos de valor p (estadístico) p-FDR (Tasa de Falsos Descubrimientos). Con propósitos estéticos, estas gráficas presentan transformación logarítmica para mejorar la visualización de los diferentes valores de p (valores no transformados se muestran a la derecha de cada gráfica). Finalmente, una gráfica de barras representa el tamaño de efecto LDA correspondiente a cada módulo.

8.9.2. Diferencias en vías metabólicas

El análisis LEfSe también permitió identificar diferencias significativas en 10 vías metabólicas (valores p y $p\text{-FDR} < 0.05$), entre las Proteobacterias Dominantes y las Firmicutes Dominantes (Figura 16). Estas vías son vitales para diversos procesos biológicos. Entre las vías con mayor relevancia se encontraron Sistema de Dos Componentes (3.21 y 1.93% para Proteobacterias y Firmicutes respectivamente), Ensamblaje Flagelar (0.86 y 0.22%), Quimiotaxis Bacteriana (0.91 y 0.29%) y Metabolismo Microbiano en Ambientes Diversos (4.63 y 4.20%).

Además, se revelaron diferencias en vías específicas relacionadas con la formación de biopelículas y el metabolismo de sustancias clave. Estas vías incluyen la Formación de Biopelícula – *Vibrio cholerae* (0.84 y 0.41%), *Escherichia coli* (0.88 y 0.47%), *Pseudomonas aeruginosa* (0.59 y 0.22%), Metabolismo del Ácido Lipoico (1.02 y 0.25%), Biosíntesis de Ácidos Grasos Insaturados (1 y 0.23%) y Metabolismo del Azufre (0.94 y 0.24%).

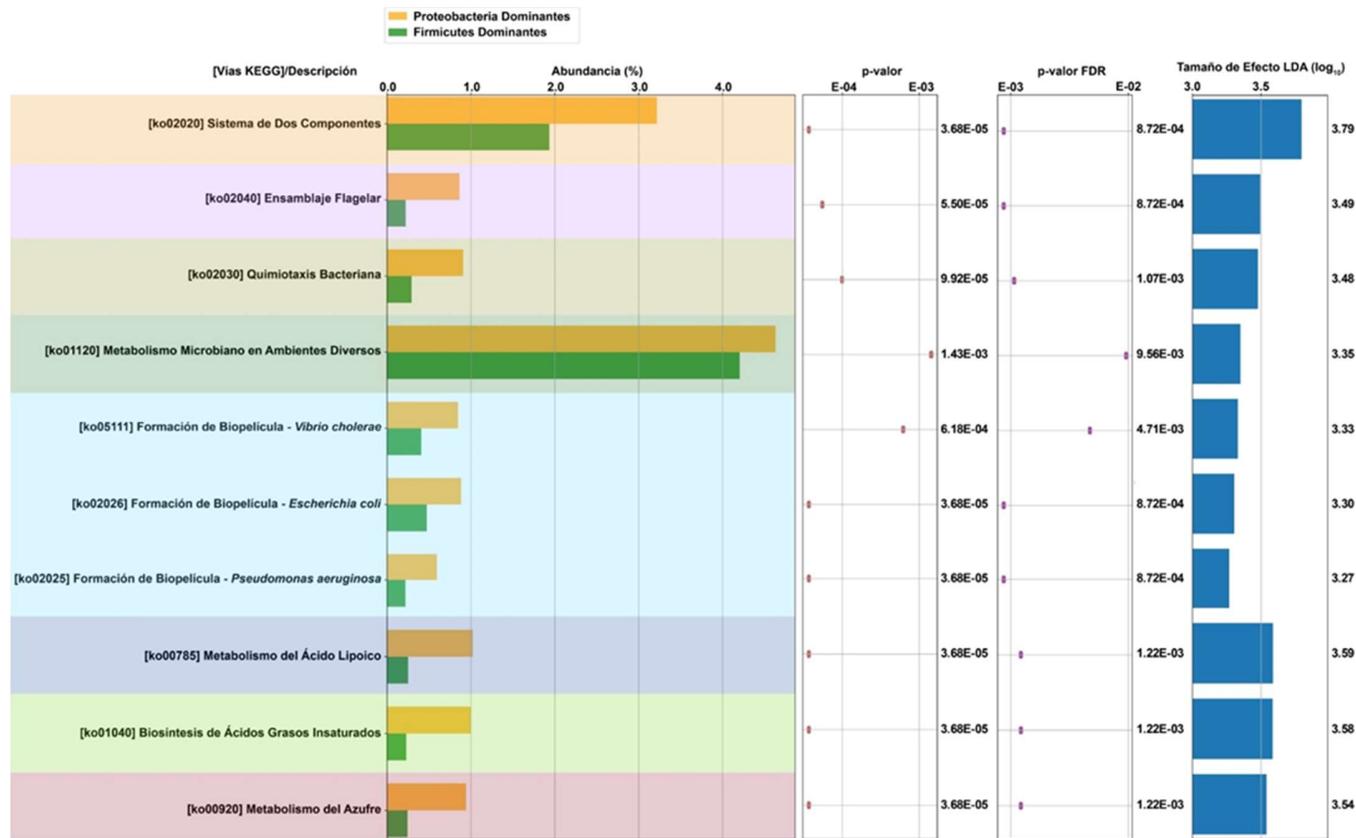


Figura 16. Predicción funcional diferencial (PICRUSt/MinPath/LEfSe) de las vías KEGG obtenidas en Proteobacteria Dominantes y Firmicutes Dominantes. En la sección izquierda se muestran las vías KEGG, así como la gráfica de barras para los valores de abundancia relativa (%). Se muestran a la derecha los gráficos de puntos de valor p (estadístico) p-FDR (Tasa de Falsos Descubrimientos). Con propósitos estéticos, estas graficas presentan transformación logarítmica para mejorar la visualización de los diferentes valores de p (valores no transformados se muestran a la derecha de cada gráfica). Finalmente, una gráfica de barras representa el tamaño de efecto LDA correspondiente a cada vía.

IX. DISCUSIÓN

En esta investigación, se realizó un análisis exhaustivo y detallado de la microbiota basado en el gen ARNr 16S presente en el queso fresco sinaloense artesanal. Enfocándose en diversos aspectos clave, incluyendo la composición de la microbiota central, la presencia de patógenos y probióticos, la identificación de biomarcadores taxonómicos en relación con factores ambientales y geográficos, y la predicción diferencial de perfiles funcionales. Cabe destacar que este estudio representa el primero en abordar la caracterización de los consorcios bacterianos de este producto lácteo tradicional a través de secuenciación masiva de ADN dirigida. A la luz de la revisión bibliográfica, previamente no se habían realizado investigaciones con un enfoque tan integral y detallado.

La observación de la abundancia general y la dominancia del filo Proteobacteria (1.29-99.98%) en las muestras analizadas, se encuentra en concordancia con la composición bacteriana de otros quesos mexicanos, como el Ranchero de Veracruz (95%), la Adobera de mesa de Jalisco (86.7%) y la Canasta de Durango (84.4%) (Murugesan et al., 2018). Estos quesos, al igual que el queso fresco sinaloense artesanal, pertenecen a la categoría de variedades frescas. Sin embargo, en el ámbito regional, se destaca una disparidad en la composición de Proteobacteria en comparación con el queso fresco sonoreense artesanal. En un estudio anterior de Méndez-Romero y colaboradores (2021) en queso fresco, la abundancia de Proteobacteria osciló entre 0.38–44.58%, cifras significativamente más bajas que las observadas en el presente análisis.

En relación con Firmicutes (0.01-98.45%), solo el Jocoque (98.2%) de Jalisco presentó niveles máximos similares a los encontrados en este trabajo (Murugesan et al., 2018). En contraste, el queso fresco sonoreense artesanal exhibió rangos más elevados (55.4–99.03%)

en Firmicutes, lo cual coincide únicamente con los quesos identificados bajo los perfiles I y V de composición a nivel familiar del presente análisis (perfil Staphylococcaceae y perfil Streptococcaceae; Figura 5). Los orígenes de estos filos en el queso fresco sinaloense artesanal pueden atribuirse a múltiples factores, como su presencia autóctona en la leche no pasteurizada (Zhang et al., 2015), la contaminación cruzada durante la elaboración y la manipulación postproducción (Yoon et al., 2016), así como fuentes ambientales, como el agua y el suelo (Stellato et al., 2015; Andreani et al., 2015). Las familias constituyentes de la microbiota central explican su presencia a partir de las fuentes de origen ambiental y asociados a hospederos animales.

La familia Aeromonadaceae, con *Aeromonas* como género representativo, ubica su posible origen en organismos acuáticos y fuentes de agua dulce (Janda y Abbott, 2010), siendo esta última, la potencial procedencia factible. Las especies de *Aeromonas* ubican en el queso un hábitat adecuado en función de las condiciones tolerables de pH, NaCl y temperatura que permiten su subsistencia y desarrollo (Abbott et al., 2003). Las implicaciones de la presencia de esta familia conllevan a la diversificación en los procesos de fermentación, así como la adquisición de posibles enfermedades tales como gastroenteritis, septicemia e infecciones de heridas (Fernández-Bravo y Figueras, 2020).

La familia Bacillaceae, como organismos ampliamente distribuidos en variados ambientes naturales, tales como suelo, sedimentos, aire, ecosistemas marinos, y dulciacuícolas, lodos activados, consorcios microbianos en humanos y animales, han sido también reportados en alimentos fermentados (Mandic-Mulec et al., 2015; Tong et al., 2022). Su principal característica biológica comprende la capacidad de producir endoesporas; estructuras que brindan una gran capacidad de resistencia a estresores ambientales como calor, radicación, químicos nocivos y sequía (McKenney et al., 2013). Los posibles roles biológicos

desempeñados por estas bacterias incluyen la degradación de los nutrientes presentes en la matriz del queso, como aminoácidos, proteínas, ácidos grasos y azúcares mediante diversas enzimas. Dichas actividades pueden impactar en propiedades organolépticas como la textura o sabor. La presencia de *Bacillus cereus*, miembro de esta familia, puede producir intoxicación alimentaria y representar un riesgo para el consumidor (Montone et al., 2020; Cruz-Facundo et al., 2023).

Las enterobacterias, representadas por Enterobacteriaceae y Enterobacterales no clasificadas en este estudio, representan el grupo taxonómico encontrado con mayor diversidad de ambientes, ocurriendo en muchos ecosistemas, y con implicaciones biológicas importantes, como agentes etiológicos de enfermedades en animales y plantas (Janda y Abbott, 2021). En el caso de su aparición en el queso fresco sinaloense artesanal, implica una contaminación cruzada con estas fuentes diversas, no obstante, la presencia de *E. coli* y otros coliformes indican una contaminación fecal indirecta, la cual puede ocurrir durante el proceso de elaboración artesanal, transporte y manipulación posterior a su elaboración; asimismo, estos indicadores pueden tener un origen autóctono en la leche con la que se elabora, o bien, esta puede contaminarse durante un proceso de colecta sin las medidas de inocuidad e higiene adecuadas (Soto-Beltrán et al., 2015; Martín et al., 2016; Tapia et al., 2023). Las enfermedades adquiribles por el consumo de estos alimentos contaminados con altas concentraciones de estas bacterias incluyen intoxicación alimentaria, gastroenteritis, salmonelosis, diarreas infecciosas e infecciones asociadas a la atención hospitalaria. Además de presentar diversos perfiles de resistencia antibiótica, principalmente a betalactámicos, carbapenémicos, macrólidos, colistinas y polimixinas (Janda y Abbott, 2021; Hansen, 2021; Rodríguez-Santiago et al., 2021; Soria-Segarra et al., 2021).

Moraxellaceae tiene una amplia distribución en diversos entornos, que incluye alimentos, ambientes acuáticos, productos lácteos y, en ocasiones, ambientes hospitalarios (Teixeria y Merquior, 2014). En el contexto alimentario, son particularmente relevantes en alimentos como carnes, pescados y productos lácteos, como queso. En este caso, las Moraxellaceae desempeñan un papel clave en el proceso de maduración, donde contribuyen a la formación de compuestos aromáticos y definición de la textura (Franciosi et al., 2011; da Silva Abreu et al., 2021). No obstante, en esta familia se presentan importantes organismos de importancia médica, como *Moraxella catarrhalis* y *Acinetobacter baumannii*. *M. catarrhalis*, un organismo asociado a las mucosas humanas es un agente etiológico de otitis media aguda recurrente en infantes, infecciones del tracto respiratorio superior y en adultos se asocia a infecciones pulmonares en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) (Karalus y Campagnari, 2000). *A. baumannii*, uno de los mayores patógenos nosocomiales emergentes, destaca en su importancia médica debido a su notable capacidad de adquirir y regular determinantes de resistencia antibiótica, siendo así uno de los organismos multirresistentes a antibióticos más exitosos, representando un peligro para la utilidad y eficacia de las terapias antibióticas (Clark et al., 2016; Ayoub Moubareck y Hammoudi Halat, 2020).

Las Staphylococcaceae se encuentran en hábitats bien conocidos que incluyen la piel y sus glándulas, membranas y mucosas de mamíferos, así también de alimentos como carne, leche y queso. Las fuentes ambientales relevantes enlistan a los fómites, suelo, arena, polvo, aire y fuentes de agua dulce (Schleifer y Bell, 2009). La presencia de Staphylococcaceae en el queso fresco sinaloense artesanal indica la ausencia de buenas prácticas de higiene durante el proceso de ordeña, elaboración del queso, transporte y manipulación en puntos de venta, siendo estos puntos de la cadena de producción hasta el contacto con el consumidor los

críticos para el evento de contaminación cruzada con estas bacterias (Kümmel et al., 2016; Martínez-Vasallo et al., 2019; Gajewska et al., 2022). *S. aureus* es el patógeno de mayor relevancia de la familia, con implicaciones tanto en salud animal como humana. Es el agente etiológico responsable de un tercio de las mastitis bovinas, tanto clínicas como subclínicas (Li et al., 2017; Sağlam et al., 2017), afectando la producción y calidad microbiológica de la leche de consumo y elaboración de lácteos, incluyendo queso (Chen y Han, 2020). En los seres humanos, tiene un rol tanto comensal como patogénico. Se estima una colonización del 30% a nivel mundial. La carga de enfermedades es notable al ser causa líder de bacteriemia, endocarditis infectiva, infecciones osteoarticulares, pleuropulmonares, piel, tejidos blandos y asociadas a dispositivos médicos (Tong et al., 2015). La intoxicación alimentaria estafilocócica es una de las enfermedades transmitidas por alimentos más comunes y resulta de la ingestión de enterotoxinas estafilocócicas preformadas en los alimentos por cepas enterotoxigénicas de *S. aureus* (Hennekinne et al., 2012). Estas son activas en cantidades nanogramos a microgramos y son resistentes a la congelación, secado, tratamiento térmico y pH bajo. Los síntomas de intoxicación tienen una aparición de 30 minutos a 8 h que incluyen náuseas, vómitos, calambres abdominales, con o sin diarrea (Martínez-Vasallo et al., 2019). La aparición de enterotoxinas estafilocócicas en quesos artesanales resulta frecuente y es una problemática en salud pública (Cretenet et al., 2011; Hummerjohann et al., 2014).

La familia Streptococcaceae bacterias ácido-lácticas dentro del orden Lactobacillales, constituida por los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactovum* y *Pillibacter*, de orígenes ecológicos en animales de sangre caliente, principalmente como comensales en consorcios microbianos de cavidades y mucosas, en leche y productos lácteos, suelo, plantas e intestinos de insectos (Matthies et al., 2004; Higashiguchi et al., 2006; Vos et al., 2011). El nicho ecológico de estas bacterias es crucial en el contexto del queso, debido a sus actividades

biológicas de fermentación de los azúcares presentes en la matriz nutriente, la degradación de péptidos y proteínas, así como su efecto modulador de la composición de la comunidad microbiana presente en el queso mediante bacteriocinas y otros péptidos antimicrobianos. En términos globales, resultan esenciales para los procesos de fermentación y maduración del queso (Blaya et al., 2018; Mayo et al., 2021).

El género *Streptococcus*, a excepción de *S. salivarius thermophilus*, es un taxón de patógenos humanos y animales. Las infecciones estreptocócicas aún son un problema importante para la medicina moderna, *S. pneumoniae* es causa principal de neumonía, tanto comunitaria como hospitalaria, mientras que *S. pyogenes* representa cargas de enfermedad por faringitis estreptocócica, fascitis necrotizante y síndrome de shock tóxico (Goh et al., 2011; Krzyściak et al., 2013; Engholm et al., 2017; Rößler et al., 2018).

En el caso de *Lactococcus*, su impacto en la salud humana es positivo, al mejorar la salud gastrointestinal, estimular el sistema inmunológico, mejorar la tolerancia a la lactosa, así como generar efectos antiinflamatorios y antioxidantes (Kuda et al., 2014; Fang et al., 2022; Saleena et al., 2022).

Vibrionaceae, como última familia dominante encontrada en este estudio, resulta en un hallazgo atípico, ya que los orígenes ambientales de estas bacterias están asociados a hábitats oceánicos, desde los costeros hasta los abiertos y desde la superficie hasta las aguas profundas, con la excepción de algunas especies de *Vibrio* que ocurren en ambientes de agua salobre y dulce (Thompson et al., 2004; Takemura et al., 2014). Sinaloa por su condición geográfica de estado costero y con una notable planicie, es suposible que los sitios de producción cercanos a la costa o a fuentes de agua con estas bacterias puedan alcanzar a agregarse en algún punto del proceso de elaboración del queso fresco sinaloense artesanal, revelando su aparición en dicho lácteo. Su explicación de nicho también resulta desconocida,

al ser un grupo de bacterias metabólicamente heterogéneas en un ambiente, aunque nutriente, no habitual para estos organismos, complica la explicación de los posibles procesos bioquímicos y de transformación de queso, así como sus interacciones microbianas con el resto de la microbiota. Aunque se han reportado previamente estas bacterias en quesos (Bleicher et al., 2010; Murugesan et al., 2018; da Silva Abreu et al., 2021), no son constituyentes normalmente asociados a la microbiota del queso. Especies como *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* son patógenos bien reconocidos causantes de cólera, gastroenteritis, intoxicación alimentaria y sepsis bacteriana (Baker-Austin et al., 2018). Su posible presencia en estos productos lácteos representa un importante riesgo sanitario respecto a la adquisición de estas enfermedades.

La investigación de las capacidades metabólicas de estos filos mediante la predicción de perfiles funcionales ha revelado roles destacados tanto en el contexto de la comunidad microbiana como en las modificaciones bioquímicas de la matriz del queso. Se ha identificado una mayor actividad del módulo de Glicólisis por la vía de Embden-Meyerhoff en el conjunto de Firmicutes Dominantes. Este hallazgo es congruente con las adaptaciones metabólicas y evolutivas de las bacterias ácido-lácticas que componen este filo, quienes presentan una producción distintiva de ácido láctico a partir de glucosa y otros sacáridos. *Lactococcus lactis*, un conocido taxón de ácido láctico ilustra este proceso al ser encontrado en una notable abundancia (11.21%) en este análisis. La producción de ácido láctico, en sus formas de L-lactato y D-lactato, desempeña un papel esencial en las etapas de fermentación y maduración de los quesos (Blaya et al., 2018).

En condiciones de heterofermentación, productos finales de esta vía, como el acetato, pueden ejercer influencias sobre el desarrollo y la motilidad microbiana, dando lugar a interacciones

ecológicas negativas, como la competencia y el amensalismo, entre miembros de Proteobacteria, como *Salmonella* (Mayo et al., 2012; Nakamura et al., 2015).

Más allá de los aspectos metabólicos, es crucial resaltar el impacto en la seguridad alimentaria, particularmente en relación con los patógenos y probióticos detectados. La diversidad notable de patógenos (132 taxones) encontrada en estos productos refleja deficiencias en la inocuidad alimentaria a lo largo de las cadenas de producción y/o transporte de los productos lácteos. Aunque organismos como *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas*, *Proteus mirabilis* y *Vibrio parahaemolyticus* se encontraron en frecuencias muy bajas (< 1%) en las muestras analizadas, representan un riesgo potencial para la salud, ya que su presencia puede resultar en infecciones gastrointestinales e intoxicaciones alimentarias tras el consumo de estos productos portadores de bacterias (Coton et al., 2010; Arslan et al., 2011; Adame-Gomez et al., 2018; Jahansepa et al., 2020; Altayb et al., 2023; Tapia et al., 2023).

La identificación de *S. aureus* y *E. faecium* en asociación con el módulo de Resistencia a la Vancomicina, tipo D-Ala, D-Lac (Figura 13), subraya la relevancia de los mecanismos de resistencia antibiótica en la seguridad alimentaria. Estos mecanismos, caracterizados por determinantes génicas como *VanA*, *VanB*, *VanD*, *VanF* y *VanM*, presentan la capacidad de transferirse entre distintos organismos Gram positivos mediante elementos génicos móviles como plásmidos y transposones. Este fenómeno ha sido ampliamente documentado en la literatura científica y podría ser responsable de la dispersión de resistencia a la Vancomicina en diversos patógenos y microorganismos (Leclercq et al., 1988; Stogios y Savchenko, 2020). La detección de este mecanismo de resistencia en el queso fresco sinaloense artesanal plantea la posibilidad de resistencia antibiótica a Vancomicina en bacterias dentro del filo Firmicutes.

Adicionalmente, la identificación de un módulo relevante para la competencia celular (el Transportador de ADN relacionado a la competencia celular), también expresado en mayor abundancia en Firmicutes (Figura 13), sugiere la posibilidad de intercambio horizontal de material genético. En bacterias Gram positivas transformables, la competencia celular permite la adquisición de ADN ambiental, ya sea para su incorporación en el genoma o como fuente nutricional. Este proceso puede tener implicaciones en la adaptación y evolución de las bacterias transformables en el entorno del queso, y plantea cuestionamientos acerca de la propagación de genes de resistencia y otros elementos genéticos móviles.

Este estudio ha proporcionado un análisis integral de la microbiota en queso fresco sinaloense artesanal basado en el gen ARNr 16S, abordando su composición, funcionalidad y aspectos relacionados con la seguridad alimentaria. Los hallazgos subrayan la importancia de los filos Proteobacteria y Firmicutes en la composición microbiana, así como en los procesos metabólicos y la resistencia antibiótica. La identificación de patógenos en bajas frecuencias y la posible transferencia de genes de resistencia plantean desafíos para la seguridad alimentaria. Además, la detección de mecanismos de competencia celular en Firmicutes sugiere la posibilidad de un intercambio genético horizontal en este entorno. En consecuencia, se subraya la necesidad de estrategias de control y vigilancia en la producción y comercialización de estos productos lácteos tradicionales. Este estudio sienta las bases para futuras investigaciones y la implementación de medidas para asegurar la inocuidad y la calidad del queso fresco sinaloense artesanal.

X. CONCLUSIONES

1. Los filos Proteobacteria y Firmicutes son los más abundantes en la microbiota del queso fresco sinaloense artesanal. Estos filos constituyen la base de la estructura bacteriana en este producto, lo que sugiere su influencia fundamental en su desarrollo y calidad.
2. Se identificaron 117 familias, de las cuales 24 desempeñan un papel crucial como parte de la microbiota central. Este conjunto selecto de familias bacterianas puede considerarse como la base esencial que contribuye a las características únicas del queso.
3. La clasificación en seis perfiles de composición a nivel de familia (Staphylococcaceae, Aeromonadaceae, Moraxellaceae, Streptococcaceae, Vibrionaceae y Enterobacterales/Enterobacteriaceae) revela la diversidad de grupos bacterianos presentes en la microbiota del queso. Cada perfil puede tener implicaciones significativas en términos de sabor, textura y propiedades nutricionales.
4. La diversidad bacteriana, evaluada mediante métricas específicas, ha arrojado resultados consistentes con procesos de dominancia en la composición bacteriana. Indicando la presencia de taxones dominantes que influyen en la dinámica general de la microbiota.
5. Se ha confirmado que Aeromonadaceae, Staphylococcaceae, Moraxellaceae, Vibrionaceae, Streptococcaceae, Bacillaceae, Erwiniaceae, Enterobacteriaceae y Enterobacterales no clasificados, son los taxones dominantes en el queso fresco sinaloense artesanal. Estos hallazgos proporcionan una base valiosa para futuras investigaciones sobre la contribución de estos taxones a las características organolépticas y la seguridad alimentaria.
6. Los taxones patógenos, aunque presentes, constituyen una minoría en la composición bacteriana total. Entre éstos, 26 taxones se destacan por su abundancia, lo que sugiere una

posible interacción compleja entre microorganismos patógenos y otros componentes de la microbiota.

7. La identificación de taxones probióticos, especialmente *Lactococcus lactis*, en la microbiota del queso es un hallazgo significativo. Estos microorganismos beneficiosos pueden desempeñar un papel en la mejora de la salud digestiva y ofrecer oportunidades para la creación de productos lácteos funcionales y saludables.

8. Los resultados de este estudio han revelado que la composición bacteriana no está fuertemente influenciada por el sitio de muestreo. Esta información proporciona una visión valiosa sobre la no uniformidad y consistencia de la microbiota en diferentes áreas geográficas.

9. Además de la caracterización de la composición taxonómica, se han determinado patrones asociados con el clima y la ubicación geográfica. Estos patrones son esenciales para comprender cómo factores ambientales pueden influir en la microbiota del queso.

10. El análisis funcional ha permitido identificar diferencias significativas en perfiles metabólicos entre muestras dominadas por Proteobacteria y Firmicutes. Estos hallazgos sugieren posibles implicaciones para la calidad nutricional, sensorial del queso y de seguridad alimentaria.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Abbott, S. L., Cheung, W. K., & Janda, J. M. (2003). **The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes.** *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2348–2357. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2348-2357.2003>.

Adame-Gomez, R., Toribio-Jimenez, J., Vences-Velazquez, A., Rodríguez-Bataz, E., Santiago Dionisio, M. C., & Ramirez-Peralta, A. (2018). **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in artisanal cheeses in México.** *International Journal of Microbiology*, 2018.

Aldrete-Tapia, A., Escobar-Ramírez, M., Tamplin, M., & Hernández-Iturriaga, M. (2014). **High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese.** *Food Microbiology*, 44, 136-141. doi: 10.1016/j.fm.2014.05.022.

Altayb, H. N., Badri, R. M., Chaieb, K., & Moglad, E. (2023). **Detection and characterization of the most common foodborne pathogens by using multiplex PCR procedure.** *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(6), 103653. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103653>.

Arslan, S., Eyi, A., & Özdemir, F. (2011). **Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses.** *Journal of Dairy Science*, 94(12), 5851-5856.

Arthur, M., & Courvalin, P. (1993). **Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(8), 1563–1571.
<https://doi.org/10.1128/AAC.37.8.1563>

American Society for Microbiology (ASM). (2015). **FAQ: Microbes make the cheese: Report on an American Academy of Microbiology Colloquium held in Washington, DC, in June 2014.** Washington (DC): *American Society for Microbiology*; 2015. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562892/> doi:
10.1128/AAMCol.June.2014.

Andreani, N. A., Martino, M. E., Fasolato, L., Carraro, L., Montemurro, F., Mioni, R., ... & Cardazzo, B. (2015). **Reprint of ‘Tracking the blue: a MLST approach to characterise the *Pseudomonas fluorescens* group’.** *Food Microbiology*, 45, 148-158.

Ayoub Moubareck, C., & Hammoudi Halat, D. (2020). **Insights into *Acinetobacter baumannii*: A review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen.** *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(3), 119.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9030119>

- Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F., & Martinez-Urtaza, J. (2018). ***Vibrio spp. infections***. *Nature Reviews. Disease primers*, 4(1), 8. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0005-8>
- Bartlett, A., Padfield, D., Lear, L., Bendall, R., & Vos, M. (2022). **A comprehensive list of bacterial pathogens infecting humans**. *Microbiology (Reading, England)*, 168(12), 10.1099/mic.0.001269. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001269>.
- Barrett, P., Hunter, J., Miller, J. T., Hsu, J. C., & Greenfield, P. (2005). **Matplotlib--A Portable Python Plotting Package**. *In Astronomical Data Analysis Software and Systems XIV* (Vol. 347, p. 91).
- Bintsis, T., & Athanasoulas, A. (2015). Dairy starter cultures. En: Papademas (Ed). *Dairy Microbiology-A Practical Approach*, 1, 114-154.
- Bintsis, T., & Papademas, P. (2017). An overview of the cheesemaking process. En: Papademas y Bintsis (Ed). *Global cheesemaking technology: Cheese quality and characteristics*. 120-156. <https://doi.org/10.1002/9781119046165.ch0f>
- Blaya, J., Barzideh, Z., & LaPointe, G. (2018). **Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment**. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 3611–3629. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13345>.

- Bleicher, A., Neuhaus, K., & Scherer, S. (2010). ***Vibrio casei* sp. nov., isolated from the surfaces of two French red smear soft cheeses.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(8), 1745-1749.
- Buermans, H. P., & den Dunnen, J. T. (2014). **Next generation sequencing technology: Advances and applications.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842(10), 1932–1941.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.015>
- Campista-León, S., López-Espinoza, J. U., Garcia-Guerrero, J. T., Alfonso-Corrado, C., Clark-Tapia, R., & Peinado-Guevara, L. I. (2022). **Determination of drug-resistant bacteria in palmar surface and touchscreen cell phones from bystanders in an urban community.** *Microbiological Research*, 256, 126958.
- Caro, I., Mateo, J., Sandoval, M., Soto, S., García-Armesto, M., y Castro, J. (2013). **Characterization of Oaxaca raw milk cheese microbiota with particular interest in *Lactobacillus* strains.** *Journal of Dairy Science*, 96(6), 3461-3470. doi: 10.3168/jds.2012-6103.
- Carvalho, P. R., Munita, C. S., & Lapolli, A. L. (2019). **Validity studies among hierarchical methods of cluster analysis using cophenetic correlation coefficient.** *Brazilian Journal of Radiation Sciences*, 7(2A).
- Cetinkaya, Y., Falk, P., & Mayhall, C. G. (2000). **Vancomycin-resistant enterococci.** *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 686-707.

Cervantes-Escoto, F., Villegas de Gante, A., Cesin-Vargas, A., y Espinoza-Ortega, A. (2013). **Los quesos mexicanos genuinos: un saber hacer que se debe rescatar y preservar.** (2da ed.). Estado de México, Libro de Agricultura Básica, (176 p).

Chen I, Christie PJ, Dubnau D. **The ins and outs of DNA transfer in bacteria.** *Science*. 2005. 310(5753):1456-60. doi: 10.1126/science.1114021.

Chen, I., & Dubnau, D. (2004). **DNA uptake during bacterial transformation.** *Nature Reviews Microbiology*, 2(3), 241–249. <https://doi.org/10.1038/nrmicro844>.

Cheng, W. N., & Han, S. G. (2020). **Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review.** *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 33(11), 1699–1713. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>

Clark, N. M., Zhanel, G. G., & Lynch III, J. P. (2016). **Emergence of antimicrobial resistance among *Acinetobacter* species: a global threat.** *Current Opinion in Critical Care*, 22(5), 491-499.

COFOCALEC (Consejo para el Fomento de la Calidad de Leche y sus Derivados). (2011). **Norma Mexicana NMX-F-735-COFOCALEC-2011. Sistema Producto Leche–Alimento–Lácteo–Alimento lácteo regional–Queso Cotija artesanal madurado–Denominación, especificaciones y métodos de prueba.**

- Coton, M., Delbés-Paus, C., Irlinger, F., Desmasures, N., Le Fleche, A., Stahl, V., ... & Coton, E. (2012). **Diversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses.** *Food microbiology*, 29(1), 88-98.
- Cretenet, M., Even, S., & Le Loir, Y. (2011). **Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges.** *Dairy Science & Technology*, 91(2), 127-150.
- Cruz-Facundo, I. M., Toribio-Jiménez, J., Castro-Alarcón, N., Leyva-Vázquez, M. A., Rodríguez-Ruíz, H. A., Pérez-Olais, J. H., ... & Ramírez-Peralta, A. (2023). ***Bacillus cereus* in the Artisanal Cheese Production Chain in Southwestern Mexico.** *Microorganisms*, 11(5), 1290.
- da Silva Abreu, A. C., Carazzolle, M. F., Crippa, B. L., Barboza, G. R., Rall, V. L. M., de Oliveira Rocha, L., & Silva, N. C. C. (2021). **Bacterial diversity in organic and conventional Minas Frescal cheese production using targeted 16S rRNA sequencing.** *International Dairy Journal*, 122, 105139.
- Davis, J.G. (1965). **Cheese.** Vol. 1: *Basic Technology.* Churchill Livingstone, London.
- De la Rosa-Alcaraz, M., Ortiz-Estrada, Á. M., Heredia-Castro, P. Y., Hernández-Mendoza, A., Reyes-Díaz, R., Vallejo-Cordoba, B., & 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.
<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17363>.

DOF (Diario Oficial de la Federación). (2012). **Producto lácteo y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba (NOM-183-SCFI-2012)**. Disponible en línea en: <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4693/seeco1/seeco1.htm>. (Consultado el 20 de Diciembre de 2021).

Duquenne P. (2018). **On the identification of culturable microorganisms for the assessment of biodiversity in bioaerosols.** *Annals of Work Exposures and Health*, 62(2), 139–146. <https://doi.org/10.1093/annweh/wxx096>

Edgar R. C. (2010). **Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST.** *Bioinformatics* (Oxford, England), 26(19), 2460–2461.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>

Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). **UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection.** *Bioinformatics* (Oxford, England), 27(16), 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>

Engholm, D. H., Kilian, M., Goodsell, D. S., Andersen, E. S., & Kjærgaard, R. S. (2017). **A visual review of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*.** *FEMS Microbiology Reviews*, 41(6), 854–879. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux037>

- Escobar-Zepeda, A., Sanchez-Flores, A., y Quirasco Baruch, M. (2016). **Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota.** *Food Microbiology*, 57, 116-127. doi: 10.1016/j.fm.2016.02.004.
- Fang, S., Qin, T., Yu, T., & Zhang, G. (2022). **Improvement of the gut microbiota *in vivo* by a short-chain fatty acids-producing strain *Lactococcus garvieae* CF11.** *Processes*, 10(3), 604.
- Fernández-Bravo, A., y Figueras, M. J. (2020). **An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity.** *Microorganisms*, 8(1), 129. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010129>.
- Ferravante, C., Memoli, D., Palumbo, D., Ciaramella, P., Di Loria, A., D'Agostino, Y., Nassa, G., Rizzo, F., Tarallo, R., Weisz, A., & Giurato, G. (2021). **HOME-BIO (sHOTgun MEtagenomic analysis of BIOlogical entities): a specific and comprehensive pipeline for metagenomic shotgun sequencing data analysis.** *BMC Bioinformatics*, 22(Suppl 7), 106. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04004-y>
- Fischer, M. A., Güllert, S., Neuling, S. C., Streit, W. R., & Schmitz, R. A. (2016). **Evaluation of 16S rRNA gene primer pairs for monitoring microbial community structures showed high reproducibility within and low comparability between datasets generated with multiple archaeal and bacterial primer pairs.** *Frontiers in Microbiology*, 7, 1297. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01297>

Fox, P. F. & Guinee, T. P. (2013). **Cheese science and technology**. En: Park, Y. W. & Haenlein, G. F. W. (eds.), *Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health*. John Wiley & Sons Ltd., Oxford, pp. 384–400.

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. (2000). **Fundamentals of cheese science** (pp. 121-183). New York: Springer US.

Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. (2004). **Cheese: an overview**. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, & T. R. Guinee (Vol. Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (3ra ed.). 1. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (pp. 1–18). *Elsevier*.

Franciosi, E., De Sabbata, G., Gardini, F., Cavazza, A., & Poznanski, E. (2011). **Changes in psychrotrophic microbial populations during milk creaming to produce Grana Trentino cheese**. *Food microbiology*, 28(1), 43-51.

Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W., & Zadernowska, A. (2022). **Occurrence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains along the production chain of raw milk cheeses in Poland**. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(19), 6569. <https://doi.org/10.3390/molecules27196569>

Garreta, R., & Moncecchi, G. (2013). **Learning scikit-learn: machine learning in python**. *Packt Publishing Ltd*.

- Gänzle, M. G. (2015). **Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage.** *Current Opinion in Food Science*, 2, 106-117.
- Gobbetti, M., Neviani, E., & Fox, P. (2018). **The cheeses of Italy: Science and Technology** (1ra ed.). Springer International Publishing.
- Goh, Y. J., Goin, C., O'Flaherty, S., Altermann, E., & Hutkins, R. (2011). **Specialized adaptation of a lactic acid bacterium to the milk environment: the comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* LMD-9.** *Microbial Cell Factories*, 10 Suppl 1(Suppl 1), S22. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S22>
- González-Córdova, A. F., Yescas, C., Ortiz-Estrada, Á. M., Hernández-Mendoza, A., & Vallejo-Cordoba, B. (2016). **Invited review: artisanal Mexican cheeses.** *Journal of Dairy Science*, 99(5), 3250-3262.
- Ghurye, J. S., Cepeda-Espinoza, V., & Pop, M. (2016). **Metagenomic Assembly: Overview, challenges and applications.** *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 89(3), 353–362.
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). **Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products.** *Chemistry & biology*, 5(10), R245-R249.

Hansen, G. T. (2021). **Continuous evolution: perspective on the epidemiology of carbapenemase resistance among Enterobacterales and other Gram-negative bacteria.** *Infectious Diseases and Therapy*, 10, 75-92.

Hennekinne, J. A., De Buyser, M. L., & Dragacci, S. (2012). **Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation.** *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 815–836. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x>

Higashiguchi, D. T., Husseneder, C., Grace, J. K., & Berestecky, J. M. (2006). **Pilibacter termitis** gen. nov., sp. nov., a lactic acid bacterium from the hindgut of the Formosan subterranean termite (*Coptotermes formosanus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(Pt 1), 15–20. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63543-0>

Holzappel, W. H., & Wood, B. J. (2014). **Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy.** (1^{ra} ed.) *John Wiley & Sons*.

Hummerjohann, J., Naskova, J., Baumgartner, A., & Graber, H. U. (2014). **Enterotoxin-producing Staphylococcus aureus genotype B as a major contaminant in Swiss raw milk cheese.** *Journal of Dairy Science*, 97(3), 1305–1312. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7643>

Huse, S. M., Dethlefsen, L., Huber, J. A., Mark Welch, D., Relman, D. A., & Sogin, M. L. (2008). **Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing.** *PLoS Genetics*, 4(11), e1000255. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000255>

Illumina Inc. (2013). **16S Metagenomic Sequencing Library Preparation.** Disponible en línea en: https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomiclibrary-prep-guide-15044223-b.pdf (Consultado el 16 de diciembre de 2021).

Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). **The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection.** *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 35–73. <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>.

Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2021). **The changing face of the Family Enterobacteriaceae (Order: "Enterobacterales"): New members, taxonomic issues, geographic expansion, and new diseases and disease syndromes.** *Clinical Microbiology Reviews*, 34(2), e00174-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00174-20>.

Jahansepas, A., Sharifi, Y., Aghazadeh, M., & Ahangarzadeh Rezaee, M. (2020). **Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from clinical samples and traditional cheese types in the Northwest of Iran: antimicrobial susceptibility and virulence traits.** *Archives of Microbiology*, 202, 765-772.

- Jiang, X., Li, X., Yang, L., Liu, C., Wang, Q., Chi, W., & Zhu, H. (2019). **How microbes shape their communities? A microbial community model based on functional genes.** *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 17(1), 91-105.
- Jiménez-Guzmán, J., Flores-Nájera, A., Cruz-Guerrero, A. E., & García-Garibay, M. (2009). **Use of an exopolysaccharide-producing strain of *Streptococcus thermophilus* in the manufacture of Mexican Panela cheese.** *LWT-Food Science and Technology*, 42(9), 1508-1512.
- Jo, J., Oh, J., & Park, C. (2020). **Microbial community analysis using high-throughput sequencing technology: a beginner's guide for microbiologists.** *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 58(3), 176–192. <https://doi.org/10.1007/s12275-020-9525-5>
- Kamimura, B. A., Magnani, M., Luciano, W. A., Campagnollo, F. B., Pimentel, T. C., Alvarenga, V. O., ... & Sant'Ana, A. S. (2019). **Brazilian artisanal cheeses: an overview of their characteristics, main types and regulatory aspects.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(5), 1636-1657.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Kawashima, M., & Ishiguro-Watanabe, M. (2023). **KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes.** *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D587–D592. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac963>.

- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). **KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes.** *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Karalus, R., & Campagnari, A. (2000). ***Moraxella catarrhalis*: a review of an important human mucosal pathogen.** *Microbes and Infection*, 2(5), 547-559.
- Khalid, N. M., & Marth, E. H. (1990). **Lactobacilli—their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: a review.** *Journal of Dairy Science*, 73(10), 2669-2684.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. (2013). **Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies.** *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1-e1. doi: 10.1093/nar/gks808.
- Kuda, T., Noguchi, Y., Ono, M., Takahashi, H., Kimura, B., Kamita, R., ... & Kawahara, M. (2014). ***In vitro* evaluation of the fermentative, antioxidant, and anti-inflammation properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BF3 and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* BF7 isolated from *Oncorhynchus keta* intestines in Rausu, Japan.** *Journal of Functional Foods*, 11, 269-277.
- Kümmel, J., Stessl, B., Gonano, M., Walcher, G., Bereuter, O., Fricker, M., Grunert, T., Wagner, M., & Ehling-Schulz, M. (2016). ***Staphylococcus aureus* entrance into the dairy chain: tracking *S. aureus* from dairy cow to cheese.** *Frontiers in Microbiology*, 7, 1603. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01603>

Krzyściak, W., Pluskwa, K. K., Jurczak, A., & Kościelniak, D. (2013). **The pathogenicity of the *Streptococcus* genus.** *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 32(11), 1361–1376. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1914-9>

Lahti, L., & Shetty, S. (2018). **Introduction to the microbiome R package.** Preimpresión disponible en <https://microbiome.github.io/tutorials>.

Langille, M. G., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., ... & Huttenhower, C. (2013). **Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences.** *Nature biotechnology*, 31(9), 814-821

Lederberg, J., & McCray, A. T. (2001, 2001/04/02/). **`Ome Sweet `Omics--A Genealogical Treasury of Words.** *The Scientist*, 15(7), 8. <https://link.gale.com/apps/doc/A73535513/AONE?u=anon~3d8631d0&sid=googlScholar&xid=608c1c8e>

Li, T., Lu, H., Wang, X., Gao, Q., Dai, Y., Shang, J., & Li, M. (2017). **Molecular Characteristics of *Staphylococcus aureus* Causing Bovine Mastitis between 2014 and 2015.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 127. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00127>

- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., & Law, M. (2012). **Comparison of next-generation sequencing systems.** *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012, 251364. <https://doi.org/10.1155/2012/251364>
- Liu, Y. X., Qin, Y., Chen, T., Lu, M., Qian, X., Guo, X., & Bai, Y. (2021). **A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data.** *Protein & cell*, 12(5), 315-330.
- Mandic-Mulec, I., Stefanic, P., & van Elsas, J. D. (2015). **Ecology of bacillaceae.** *Microbiology Spectrum*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.tbs-0017-2013>.
- Mayo, B., Rodríguez, J., Vázquez, L., & Flórez, A. B. (2021). **Microbial interactions within the cheese ecosystem and their application to improve quality and safety.** *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(3), 602. <https://doi.org/10.3390/foods10030602>.
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). **The vocabulary of microbiome research: a proposal.** *Microbiome*, 3, 31-31. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Martin, N. H., Trmčić, A., Hsieh, T. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2016). **The evolving role of *Coliforms* as indicators of unhygienic processing conditions in dairy foods.** *Frontiers in Microbiology*, 7, 1549. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01549>

- Martínez-Vasallo, A., Ribot-Enríquez, A., Riverón-Alemán, Y., Remón-Díaz, D., Martínez-García, Y. A., Jacobsens, L., & Uyttendaele, M. (2019). ***Staphylococcus aureus* in the production chain of artisan fresh cheese.** *Revista de Salud Animal*, 41(1), 1-9.
- Matthies, C., Gössner, A., Acker, G., Schramm, A., & Drake, H. L. (2004). ***Lactovum miscens* gen. nov., sp. nov., an aerotolerant, psychrotolerant, mixed-fermentative anaerobe from acidic forest soil.** *Research in Microbiology*, 155(10), 847–854.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.06.006>
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). **A new method for sequencing DNA.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(2), 560–564.
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.560>
- McKenney, P. T., Driks, A., & Eichenberger, P. (2013). **The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat.** *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
- McKinney, W. (2011). **pandas: a foundational Python library for data analysis and statistics.** *Python for high performance and scientific computing*, 14(9), 1-9.
- McSweeney, P. L. H. (2007). **Introduction: How does rennet coagulate milk?** En: McSweeney, P. L. H. (ed.), *Cheese Problems Solved*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, pp. 50–51.

McSweeney, P. L., Ottogalli, G., & Fox, P. F. (2017). **Diversity and classification of cheese varieties: an overview.** *Cheese*, 781-808.

Méndez-Romero, J. I., Reyes-Díaz, R., Santiago-López, L., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., Sayago-Ayerdi, S. G., ... & González-Córdova, A. F. (2021). **Artisanal fresco cheese from Sonora: physicochemical composition, microbial quality, and bacterial characterization by high-throughput sequencing.** *International Journal of Dairy Technology*, 74(2), 359-370.

Miranda, J. M., Mondragón, A. C., Martínez, B., Guarddon, M., & Rodríguez, J. A. (2009). **Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico.** *Journal of Food Protection*, 72(5), 966-971.

Montone, A. M. I., Capuano, F., Mancusi, A., Di Maro, O., Peruzzy, M. F., Proroga, Y. T. R., & Cristiano, D. (2020). **Exposure to *Bacillus cereus* in water Buffalo Mozzarella Cheese.** *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(12), 1899.
<https://doi.org/10.3390/foods9121899>

Morales, F., Morales, J. I., Hernández, C. H., & Hernández-Sánchez, H. (2011). **Isolation and partial characterization of halotolerant lactic acid bacteria from two Mexican cheeses.** *Applied biochemistry and biotechnology*, 164(6), 889-905.

Murugesan, S., Reyes-Mata, M. P., Nirmalkar, K., Chavez-Carbajal, A., Juárez-Hernández, J. I., Torres-Gómez, R. E., ... y García-Mena, J. (2018). **Profiling of bacterial and**

fungal communities of Mexican cheeses by high throughput DNA sequencing.
Food Research International, 113, 371-381.

Oksanen J, Simpson G, Blanchet F, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'Hara R, Solymos P, Stevens M, Szoecs E, Wagner H, Barbour M, Bedward M, Bolker B, Borcard D, Carvalho G, Chirico M, De Caceres M, Durand S, Evangelista H, FitzJohn R, Friendly M, Furneaux B, Hannigan G, Hill M, Lahti L, McGlinn D, Ouellette M, Ribeiro Cunha E, Smith T, Stier A, Ter Braak C, Weedon J (2022). **Vegan: community ecology package.** *R package version 2.6-4*, <<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>>.

Ploner, A. (2021). **Heatplus: Heatmaps with row and/or column covariates and colored clusters.** *R package version 3.2.0*, <https://github.com/alexploner/Heatplus>.

Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). **Shotgun metagenomics, from sampling to analysis.** *Nature Biotechnology*, 35(9), 833–844.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3935>

R Core Team. (2019). **R: a language and environment for statistical computing.**
Disponible en línea en: <https://www.r-project.org/> (Consultado el 16 de diciembre de 2021).

- Renye, J., Somkuti, G., Van Hekken, D., y Guerrero Prieto, V. (2011). **Short communication: characterization of microflora in Mexican Chihuahua cheese.** *Journal of Dairy Science*, 94(7), 3311-3315. doi: 10.3168/jds.2011-4177.
- Tapia, H. R., Avila, J. M., Campista, S., Hernandez, E., & Peinado, L. I. (2023). **Determination of the sanitary quality of unpasteurized fresh cheeses for human consumption in Sinaloa, Mexico.** *Alimentos Ciencia e Ingeniería*, 30(1), 27-37.
- Takemura, A. F., Chien, D. M., & Polz, M. F. (2014). **Associations and dynamics of Vibrionaceae in the environment, from the genus to the population level.** *Frontiers in Microbiology*, 5, 38. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00038>
- Thompson, F. L., Iida, T., & Swings, J. (2004). **Biodiversity of Vibrios.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 68(3), 403–431. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004>
- Rideout, J. R., He, Y., Navas-Molina, J. A., Walters, W. A., Ursell, L. K., Gibbons, S. M., Chase, J., McDonald, D., Gonzalez, A., Robbins-Pianka, A., Clemente, J. C., Gilbert, J. A., Huse, S. M., Zhou, H. W., Knight, R., & Caporaso, J. G. (2014). **Subsampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences.** *PeerJ*, 2, e545. <https://doi.org/10.7717/peerj.545>.

- Rodrigues, J. F., Mangia, B. A., e Silva, J. G., Lacorte, G. A., Coimbra, L. O., Esmerino, E. A., ... & da Cruz, A. G. (2020). **Sorting task as a tool to elucidate the sensory patterns of artisanal cheeses.** *Journal of Sensory Studies*, 35(3), e12562.
- Rodríguez-Santiago, J., Cornejo-Juárez, P., Silva-Sánchez, J., & Garza-Ramos, U. (2021). **Polymyxin resistance in Enterobacterales: overview and epidemiology in the Americas.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, 58(5), 106426.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). **VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics.** *PeerJ*, 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Rößler, S., Berner, R., Jacobs, E., & Toepfner, N. (2018). **Prevalence and molecular diversity of invasive *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus pyogenes* in a German tertiary care medical centre.** *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 37(7), 1325–1332. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3254-2>
- RStudio Team. (2020). **RStudio: Integrated Development for R.** RStudio, PBC, Boston, MA. Disponible en línea en: <http://www.rstudio.com/> (Consultado el 16 de Diciembre de 2021).

- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sağlam, A. G., Şahin, M., Çelik, E., Çelebi, Ö., Akça, D., & Otlu, S. (2017). **The role of staphylococci in subclinical mastitis of cows and lytic phage isolation against to *Staphylococcus aureus*.** *Veterinary World*, 10(12), 1481–1485. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1481-1485>
- Saleena, L. A. K., Teo, M. Y. M., How, Y. H., In, L. L. A., & Pui, L. P. (2023). **Immunomodulatory action of *Lactococcus lactis*.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 135(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.10.010>
- Salque, M., Bogucki, P. I., Pyzel, J., Sobkowiak-Tabaka, I., Grygiel, R., Szmyt, M., y Evershed, R. P. (2013). **Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe.** *Nature*, 493, 522–525.
- Saxer, S., Schwenninger, S., & Lacroix, C. (2013). **Characterization of the microflora of industrial Mexican cheeses produced without added chemical preservatives.** *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 314-320. doi: 10.1016/j.lwt.2013.01.016.
- Schleifer, K. H., & Bell, J. A. (2009). **Family VIII. Staphylococcaceae fam. nov.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 3, 392.

Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). **Metagenomic biomarker discovery and explanation.** *Genome biology*, 12(6), R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>.

Smit, G., Smit, B. A., & Engels, W. J. (2005). **Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products.** *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 591-610.

Soria-Segarra, C., Soria-Segarra, C., Catagua-González, A., Apolo-Matamoros, M., Vega-Franco, F., Chung-Sang, M., ... & Gutiérrez-Fernández, J. (2021). **Macrolides: a novel risk factor for carbapenemase-producing Enterobacterales in intensive care units.** *The Journal of Infection in Developing Countries*, 15(04), 584-589.

Soto Beltran, M., Gerba, C. P., Porto Fett, A., Luchansky, J. B., & Chaidez, C. (2015). **Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from small Mexican retail markets of queso fresco.** *International Journal of Environmental Health Research*, 25(2), 140–148. <https://doi.org/10.1080/09603123.2014.915016>

Stellato, G., De Filippis, F., La Stora, A., & Ercolini, D. (2015). **Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy processing environment.** *Applied and Environmental Microbiology*, 81(22), 7893-7904.

- Teixeira, L. M., & Merquior, V. L. C. (2014). **The family moraxellaceae. The prokaryotes: gammaproteobacteria.** *Berlin: Springer*, 443-476.
- Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G., Jr (2015). ***Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management.** *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603–661.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
- Tong, W., He, P., Yang, Y., Qiao, Z., Huang, D., Luo, H., & Feng, X. (2022). **Occurrence, diversity, and character of bacillaceae in the solid fermentation process of strong aromatic liquors.** *Frontiers in Microbiology*, 12.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.811788>.
- Torres-Llenez, M. J., Vallejo-Cordoba, B., Díaz-Cinco, M. E., Mazorra-Manzano, M. A., & González-Córdova, A. F. (2006). **Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese.** *Food Control*, 17(9), 683-690.
- Torres-Vitela, M. R., Mendoza-Bernardo, M., Castro-Rosas, J., Gomez-Aldapa, C. A., Garay-Martinez, L. E., Navarro-Hidalgo, V., & Villarruel-López, A. (2012). **Incidence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, and staphylococcal enterotoxin in two types of Mexican fresh cheeses.** *Journal of Food Protection*, 75(1), 79-84.

USDA. (2021). **Dairy: World Markets and Trade**. Disponible en línea en: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>. (Consultado el 19 de enero de 2022).

Van Hekken, D. L., & Farkye, N. Y. (2003). **Hispanic cheeses: The quest for queso**. *Food Technology (Chicago)*, 57(1), 32-38.

Villanueva-Carvajal, A., Esteban-Chávez, M., Espinoza-Ortega, A., Arriaga-Jordán, C. M., & Dominguez-Lopez, A. (2012). **Oaxaca cheese: flavour, texture and their interaction in a Mexican traditional pasta filata type cheese**. *CyTA-Journal of Food*, 10(1), 63-70.

Villegas De Gante, A., Cervantes-Escoto, F., Cesín-Vargas, A., Espinoza-Ortega, A., Hernández-Montes, A., Santos-Moreno, A., & Martínez-Campos, Á. R. (2014). **Atlas de los quesos mexicanos genuinos**. Texcoco, México: Colegio de Postgraduados.

Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T. E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., Burovski, E., Peterson, P., Weckesser, W., Bright, J., van der Walt, S. J., Brett, M., Wilson, J., Millman, K. J., Mayorov, N., Nelson, A. R. J., Jones, E., Kern, R., Larson, E., Carey, C. J., ... SciPy 1.0 Contributors (2020). **SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python**. *Nature methods*, 17(3), 261–272. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>

- Von Neubeck, M., Baur, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Kranz, B., Stressler, T., ...
Wenning, M. (2015). **Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential.** *International Journal of Food Microbiology*, 211, 57–65.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., ... & Whitman, W. B. (Eds.). (2011). **Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (Vol. 3).** Springer Science & Business Media.
- Waskom, M. L. (2021). **Seaborn: statistical data visualization.** *Journal of Open Source Software*, 6(60), 3021.
- Wickham, H. (2016). **ggplot2: Elegant graphics for data analysis.** Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Ye, Y., & Doak, T. G. (2009). **A parsimony approach to biological pathway reconstruction/inference for genomes and metagenomes.** *PLoS Computational Biology*, 5(8), e1000465. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000465>
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). **Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>.

Yoon, Y., Lee, S., & Choi, K. H. (2016). **Microbial benefits and risks of raw milk cheese.** *Food Control*, 63, 201-215.

Yuan, C., Lei, J., Cole, J., & Sun, Y. (2015). **Reconstructing 16S rRNA genes in metagenomic data.** *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(12), i35–i43.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv231>

Zhang, R., Huo, W., Zhu, W., & Mao, S. (2015). **Characterization of bacterial community of raw milk from dairy cows during subacute ruminal acidosis challenge by high-throughput sequencing.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(5), 1072–1079. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6800>.

XII. ANEXOS

12.1. Reporte de Evaluación de Similitud y Originalidad

Identificación de reporte de similitud. oid:12611:257583329

NOMBRE DEL TRABAJO	AUTOR
Descripción metagenómica de la comunidad bacteriana en queso fresco sinaloense de producción artesanal	Joel Tohevaris Garcia Guerrero

RECUENTO DE PALABRAS	RECUENTO DE CARACTERES
13458 Words	79392 Characters
RECUENTO DE PÁGINAS	TAMAÑO DEL ARCHIVO
70 Pages	3.9MB
FECHA DE ENTREGA	FECHA DEL INFORME
Aug 23, 2023 4:40 PM GMT-7	Aug 23, 2023 4:41 PM GMT-7

- **2% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

<ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="312 1196 628 1225">• 2% Base de datos de Internet<li data-bbox="312 1232 600 1261">• Base de datos de Crossref<li data-bbox="312 1267 751 1301">• 1% Base de datos de trabajos entregados	<ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="794 1196 1166 1225">• 0% Base de datos de publicaciones<li data-bbox="794 1232 1294 1261">• Base de datos de contenido publicado de Crossref
--	--
- **Excluir del Reporte de Similitud**

<ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="312 1377 549 1406">• Material bibliográfico<li data-bbox="312 1413 488 1449">• Material citado	<ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="794 1377 963 1406">• Material citado<li data-bbox="794 1413 1235 1449">• Coincidencia baja (menos de 10 palabras)
--	---

Resumen