



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

COMPORTAMIENTO DE CEPAS DE *STREPTOCOCCUS* AISLADAS DEL POZOL ANTE LA TEMPERATURA ALTA Y EL pH BAJO PRESENTES DURANTE LA ELABORACIÓN DE LA MASA Y DURANTE SU FERMENTACIÓN

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. LILA LUBIANKA DOMÍNGUEZ RAMÍREZ

Dra. CARMEN WACHER RODARTE
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA
IIB, UNAM

Dr. MARIANO GARCÍA GARIBAY
UAM IZTAPALAPA/LERMA

Ciudad de México. Noviembre, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE GENERAL

Índice de Tablas	iv
Índice de Figuras	vi
Reconocimientos.....	viii
ABREVIACIONES.....	x
RESUMEN	xiv
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Introducción	1
1.2 El Pozol	3
1.2.1 Proceso de nixtamalización	7
1.2.2 Origen de la microbiota natural del pozol	9
1.2.3 Microbiota del pozol	10
1.2.4 <i>Streptococcus</i> spp. como miembro importante de la microbiota del pozol (Villahermosa, Tabasco)	11
1.3 El género <i>Streptococcus</i>	14
1.3.1 Complejo <i>S. bovis</i> / <i>S. equinus</i>	16
1.3.2 <i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	18
1.4 Cambios en el pH de la masa de pozol	21
1.5 Respuesta microbiana al estrés	23
1.5.1 Respuesta a estrés ácido	24
1.5.2 Respuesta a estrés alcalino	27
1.5.3 Respuesta a choque térmico	29
2. JUSTIFICACIÓN.....	34
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo general	35
4.2 Objetivos particulares	35
5. MATERIALES Y METODOLOGÍA	36
5.1 Cepas de trabajo	37
5.1.1 Conservación de cepas	39
5.2 Identificación a nivel de especie de las cepas de <i>Streptococcus</i> spp. aisladas de pozol por secuenciación del gen de la superóxido dismutasa dependiente de Manganeso (<i>sodA</i>)	40
5.2.1 Obtención de la secuencia del gen <i>soda</i>	40
5.2.1.1 Cultivo y cosecha de células	40
5.2.1.2 Extracción de DNA genómico (Fast ID/DNA extraction kit; Genetic ID NA, Inc., EE. UU.)	40
5.2.1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	40
5.2.1.4 Purificación del DNA amplificado (PCR CleanUp, Millipore, México)	41
5.2.1.5 Determinación de la pureza de los fragmentos del gen <i>soda</i> amplificados y cálculo de la concentración	41
5.2.2 Secuenciación del fragmento de <i>soda</i> amplificado con el oligo d1 e identificación	42
5.2.3 Procesamiento de la información para su interpretación	42
5.2.3.1 Elaboración de dendrograma con secuencias del gen <i>soda</i> de <i>Streptococcus</i> spp. utilizando el método de Neighbor-Joining	42

5.3 Determinación semicuantitativa del potencial amilolítico y xilanolítico de cepas de <i>Streptococcus</i> spp. aisladas de pozol	44
5.4 Determinación de la capacidad de cepas de <i>Streptococcus</i> spp. aisladas de pozol para fermentar lactosa	44
5.5 Determinación de la concentración de biomasa, relación biomasa-densidad óptica	45
5.6 Cinética de crecimiento de cepas de <i>Streptococcus</i> spp. aisladas de pozol en medio APT	45
5.7 Estudio de la supervivencia bacteriana como respuesta a estrés	46
5.7.1 Efecto del pH en <i>Sii-25124</i>	46
5.7.1.1 Determinación de los valores cardinales de pH	46
5.7.1.2 Efecto del pH ácido en la supervivencia (acid killing test) y en la inducción de respuesta de tolerancia a la acidez en <i>Sii-25124</i>	47
5.7.2 Comparación del desarrollo de cepas de <i>Streptococcus</i> spp. aisladas de pozol en los valores de pH umbral para <i>Sii-25124</i> : cinética de crecimiento en pH 3.6, 4.0 y 12.0	48
5.7.3 Efecto de altas temperaturas sobre <i>Sii-25124</i>	48
5.7.3.1 Determinación del valor de reducción decimal (D_{56} y D_{62})	48
5.7.4 Protección cruzada a pH ácido y a pH alcalino inducida por choque térmico ..	50
5.8 Estudio de la expresión diferenciada de genes ante la respuesta a estrés	50
5.8.1 Búsqueda de genes relacionados con estrés en <i>Sii-25124</i>	50
5.8.2 Efecto del estrés por pH sobre la expresión de genes	52
5.8.2.1 Diseño de oligonucleótidos específicos para genes de respuesta general y respuesta específica a estrés	52
5.8.2.2 Validación <i>in vitro</i> de oligonucleótidos, PCR en punto final	53
5.8.2.3 Evaluación de la expresión diferenciada de genes por RT-PCR	54
5.8.2.3.1 Cultivo de células bajo condiciones de estrés con pH ácido y alcalino	54
5.8.2.3.2 Extracción de RNA total	55
5.8.2.3.3 Obtención de cDNA por retrotranscripción (RT-PCR)	56
5.8.2.3.4 PCR en Tiempo Real o PCR cuantitativa (qPCR)	56
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
6.1 Cepas de trabajo	58
6.2 Identificación a nivel de especie de las cepas de <i>Streptococcus</i> spp. aisladas de pozol por secuenciación del gen de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (<i>sodA</i>) ..	58
6.2.1 Obtención de la secuencia del gen <i>sodA</i>	58
6.2.1.1 Extracción de DNA y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	58
6.2.1.2 Determinación de la pureza de los fragmentos del gen <i>sodA</i> amplificados y cálculo de la concentración	59
6.2.2 Secuenciación del fragmento de <i>sodA</i> con el oligos d1 e identificación de las cepas de <i>Streptococcus</i> spp. aisladas de pozol a nivel de especie	60
6.2.2.1 Procesamiento de la información para su interpretación	60
6.2.2.2 Elaboración de dendrograma con secuencias del gen <i>sodA</i> de <i>Streptococcus</i> spp. utilizando el método de Neighbor-Joining	62
6.3 Determinación semicuantitativa del potencial amilolítico y xilanolítico de cepas de <i>Streptococcus</i> spp. aisladas de pozol	65
6.4 Determinación de la capacidad de cepas de <i>Streptococcus</i> spp. aisladas de pozol para fermentar lactosa	66
6.5 Cinética de crecimiento de cepas de <i>Streptococcus</i> spp. aisladas de pozol en medio APT	67

6.5.1 Determinación de la velocidad específica de crecimiento de cepas de <i>Streptococcus</i> spp. aisladas de pozol en medio APT a 30° C	69
6.6 Estudio de la supervivencia bacteriana como respuesta a estrés	70
6.6.1. Efecto del pH en <i>Sii-25124</i>	70
6.6.1.1 Determinación de los valores cardinales de pH	70
6.6.1.2.1 Efecto del pH ácido en la supervivencia (acid killing test) y en la inducción de respuesta de tolerancia a la acidez en <i>Sii-25124</i>	74
6.6.1.2.2 Efecto del pH ácido en la supervivencia de <i>Sii-25124</i> (acid killing test) con células lavadas	77
6.6.2 Comparación del desarrollo de cepas de <i>Streptococcus</i> spp. aisladas de pozol en los valores de pH umbral para <i>Sii-25124</i> : cinética de crecimiento en pH 3.6, 4.0 y 12.0	79
6.6.3 Efecto de altas temperaturas sobre <i>Sii-25124</i>	82
6.6.3.1 Determinación del potencial de termotolerancia	82
6.6.4 Protección cruzada a pH ácido y a pH alcalino inducida por choque térmico ...	85
6.7 Estudio de la expresión diferenciada de genes ante la respuesta a estrés	87
6.7.1 Búsqueda de genes relacionados con estrés en el genoma de <i>Sii-25124</i>	87
6.7.2 Efecto del estrés por pH sobre la expresión de genes	91
6.7.2.1 Diseño de oligonucleótidos especie-específicos para genes de respuesta general y respuesta específica a estrés	91
6.7.2.2 Validación <i>in vitro</i> de oligonucleótidos, PCR en punto final	92
6.7.2.3 Evaluación de la expresión diferenciada de genes por qPCR	93
6.7.2.3.1 Extracción de RNA total y determinación de la concentración	93
6.7.2.3.2 Obtención de cDNA por retrotranscripción	93
6.7.2.3.3 PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR)	94
7. CONCLUSIONES	100
8. REFERENCIAS	102
ANEXO A. PREPARACIÓN DE MEDIO MRS ALMIDÓN (MRSA)	117
ANEXO B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA	117
ANEXO C. DISEÑO DE OLIGOS	120
ANEXO D. Características generales de las cepas de trabajo identificadas previamente como <i>Streptococcus</i> spp.	125

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Ejemplos de alimentos fermentados tradicionales de origen vegetal donde el género dominante es <i>Lactobacillus</i>	12
Tabla 2.	Pruebas bioquímicas para diferenciar a los estreptococos del CSBSE biotipo II.1 y II.2.....	16
Tabla 3.	Nomenclaturas aceptadas para los estreptococos pertenecientes al CSBSE y asignaciones previas	18
Tabla 4.	Características fisiológicas para diferenciar a <i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> de <i>S. bovis</i> y otros estreptococos del CSBSE	19
Tabla 5.	Modificaciones del pH de la masa de pozol al inicio y al término de la fermentación ..	22
Tabla 6.	Cepas de <i>Streptococcus</i> spp. obtenidas de pozol de Villahermosa, Tabasco	38
Tabla 7.	Concentración de reactivos utilizados para la amplificación del gen <i>sodA</i> mediante PCR	41
Tabla 8.	Cepas cuyas secuencias del gen <i>sodA</i> se utilizaron para elaborar diferentes dendrogramas	43
Tabla 9.	Genes que han mostrado expresión diferenciada ante diferentes tipos de estrés propuestos para su identificación en el genoma de <i>Sii-25124</i> y para el diseño de oligos específicos para determinar si hay variaciones en su expresión debido a estrés por pH y por temperatura	51
Tabla 10.	Concentración de reactivos utilizados en la reacción de PCR	54
Tabla 11.	Concentración del DNA amplificado con los oligos d1-d2 (<i>sodA</i>)	60
Tabla 12.	Identificación de cepas de <i>Streptococcus</i> spp. procedentes de pozol	61
Tabla 13.	Resultado de la fermentación de lactosa por parte de las cepas de <i>Streptococcus</i> spp. aisladas del pozol de Villahermosa, Tabasco	66
Tabla 14.	Velocidad específica de crecimiento estimada por biomasa de cepas de <i>Sii</i> en caldo APT, 30° C	69
Tabla 15.	Velocidades específicas de crecimiento de la cepa <i>Sii-25124</i> en caldo APT ajustado a diferentes valores de pH e incubado a 30° C	71
Tabla 16.	Valores cardinales de pH para diferentes bacterias ácido lácticas comunes en fermentaciones tradicionales y <i>Sii-25124</i>	72
Tabla 17.	Valores de pH de diferentes productos fermentados tradicionales elaborados a base de maíz y leche de camella	74
Tabla 18.	Porcentaje de supervivencia de diferentes bacterias ante prueba de reto con pH bajo previamente adaptadas y no adaptadas a condiciones menos drásticas de pH	76
Tabla 19.	Comparación del efecto cruzado de las variables pH de adaptación y tiempo de exposición a pH 3.6 en la supervivencia de la cepa <i>Sii-25124</i>	78
Tabla 20.	Contraste de la Dosis efectiva más probable de la cepa <i>Sii-25124</i> a 56 y 62° C, <i>Sth-19258</i> a 62° C y valores D para diferentes bacterias	85
Tabla 21.	Comparación del efecto cruzado de las variables pH de reto (3.6, 10.5), tratamiento térmico (con choque térmico a 62° C, sin choque térmico a 30° C) y tiempo de exposición en pH modificado (tiempos 5, 15, 30 y 60 minutos)	87
Tabla 22.	Resultados del blast contra la base de datos del NCBI realizado para las secuencias predichas con el servidor RAST para los genes <i>atpB</i> , <i>dnaK</i> , <i>groEL</i> y <i>ptsG</i> en el <i>draft</i> del genoma de <i>Sii-25124</i>	89
Tabla 23.	Oligonucleótidos diseñados para la evaluación de la expresión diferenciada de genes de <i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> cepa 25124 en condiciones ácidas (pH 3.6, 4.0) y alcalinas (pH 10.0)	92
Tabla 24.	Concentración y pureza del RNA total extraído de células de <i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> cepa 25124 expuestas a estrés	93

Tabla 25.	Concentración y pureza del cDNA obtenido a partir del RNA total extraído de células de <i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> cepa 25124 expuestas a estrés	93
Tabla A.1.	Composición del medio MRSA	117
Tabla B.1.1.	Análisis de varianza para identificar diferencia significativa en el porcentaje de supervivencia de <i>Sii-25124</i> adaptada a diferentes valores de pH y expuestas a pH 3.6 considerando las variables: pH y tiempo	117
Tabla B.1.2.	Resultado de las pruebas de rango múltiple para la cepa <i>Sii-25124</i> en caldo APT ajustado a diferentes valores de pH y el tiempo de exposición a pH 3.6 tras la adaptación, para la comparación del efecto cruzado de las variables	118
Tabla B.2.1.	Análisis de varianza para identificar diferencia significativa en el porcentaje de supervivencia de <i>Sii-25124</i> tras choque térmico y posteriormente expuesta a pH 3.6 y pH 10.5 considerando las variables: pH, y tiempo	119
Tabla B.2.2.	Resultado de las pruebas de rango múltiple para determinar la inducción de ATR o AITR por choque térmico, comparando con células sin choque térmico, por medio de la supervivencia de <i>Sii-25124</i> durante diferentes tiempos de exposición a las condiciones de pH modificado	120
Tabla C.2.	Información adicional sobre los oligos dirigidos a los genes <i>atpB</i> , <i>dnaK</i> , <i>groEL</i> y basados en el <i>draft</i> del genoma de <i>Sii-25124</i>	124

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Grupos indígenas que consumen pozol de manera regular, éstos habitan en el sur de México en los estados de Campeche, Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán	4
Figura 2.	Elaboración del pozol	5
Figura 3.	Proceso tradicional de nixtamalización	8
Figura 4.	Distribución relativa de especies del género <i>Streptococcus</i> entre la población evaluada en el Human Microbiome Project	15
Figura 5.	Representación esquemática del grado de estrés y efecto general en la población microbiana ante condiciones ambientales, físicas o químicas, por debajo de las condiciones óptimas de crecimiento	24
Figura 6.	Estructura de la F ₁ F ₀ -ATPasa y esquematización del flujo de protones hacia el interior de la célula con la consecuente producción de ATP generado por la fuerza protomotriz, comportándose como ATPsintasa	26
Figura 7.	Modelo del plegamiento de polipéptidos por la actividad en colaboración de la proteína de choque térmico DnaK junto con DnaJ y GrpE	30
Figura 8.	Sistema fosfotransferasa fosfoenolpiruvato dependiente, participa en la represión catabólica por carbono	32
Figura 9.	Síntesis de la estrategia metodológica para el estudio del comportamiento fisiológico de las cepas de <i>Streptococcus</i> spp. y <i>Sii-25124</i> aislados del pozol ante diferentes condiciones	36
Figura 10.	Estrategia metodológica para la evaluación de la expresión diferenciada de genes asociados a la respuesta general al estrés en <i>Sii-25124</i> , evaluados ante pH ácido y alcalino	37
Figura 11.	Ejemplo de gel de agarosa donde se aprecia la separación electroforética de los productos de PCR utilizando los oligos d1-d2 (480 bp), dirigidos al gen <i>sodA</i>	58
Figura 12.	Gel de agarosa al 1.5% utilizado para calcular la concentración de DNA	59
Figura 13.	Dendrograma generado por NJ basado en el gen <i>sodA</i> de cepas de <i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> aisladas de pozol, otros estreptococos, y cepas de géneros relacionados y no relacionados	63
Figura 14.	Diámetro de los halos de degradación (cm) obtenidos para la determinación de la actividad amilolítica y xilanolítica de cepas de <i>Sii</i> aisladas de pozol	65
Figura 15.	Cinéticas de crecimiento de cepas de <i>Streptococcus</i> spp. aisladas de pozol, en caldo APT incubado a 30° C	68
Figura 16.	Crecimiento de la cepa <i>Sii-25124</i> en caldo APT ajustado a diferentes valores de pH e incubado a 30° C.....	71
Figura 17.	Supervivencia de la cepa <i>Sii-25124</i> ante prueba de reto	75
Figura 18.	Inducción de ATR en <i>Sii-25124</i> tras su adaptación durante 5 h a 30° C en caldo APT ajustado a pH ácido de 4.0 y a valores alcalinos de pH 10.0 y 11.0	78
Figura 19.	Modificación de la DO ₆₀₀ de cultivos de cepas de <i>Sii</i> aisladas de pozol en caldo APT ajustado a A. pH 4.0 con ácido láctico y B. pH 12.0 con NaOH. El crecimiento se refleja en el incremento de la DO ₆₀₀ confirmado con la viabilidad de la cepa	80
Figura 20.	Cinética de supervivencia de la cepa <i>Sii-25124</i> incubada a 50, 56 y 62° C contrastando con la cepa <i>S. thermophilus</i> ATCC 19258, considerada termotolerante, incubada a 62° C; para ambas cepas la temperatura control 30° C	82
Figura 21.	Determinación de la curva de termodestrucción para las cepas <i>Sii-25124</i> a 56 y 62°C y <i>Sth-19258</i> a 62° C	84
Figura 22.	Supervivencia de cultivos de <i>Sii-25124</i> que fueron sometidos a choque térmico o sin choque y posteriormente fueron expuestos a medio con pH de reto.....	86
Figura 23.	Visualización del contexto genómico del gen <i>atpB</i> obtenido por medio del servidor RAST	88

Figura 24. Alineamiento múltiple de secuencias del gen <i>aptB</i> que codifica para la subunidad a del sector F ₀ de la F ₁ F ₀ -ATPasa realizado utilizando la opción ClustalW del software BioEdit	90
Figura 25. Dendrograma generado por NJ basado en datos obtenidos del <i>draft</i> del genoma de <i>Sii-25124</i> (identificado como fig 6666666.115479 [Streptococcus sp]) para el gen <i>atpB</i>	91
Figura 26. Amplificados obtenido por medio de PCR utilizando los oligos diseñados dirigidos a los genes <i>atpB</i> , <i>dnaK</i> , <i>groEL</i> y <i>ptsG</i>	92
Figura 27. Expresión diferenciada de genes	99
Fig. C.1.1.1. Visualización del contexto genómico del gen <i>dnaK</i> obtenido por medio del servidor RAST	121
Fig. C.1.1.2. Visualización del contexto genómico del gen <i>groEL</i> obtenido por medio del servidor RAST	121
Fig. C.1.1.3. Visualización del contexto genómico del gen <i>ptsG</i> obtenido por medio del servidor RAST	122
Fig. C.1.2.1. Dendrograma generado por NJ basado en datos obtenidos del <i>draft</i> del genoma de <i>Sii-25124</i> para el gen <i>dnaK</i>	123
Fig. C.1.2.2. Dendrograma generado por NJ basado en datos obtenidos del <i>draft</i> del genoma de <i>Sii-25124</i> para el gen <i>groEL</i>	123
Fig. C.1.2.3. Dendrograma generado por NJ basado en datos obtenidos del <i>draft</i> del genoma de <i>Sii-25124</i> para el gen <i>ptsG</i>	124

Reconocimientos

Esta tesis doctoral se llevó a cabo en laboratorio L-324 del Dpto. de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM, bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte.

Agradecemos al proyecto PAPIIT/UNAM: IN223917, a CONACyT por la beca del Programa Nacional de Posgrado: 344938, al proyecto a CONACyT CB-2013-131615 y al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado por el recurso brindado para la participación y presentación de este trabajo en el 115th General Meeting de la American Society for Microbiology.

Se agradece la colaboración de:

Dra. Teresita Sainz Espuñes por el apoyo para efectuar el estudio de la expresión diferenciada de genes en el laboratorio a su cargo, Departamento de Sistemas Biológicos de la División de CBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

Dra. Rebeca Ramírez por la asistencia para acceder al programa para efectuar el análisis estadístico y sus comentarios para enriquecer el análisis.

Dra. Gloria Díaz-Ruiz por su apoyo a lo largo del tiempo invertido en este trabajo.

Al Dr. Lenin Domínguez-Ramírez por su apoyo en las revisiones críticas del manuscrito para la publicación del artículo original producto de este trabajo.

Al jurado asignado:

- Presidente: Dra. Amelia Farrés González Sarabia (Facultad de Química, UNAM)
- Vocal: Dra. Dolores Reyes Duarte (UAM Cuajimalpa)
- Vocal: Dr. Francisco Ruiz Terán (Facultad de Química, UNAM)
- Vocal: Dr. Adelfo Escalante Lozada (Instituto de Biotecnología, UNAM)
- Secretario: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch (Facultad de Química, UNAM)

Agradecimientos especiales

Un agradecimiento muy especial a mis muy queridos amigos y a la Dra. Perla Castañeda por el apoyo emocional y las palabras de aliento que me han dado un gran empujón cuántico de motivación para esforzarme otro poco más y lograr cumplir con las últimas metas: publicar el artículo original y pulir la Tesis.

Agradezco también a Bárbara y a Marisol, quienes también han recorrido este camino conmigo y que han tropezado casi con las mismas piedras que yo. Gracias por el apoyo y la comprensión, por las experiencias compartidas y por todos los momentos y el aprendizaje que compartimos.

También a las Dras. Carmen y Gloria y a los compañeros del laboratorio L-324 que contribuyeron en nutrir mi entusiasmo por la investigación y el compartir el aprendizaje y el conocimiento con los demás. De verdad, espero haberles dado un buen ejemplo a los compañeros más jóvenes y haber sido buen guía para ustedes.

A mi madre, por la paciencia y el apoyo cuando parecía que topaba con pared, que jamás me presionó y por el contrario, me ayudó a no cometer errores por presionarme demasiado a mí misma. A mi hermano, Lenin y a Paulina, mi cuñada, por su apoyo constante y sus palabras de aliento. Ustedes y los pequeños Jules y Hope son maravillosos.

Gracias

☞ Gabriela Contreras, Eduardo Molina Jijon, Rocío Navarro, Leslie Anaya, Arody Rangel, Jessica Ortiz ☞

♥ Raymundo Belmont Valadez y familia, por integrarnos en un nuevo camino ♥

☼ Corazón, Colibrí y Coconita ☼

*En memoria de mis grandes amigas de cuatro patas,
mis amigas del alma: Piraña & Frambuesa.*

Y que esta Tesis sea de gran utilidad para nuestros sucesores pues he ahí el porqué he puesto tanto empeño en ella. Que sea clara y de gran valor por la información que contiene y que les ayude a ampliar sus conocimientos, su potencial para investigar y aprender.

*Lila Lubianka Domínguez-Ramírez
Feliz encuentro, feliz partida, feliz reencuentro*

∪∪∪

ABREVIACIONES

%Q cob. Porcentaje de cobertura

$\Delta\psi$. Delta psi, cambio en el potencial de membrana

$\Delta\Delta Ct$. Delta delta ciclo umbral

ΔG . Delta G, cambio de energía libre de Gibbs

ΔpH . Cambio en el potencial de hidrógeno

μ . Velocidad específica de crecimiento

μg . Microgramo

μL . Microlitro

μM . Micromolar

A. Adenina

$A_{260/280}$. Cociente de la Absorbancia a 260 nm entre la Absorbancia a 280 nm

ADP. Adenosín difosfato

ADS. Sistema arginina deiminasa

AITR. Alkali tolerance response (Respuesta de tolerancia a la alcalinidad)

ANOVA. ANalysis Of VAriance (Análisis de varianza)

APT. All Purpose Tween (medio Tween Multipropósito)

ARDRA. Amplified ribosomal DNA restriction analysis (Análisis de restricción de DNA ribosómico amplificado)

ATP. Adenosín trifosfato

ATR. Acid tolerance response (Respuesta de tolerancia a la acidez)

ATTC. American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)

BAL. Bacterias ácido lácticas

BALA. Bacterias ácido lácticas amilolíticas

bp. Base pairs (pares de bases)

C. Citocina

c. Control

CCUG. Culture Collection, University of Göteborg (Colección de Cultivos de la Universidad de Göteborg)

cDNA. Complementary DNA (DNA complementario)

CIP. Collection de l'Institut Pasteur (Colección del Instituto Pasteur)

cm. Centímetros

CO₂. Dióxido de carbono

Cp. punto de cruce

Cq. Ciclo de cuantificación

CSBSE. Complejo *Streptococcus bovis/S. equinus*

CT. Choque térmico

Ct. Ciclo umbral

D₅₆ y D₆₂. Valor de reducción decimal a 56 °C y a 62 °C.

DGGE. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante)

DNA. Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

dNTP. Deoxyribonucleotide triphosphate (Desoxinucleósidos trifosfatados)

DO_{600nm}. Densidad óptica leída a 600 nm

DS. Desviación estándar

EE. UU. Estados Unidos Americanos

EFSA. European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)

EMB. Embigin (nombre de base de datos)

E-val. Valor de E

FDA. Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)

g. Gramos

G. Guanina

h. Hora

HDP. Hôtel-Dieu Paris (Centro Nacional de Referencia de Estreptococos, Francia)

Hsp Heat shock protein (Proteína de choque térmico)

I. Inosina

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (Comisión Internacional en Especificaciones Microbiológicas para Alimentos)

ICSB. International Committee on Systematic Bacteriology (Comité Internacional en Sistemática Bacteriana)

IDT. Integrated DNA Technologies (Compañía)

kDa. Kilodaltones

L. Litro

Lac. Lactosa

Ln. Logaritmo natural

M. Marcador de peso molecular

mg. Miligramo

MgCl₂. Cloruro de magnesio

MG-RAST. Metagenomics Rapid Annotation using Subsystem Technology (Anotación Rápida de Metagenómica usando Tecnología de Subsistema)

min. Minuto

mL. Mililitro

mM. Milimolar

MRS. Medio Man, Rogosa y Sharpe
MRSA. Medio Man, Rogosa y Sharpe con Almidón
MRSX. Medio Man, Rogosa y Sharpe con Xilosa
NaCl. Cloruro de sodio
NaOH. Hidróxido de sodio
NCBI. National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para Información en Biotecnología)
NCIMB. National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria (Colección Nacional de Bacterias Industriales, de Alimentos y Marinas, Reino Unido)
ng. Nanogramo
NJ. Neighbor-Joining
p/p. peso/peso
p/v. peso/volumen
PCR. Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PEP-PTS. Phosphoenolpyruvate Phosphotransferase System (Sistema fosfotransferasa fosfoenolpiruvato)
pH. Potencial de hidrógeno
pKa. logaritmo negativo (-log) de la constante de disociación ácida (Ka)
pmol. Picomol
PTS. Phosphotransferase System (Sistema fosfotransferasa)
QPS. Qualified Presumption of Safety (Calificado con Presunción de Seguridad)
R. Adenina o guanina
RAST. Rapid Annotation using Subsystem Technology (Anotación Rápida usando Tecnología de Sistemas)
RNA. Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)
rpm. Revoluciones por minuto
rRNA. Ribosomal Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico ribosomal)
RT-qPCR. Quantitative reverse transcription PCR (PCR cuantitativa)
s. segundo
S. th. *Streptococcus thermophilus*
Sgg. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*
Sgm. *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus*
Sii. *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*
SOD-Mn. Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
SSI. Solución Salina Isotónica
t. Tiempo

T. Timina

Tm. Temperatura de desnaturalización

TOP. Punto de arranque

U. Unidades

UFC. Unidades formadoras de colonias

UNAM. Universidad Nacional Autónoma de México

UV-Vis. Ultra Violeta Visible

V. Volt

v/v. volumen/volumen

VBNC. Viable but non-culturable (estado viable pero no cultivable)

Y. Citosina o timina

RESUMEN

Streptococcus infantarius subsp. *infantarius* (*Sii*) es parte de la microbiota del pozol, bebida tradicional del sureste de México elaborado con masa de maíz fermentada que se suspende en agua. Esta masa fermentada se diferencia de otros alimentos similares ya que los granos usados para su preparación son nixtamalizados. Este tratamiento térmico-alkalino genera modificaciones en diferentes propiedades del maíz y favorece el desarrollo selectivo de algunos microorganismos, dando forma a la microbiota particular del pozol. Aquellos microorganismos capaces de desarrollarse en las condiciones previas a la fermentación, tal vez por su inoculación durante la molienda, y que puedan adaptarse a las condiciones cambiantes del nicho durante la fermentación, tendrán posibilidades para persistir en la masa incluso cuando se acidifique.

Considerando lo anterior, se evaluó el efecto del estrés ácido, alcalino y térmico en la tolerancia a la acidez de *Sii*-25124, cepa aislada de pozol. Esto se llevó a cabo en caldo APT al ser un medio comercial que es de manipulación menos compleja comparando con masa de nixtamal, y así efectuar un primer acercamiento para estudiar su adaptación al nicho en el que se presentan principalmente cambios de pH y, hasta cierto punto, de temperatura. Como resultado de esto, se observó que el crecimiento de *Sii*-25124 es evidente en un amplio rango de valores de pH, con un pH mínimo de crecimiento de 4.0, pH óptimo de 8.0 y pH máximo de crecimiento de 11.0. Asimismo, mostró tolerancia a la alcalinidad, la cual no presentaron otras cepas de *Sii* aisladas de pozol (*Sii*-1, *Sii*-50.21, *Sii*-50.31, *Sii*-84.31, *Sii*-92.1, *Sii*-107.1). Igualmente, se indujo una respuesta de tolerancia a la acidez (ATR) en *Sii*-25124 que mejoró significativamente su supervivencia en condiciones letales de pH (3.6) tras su adaptación en pH 4.0, 10.0 y 11.0, comparando con células no adaptadas ($P < 0.05$). Esta inducción de ATR no se observó como resultado de choque térmico (62 °C, 2 min), sin embargo, este estímulo indujo tolerancia a la alcalinidad (AITR), mejorando la supervivencia de forma significativa en pH 10.5 ($P < 0.05$). Este efecto de protección cruzada sugiere un traslape de mecanismos implicados en la respuesta a estrés, por lo que los genes *dnaK*, *groEL*, *ptsG* y *atpB*, fueron evaluados por RT-qPCR. Con ello se observó que los 4 genes se sobre-expresan tras 5 h de exposición a pH 3.6, 4.0 y 10.0 con niveles muy similares a los observados tras la inducción con pH ácido letal y por pH alcalino subletal. Los cambios más destacados corresponden al gen *atpB*, inducido por ambos valores de pH y que alcanzó un nivel de expresión de casi 5 unidades en ambos casos, con una exposición de 5 h. Los resultados sugieren que el estrés térmico y los cambios de pH son condiciones selectivas que, dadas las ventajas adaptativas que *Sii*-25124 mostró en las pruebas de reto, le permiten persistir incluso si el pH disminuye a valores ácidos cercanos a 4.0 durante la fermentación. Con ello se comprende el hecho de que se encuentre desde el inicio hasta el término de este proceso.

Comportamiento de cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol ante la temperatura alta y el pH bajo presentes durante la elaboración de la masa y durante su fermentación

1. ANTECEDENTES

1.1 Introducción

Algunas especies del género *Streptococcus* como lo son *S. thermophilus* y miembros del complejo *S. bovis/S. equinus* (CSBSE) tales como *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*, *S. infantarius* subsp. *infantarius* (*Sii*), y algunas cepas que aún están sólo identificadas como *S. bovis/S. equinus*, tienen un papel importante en el área de los alimentos. Participan con sus procesos fermentativos en la acidificación del yogurt, maduración de quesos y en la obtención de diversos alimentos tradicionales [Tsakalidou *et al.*, 1998; Díaz-Ruiz *et al.*, 2003; Madigan *et al.*, 2004; Pacini *et al.*, 2006; Rashid *et al.*, 2007; Abdelgadir *et al.*, 2008; Wullschleger *et al.*, 2013; Renye *et al.*, 2011; Jans *et al.*, 2012a; Mukisa *et al.*, 2012; Jans *et al.*, 2013b]. De éstos, *S. thermophilus* ha sido estudiado ampliamente y es un modelo relevante, es fundamental en la fermentación de productos lácteos. Cepas de esta especie tales como *S. thermophilus* Th4 (antes *S. thermophilus* DSM15957) tienen el reconocimiento como seguros para su uso en alimentos: GRAS (Generally Recognized as Safe), otorgado por la FDA (Food and Drug Administration; GRN 000049, U.S. FDA, 2002) de EE. UU. y QPS (Qualified Presumption of Safety) por la EFSA (European Food Safety Authority) de la Unión Europea [FDA, 2002; Anónimo, 2007].

Por su parte, *Sii* ha adquirido importancia en los alimentos fermentados debido a su aislamiento e identificación recurrente en productos lácteos tradicionales africanos [Bouvet *et al.*, 1997; Tsakalidou *et al.*, 1998; Jans *et al.*, 2012a, 2013b]. Y también por la obtención de la secuencia genómica completa de la cepa CJ18 aislada de *suusac* (leche de camella fermentada), que mostró un operón *gal-lac* ausente en otros miembros del CSBSE además de características de crecimiento en lactosa similares a *S. thermophilus* que sugieren una adaptación a su nicho [Jans *et al.*, 2012b, 2012c]. Así como por los estudios más recientes con relación con posible uso de las variantes africanas con fines biotecnológicos al ser definidas como parte de un linaje grado alimenticio (*food-grade*) de esta especie [Jans *et al.*, 2017; Kaindi *et al.*, 2018].

Gracias a los métodos moleculares también se ha detectado al género *Streptococcus* de forma recurrente en diferentes etapas de la fermentación del pozol de Villahermosa, Tabasco, en masas de diferentes productores y en diferentes muestreos [Ben Omar & Ampe, 2000; Díaz-Ruiz *et al.*, 2003; Bolaños, 2004; López, 2006; Becerril-Sánchez, 2012]. Asimismo, a través de la cuantificación del rRNA total obtenido de masa de pozol se ha estimado que los estreptococos representan del 25 al 75% de la población total de bacterias ácido lácticas (BAL) en este producto [Ben Omar & Ampe, 2000].

Los métodos cultivo dependientes han permitido aislarlos e identificarlos a nivel de género o especie [Díaz-Ruiz *et al.*, 2003; Rodríguez-Navarro & Villalva-Fuentes, 2010; Becerril-Sánchez, 2012]. Como parte de este trabajo, varias cepas aisladas han sido identificadas como *Sii* pues anteriormente, en su mayoría, sólo habían sido identificadas a nivel de género o como *S. bovis* [Becerril-Sánchez, 2012]. En el caso de la cepa *Sii*-25124, se identificó como *S.bovis/S. infantarius* subsp. *coli* al tener 99% de similitud con la secuencia del gen 16S rRNA de estas especies [Díaz-Ruiz *et al.*, 2003] y posteriormente fue identificado como *S. infantarius* subsp. *infantarius* al tener 100% de similitud con la secuencia del gen *sodA* de éste, destacando por parecer parte de la microbiota nativa del pozol al ser recurrente su aislamiento.

La importancia de la continua identificación de *Sii* como parte de la microbiota responsable de la fermentación de estos alimentos contrasta con el origen del primer aislamiento e identificación de esta bacteria. La cepa tipo proviene de las deposiciones de un bebé sano (Reino Unido, 1949), al parecer presente en tracto gastrointestinal como comensal (cepa NCIMB¹ 700599). Si bien, aunque su potencial patogénico no está del todo claro, se ha reportado su aislamiento a partir de muestras de sangre y se ha asociado con cuadros de endocarditis [Schlegel *et al.*, 2000; Beck *et al.*, 2008]; la cepa *Sii* HDP 98426 [Schlegel *et al.*, 2003] posee proteínas proinflamatorias [Biarç *et al.*, 2004] y esta subespecie también se ha asociado a casos de bacteremia y cáncer de páncreas, del ducto biliar y colorectal [Correidora *et al.*, 2008].

¹ NCIMB, National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria, antes National Collection of Dairy Organisms (NCDO), Escocia, Reino Unido.

Si bien, los aislados clínicos de *Sii* son raros [Correidora et al., 2008; Correidora et al., 2014; Lazarovitch et al., 2013], también existe la posibilidad de que se trate de una identificación errónea. La falta de resolución para discriminar entre las diferentes especies del CSBSE como *S. gallolyticus* y *S. infantarius* e incluso discriminar entre subespecies como *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Sgg*), *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, al igual que *S. infantarius* subsp. *coli* (actualmente más aceptado como *S. lutetiensis*) y *S. infantarius* subsp. *infantarius*, es un problema. Todos ellos han sido asociados a casos de bacteremia que puede derivar a endocarditis, cáncer, tumores o procesos inflamatorios en el colon, problemas en el ducto biliar, etc. pero se ha reconocido que es principalmente *Sgg* la especie más recurrente en estos casos y no *Sii* [Correidora et al., 2008; Boleij et al., 2009, 2011; Lazarovitch et al., 2013]. Aunque, se ha llegado a formalizar la idea de que es una bacteria oportunista [Kaindi et al., 2018].

Por otro lado, *Sii* ha sido también aislado de chícharos congelados [Schlegel et al., 2000], de alimentos fermentados de forma tradicional como productos lácteos africanos: *gariss* y *suusac* (camella), *fenè*, *mala* y *roab* (vaca) y del *dahi* (vaca y/o búfalo) hindú [Bouvet et al., 1997; Tsakalidou et al., 1998; Abdelgadir et al., 2008; Hamza et al., 2009; Rashid et al., 2007; Wullschleger et al., 2013; Jans et al., 2012a, 2013b]; de cereales fermentados como el *obushera* (mijo y/o sorgo malteado o sin maltear, África) [Mukisa et al., 2012] y del *pozol* (masa de maíz nixtamalizado, México) [Díaz-Ruiz et al., 2003], aunque su estatus como posible patobionte no se descarta [Kaindi et al., 2018]. Estas BAL contribuyen con la fermentación y existe la posibilidad de que generen bacteriocinas o compuestos tipo bacteriocinas con actividad antimicrobiana contra otras BAL, bacterias asociadas a la descomposición de alimentos y/o patógenos [Rashid et al., 2009; Jans et al., 2012a], así como otros metabolitos propios de las BAL que ayudan a mejorar la calidad del alimento y a extender su vida de anaquel.

De esta manera, su potencial como patógeno oportunista o posible patobionte [Kaindi et al., 2018], y la presencia constante de esta bacteria en diferentes alimentos fermentados tradicionales con una demanda importante en sus localidades, aparentemente sin afectar al consumidor, genera interés en estudiar más profundamente diferentes aspectos de su fisiología, desde la respuesta al estrés que se genera durante la producción y procesamiento del alimento y/o en el hospedero, así como profundizar en su potencial patogénico y sus

similitudes o diferencias respecto a las variantes africanas propuestas como *food-grade linages* [Kaindi *et al.*, 2018].

Para los fines de este proyecto, lo más relevante es comprender algunas de las particularidades fisiológicas de las bacterias aisladas de pozol. Esto puede hablarnos de características que les confieren ventaja en el nicho. Considerando el método de preparación de este producto fermentado se cree que la adaptación a estrés generado por modificaciones del pH (masa ligeramente alcalina o con pH cercano a la neutralidad y que durante la fermentación se acidifica) y/o la respuesta adaptativa a las condiciones de acidez de la fermentación, son claves para que esta bacteria sea capaz de colonizar el nicho, predominar en etapas tempranas de la fermentación y persistir hasta el término de ésta. Marcando con ello las diferencias de este alimento respecto a otros nichos a los que *Sii* ha sido asociado (a mamíferos como comensal y presente en leches fermentadas) y diferenciando al pozol de otros alimentos fermentados elaborados con maíz sin nixtamalizar (proceso aplicado para el grano de maíz para pozol).

1.2 El Pozol

El maíz es la base de la alimentación de los pueblos americanos y el pozol, una bebida fermentada ácida y no alcohólica de origen maya que es elaborada con nixtamal, es claro ejemplo de las formas en que puede ser consumido.

La palabra *pozol* deriva de la voz náhuatl *pozolli*, espumoso. Es un alimento-bebida tradicional preparado con masa de maíz nixtamalizado (nixtamal), envuelta en hoja de plátano para su fermentación y luego es disgregada en agua para obtener la bebida. Ésta es típica de las regiones mayas del sur de México donde su elaboración es casera. Su consumo se aprecia principalmente en: Campeche, Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco, Yucatán y, en menor medida, el sur de Veracruz [Ulloa *et al.*, 1987; Cañas *et al.*, 1993a, 1993b; Wacher *et al.*, 2000]. Además, tiene aceptación tanto entre la población indígena así como entre los mestizos y ha sido consumido desde épocas prehispánicas. Algunos de los grupos indígenas que consumen esta bebida y que habitan las regiones mencionadas (Figura 1) son: chontales, choles, mayas, mayas-lacandones, tzeltales, tzotziles, zoques, tojolabales, mames y zapotecos. Asimismo, no sólo es un alimento-bebida altamente

energético, el pozol tiene otros usos: sanar heridas o infecciones cutáneas superficiales, controlar la diarrea, reducir fiebres (como cuentan las leyendas de Campeche en torno al *hanincol*, “comida de milpa” ceremonial para curar a un enfermo [Remolina *et al.*, 2015]) y además con fines rituales como ofrenda en ceremonias en diferentes etapas del cultivo del maíz [Ulloa *et al.*, 1983; Escamilla-Hurtado & Mozqueda-González; 1992; Wachter, 1995].

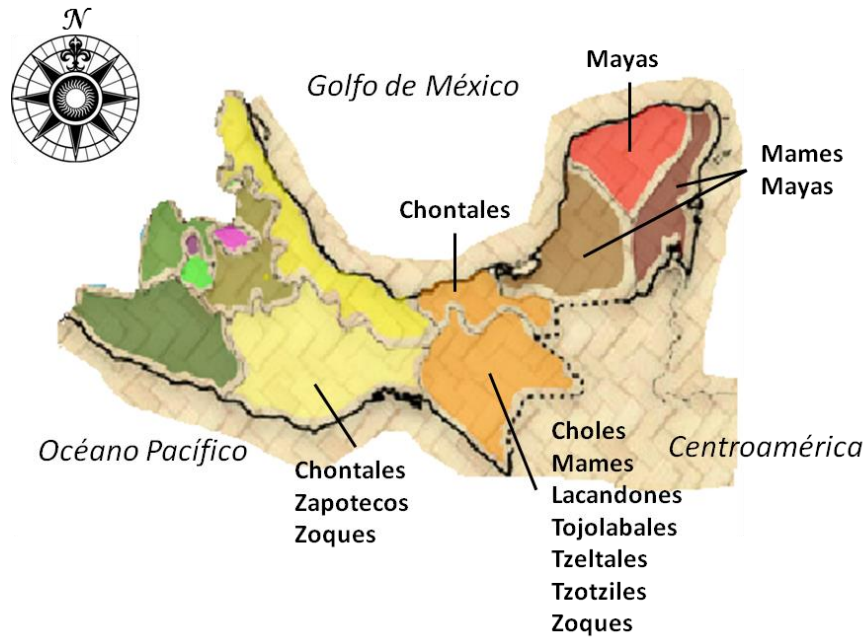


Figura 1. Grupos indígenas que consumen pozol de manera regular, éstos habitan en el sur de México en los estados de Campeche, Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán. Imagen elaborada con información del Atlas de los Pueblos Indígenas de México, Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas [Instituto Nacional de los Pueblos Indígenas de México, 2020].

La elaboración del pozol es sencilla y económica, no requiere el uso de equipo costoso o sofisticado e involucra materia prima de bajo costo y de gran disponibilidad, por lo que se entiende la facilidad para realizar el proceso de forma casera.

Considerando la zona de los Altos de Chiapas, se han descrito 2 variedades principales de pozol de acuerdo con el proceso de elaboración y son los denominados variedad indígena y el *ladino* o mestizo. De éstos, Cañas *et al.* (1993a, 1993b) describieron las etapas de elaboración, algunas ilustradas en la Figura 2, como sigue:

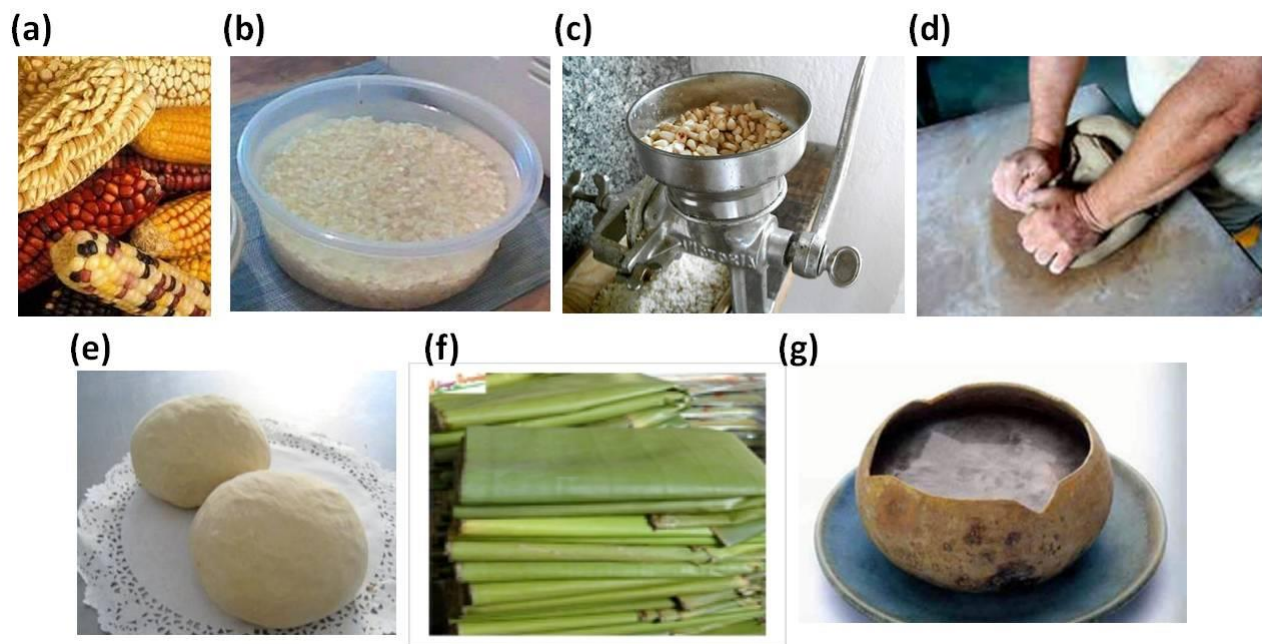


Figura 2. Elaboración del pozol: (a) materia prima, maíz; (b) remojo; nixtamalización (no incluida en la imagen); (c) molienda del grano de maíz después de la nixtamalización, este es un ejemplo de los molinos de mano utilizados para obtener la masa; (d) amasado y formación de (e) bolas de masa que se envuelven en (f) hojas de plátano que ayudan a mantener la humedad. Se deja reposar para que se lleve a cabo la fermentación y finalmente la bola de masa se disgrega en agua para obtener la tradicional bebida: (g) pozol servido en jícara.

A. Selección de materia prima. Maíz blanco, amarillo o negro desgranado y seco.

B. Para la limpieza del maíz crudo los granos se ponen a remojar cubriéndolos con agua y se retiran manualmente los materiales que floten en la superficie, éstos suelen ser: maíz picado, granos podridos y cascarillas.

C. Nixtamalización. Es un tratamiento térmico en condiciones alcalinas. Los granos de maíz se cuecen en agua con cal (cerca del 1% p/p), de 60 a 120 minutos, hasta que se hinchan y se desprende el pericarpio (cáscara o cascarilla que recubre el grano, también se le llama hollejo), esto ayuda a que al friccionar los granos entre los dedos los hollejos se remuevan con facilidad.

D. Lavado del grano nixtamalizado. Para eliminar remanentes de cal, los granos se enjuagan con abundante agua y se frotran entre las manos hasta que el agua de lavado sale transparente. Con esto también se eliminan los hollejos remanentes. Si no se hace un buen lavado, los restos de cal hacen que el nixtamal adquiera un sabor picante.

E. *Reventado* o segunda cocción. Consiste en cocer el grano ya nixtamalizado en agua hasta *reventar* o *florear* (entre 3 a 8 h). Este paso se lleva a cabo sólo en el proceso mestizo para evitar la formación de *chincastito* que ocurre al resuspender la masa en agua. Al quedar presentes componentes fibrosos que no pueden solubilizarse por completo durante la nixtamalización, éstos tienden a sedimentarse. Este sedimento, de consistencia chiclosa (*chincastito*), no resulta muy grato para ciertos paladares y, al parecer, por esta razón la población mestiza ha modificado el proceso indígena original para así disminuirlo o eliminarlo con esta segunda cocción, obteniéndose el pozol *ladino* o mestizo [Wacher et al., 2000].

F. Remojo. El pozol indígena se remoja en el agua fría del último lavado del grano nixtamalizado y en el caso de la variedad mestiza, en el agua caliente del reventado. Esta etapa dura generalmente toda la noche (alrededor de 12 h para evitar que se seque durante la molienda). De esta forma se favorece que el grano absorba agua. Sin embargo, hay regiones de Tabasco en que este paso es omitido, haciendo que el grano esté aún caliente al iniciar la molienda o, al no haber sido lavado completamente, mantenga restos de cal.

G. Molienda. De acuerdo a la variedad de pozol que se prepare, la molienda se puede efectuar al día siguiente del reventado o tras la nixtamalización. Esta etapa se lleva a cabo en molinos de mano o de nixtamal, en algunos casos aún llega a utilizarse el metate para hacer la molienda en casa. Cabe mencionar que el resultado no es una masa homogénea como el de la masa de tortilla ni tan fina como para preparar atole, es más bien una molienda gruesa en la que es posible observar aún fragmentos de endospermo y germen del grano, así como remanentes de pericarpio y pedículo.

H. Elaboración de bolas de masa. El producto obtenido de la molienda se amasa para formar bolas a mano y en ocasiones apoyándose sobre una superficie plana como una mesa (*pellar* es el nombre que se le da a la bola de masa de pozol). Para mantener la humedad, las bolas de masa se envuelven en hojas de plátano y se dejan reposar para su fermentación.

I. Fermentación. La mayor parte de los consumidores prefieren beber el pozol elaborado durante el día, aunque con cierto grado de fermentación (cerca de 8 horas). Otras personas prefieren dejar fermentar durante 4 o 5 días e incluso dos semanas o más. La fermentación se lleva a cabo a temperatura ambiente y transcurre mientras la masa está envuelta en las hojas de plátano.

Finalmente, para la preparación de la bebida, una bola de masa se disgrega en agua y con ello se obtiene una bebida turbia, no del todo homogénea, de sabor ácido y, de acuerdo a la región, se puede beber sólo o se le puede adicionar sal, chile, azúcar o miel, entre otros ingredientes [Ulloa *et al.*, 1983;1987].

1.2.1 Proceso de nixtamalización

La nixtamalización es un proceso utilizado para tratar el grano de maíz que se remonta a la época prehispánica, encontrándose evidencia arqueológica de cerámicas asociadas con el uso para este proceso que muestran adhesiones de cal. Éstas fueron halladas en la zona maya de Salinas la Blanca, Guatemala, y datan de los años 1000 al 800 a. C.

La palabra *nextli* es un vocablo náhuatl y significa ceniza de cal, junto con el vocablo *tamalli*, masa de maíz cocido, conforman la palabra *nixtamal*: masa de maíz cocido con ceniza de cal [Sánchez-Tovar, 2007]. Este proceso involucra la cocción de los granos de maíz en una solución con cal, mayormente compuesto por hidróxido de calcio (Figura 3). Suelen utilizarse 2 cucharadas (10 a 20 g) de cal por cada kilogramo de maíz para tener una solución acuosa del 1% al 2% (p/p) [Illesca, 1943] y se pone a hervir hasta alcanzar la ebullición (entre 80 y 100° C). La cocción puede durar entre 30 a 55 minutos, posteriormente se deja en reposo en la misma agua durante 5 a 15 horas (toda la noche) [Illesca, 1943; Rangel-Meza *et al.*, 2004; Yañez, 2005]. Lo que se busca es conseguir la separación del grano de la cáscara (hollejo).

Con lo anterior, los granos se suavizan y el pericarpio se afloja. Después de permanecer en reposo, se procede al lavado del nixtamal. Primero se decanta y luego se lava de 2 a 4 veces con agua limpia, en este paso se eliminan las cubiertas seminales, cal excedente y

otras impurezas del grano [Illesca, 1943; Rangel-Meza *et al.*, 2004; Yañez, 2005]. El agua de desecho, llamada *nejayote*, lleva consigo éstas y otras impurezas.

Cabe señalar que este proceso varía localmente y cada comunidad tendrá algunas variantes a este respecto.

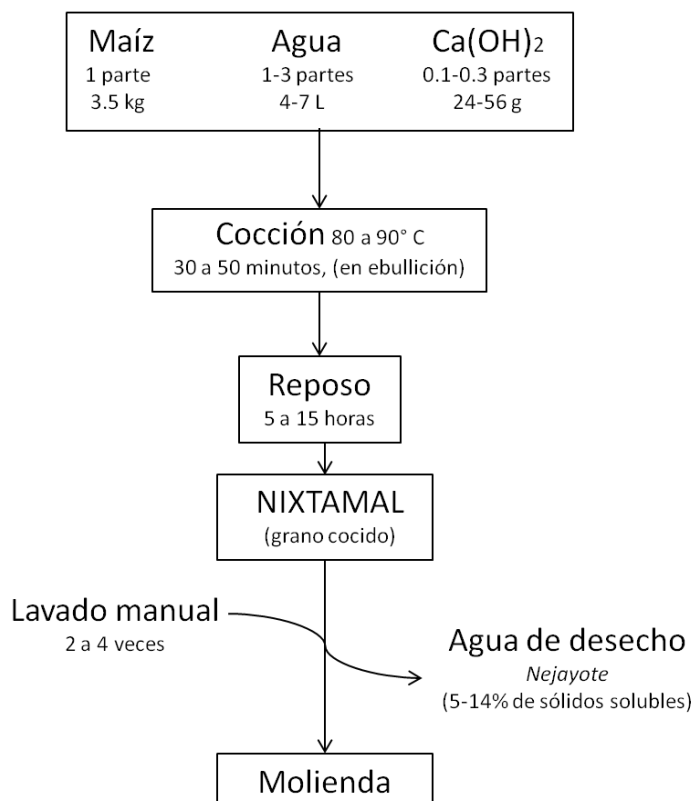


Figura 3. Proceso tradicional de nixtamalización [elaborado con información de: Illesca, 1943; Rangel-Meza *et al.*, 2004; Cortés *et al.*, 2005].

Las condiciones térmico-alcalinas de la nixtamalización, tienen un serio impacto en el desarrollo de la microbiota que puede colonizar el grano después, incluso tras el lavado, ya sea eliminando o disminuyendo las cuentas de los microorganismos o teniendo selectividad en el desarrollo de éstos; además de los cambios físico-químicos y las propiedades nutrimentales del maíz que darán sostén a los microorganismos que se desarrollarán. Posiblemente esto es lo que diferencia la microbiota presente en otros alimentos fermentados de origen vegetal o de maíz no nixtamalizado (donde mayormente predominan especies del género *Lactobacillus*) y el pozol. Así mismo, cabe mencionar que como parte de un esfuerzo para aislar e identificar a la microbiota presente en el nixtamal, se detectó la presencia de estreptococos del CSBSE con gran prevalencia. El género *Streptococcus* representó el 56% del total de los aislados [Adolphson *et al.*, 2013] pero sin llegar a identificar

a *S. bovis* a nivel de subespecie y sin usar las herramientas moleculares adecuadas para tener una mejor resolución en esta identificación. Siendo por tanto plausible que se trate de *Sii* y coincida con la capacidad de éste para ser de las primeras bacterias en colonizar el nicho y predominar en los inicios de la fermentación de la masa de pozol.

1.2.2 Origen de la microbiota natural del pozol

El origen de la microbiota del alimento tiende a ser asociada a la materia prima con que se ha elaborado, los microorganismos que han sido inoculados voluntariamente o accidentalmente durante la preparación, los que sobreviven al proceso de distribución y almacenamiento, a los procesos de conservación o por el contacto con potenciales fuentes de contaminación (material de embalaje, aire y agua, plantas, animales, equipo industrial, otros productos, etc.). De modo que, considerando el proceso de elaboración del pozol, la inoculación puede darse en cualquiera de las etapas de la elaboración de las bolas de nixtamal, siendo las posibles fuentes principales de la microbiota las siguientes:

- En menor medida el grano de maíz. Puede tratarse de bacterias mesófilas (aerobios y anaerobios), Gram-negativas (principalmente de la familia *Enterobacteriaceae*) y bacterias Gram-positivas esporuladas, como el género *Bacillus*, y no esporuladas como las BAL; en menor medida mohos y levaduras. Todos ellos comúnmente se encuentran en la superficie de los vegetales, por tanto, sería consistente encontrarlos en productos fermentados de origen vegetal [Wacher, 1995]. Si bien, esta microbiota natural puede ser mayormente eliminada durante la nixtamalización por las condiciones de temperatura y alcalinidad del tratamiento.
- Durante el remojo del grano nixtamalizado se introducen microorganismos ya que el agua (en especial si es de pozo), el contacto con el aire y el polvo, los recipientes de trabajo, el contacto con superficies o la manipulación manual contribuyen con la inoculación. Es posible que en este punto se origine la inoculación de BAL, mesófilos y enterobacterias, algunos de los cuales constituirán la microbiota dominante al inicio de la fermentación [Wacher *et al.*, 1993].

- La molienda del grano es considerada la fuente de inoculación más importante de la microbiota con capacidad para fermentar (BAL y levaduras). Esto es principalmente porque los molinos de mano no son desarmados para su limpieza y, por lo tanto, hay cavidades en los mismos donde queda producto remanente que puede ser fácilmente colonizado por microorganismos del ambiente y que se sustentan mediante la fermentación de la masa. Posteriormente, al entrar en contacto con producto fresco, éste quedará inoculado.
- Durante el amasado, al entrar en contacto con diferentes superficies, durante la manipulación manual de la masa y la exposición al aire, se contribuye en menor medida con la inoculación natural [Nuraida et al., 1995].

1.2.3 Microbiota del pozol

La fermentación del pozol es fundamentalmente láctica [Wacher, 1995; Ampe *et al.*, 1999a] al igual que en la mayor parte de los alimentos fermentados donde los microorganismos implicados son principalmente BAL. La fermentación se lleva a cabo de forma natural sin necesidad de inóculo iniciador, por lo que es una fermentación no controlada que depende de los microorganismos presentes naturalmente en la masa, siendo una microbiota mixta. Además, ya que se trata de una fermentación en estado semisólido y por la heterogeneidad de la composición y grado de aeración en la bola de masa de pozol, los microorganismos presentes pueden encontrar diferentes microambientes cuyas características físicas y químicas pueden variar favoreciendo el desarrollo de algunos e impidiendo el desarrollo de otros con cierta selectividad [Sainz, 1998].

En masa recién preparada se han encontrado de forma sistemática BAL, mesófilos no lácticos, hongos filamentosos y hongos levaduriformes; estos microorganismos están desde el inicio de la fermentación y se desarrollan en menor o mayor medida a lo largo de ésta [Ulloa *et al.*, 1987; Nuraida *et al.*, 1995; Wacher *et al.*, 2000].

Las BAL, homo- y heterofermentativas, representan la mayor parte de la población presente, siendo entre el 90 al 97% del total de la microbiota del pozol responsable de la

fermentación [Ampe, *et al.*, 1999b]. Estas bacterias tienen un papel importante durante las primeras horas de la fermentación [Nuraida, 1988; Escamilla-Hurtado & Mozqueda-González, 1992; Wachter, 1995; Ampe *et al.*, 1999b] y son responsables de la producción de ácido láctico. El crecimiento de las BAL va a la par con el descenso del pH de 7.4 a 4.8 a las 48 h de fermentación [Díaz-Ruiz *et al.*, 2003]. En sí, la microbiota es muy estable y el proceso de elaboración del pozol, indígena o mestizo, no influye de forma destacable en la microbiota de éste [Wacher *et al.*, 2000].

Dentro de las BAL reportadas como dominantes en la fermentación de pozol están miembros de los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* [Ampe *et al.*, 1999b]. Entre los mesófilos presentes a lo largo de la fermentación están miembros de la familia *Enterobacteriaceae* [Wacher *et al.*, 1993], aunque la población disminuye conforme avanza la fermentación. Cabe mencionar que pese a que hay cierta variabilidad en la microbiota presente en masas de diferentes productores, se ha detectado el predominio particular de ciertas especies como: *S. infantarius*, *Weissella confusa* y *Lactococcus lactis*, durante toda la fermentación y de *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, a partir de las 48 h de fermentación, caracterizándose como la microbiota básica de la fermentación del pozol (pozol de Villahermosa, Tabasco) [Ampe *et al.*, 1999b; Ben Omar & Ampe, 2000; Díaz-Ruiz *et al.*, 2003; López, 2006].

1.2.4 *Streptococcus* spp. como miembro importante de la microbiota del pozol (Villahermosa, Tabasco)

Ya se mencionó la recurrente identificación de miembros del género *Streptococcus* en diferentes etapas de la fermentación del pozol, en masas de diferentes productores y en diferentes muestreos (Villahermosa, Tabasco).

S. infantarius ha sido hallado en pozol a nivel superficial y en el centro de las bolas de masa [Ben Omar & Ampe, 2000; Bolaños, 2004; López, 2006]. Se le considera dominante en la fermentación y presente a lo largo de todo el proceso [Ampe *et al.*, 1999b; Ben Omar & Ampe, 2000]. De las bacterias BAL amilolíticas (BALA) recuperadas del pozol, tiende a ser la especie más recurrente, siendo aisladas repetidas veces de diferentes muestras [Díaz-Ruiz *et al.*, 2003; Rodríguez-Navarro & Villalva-Fuentes, 2010; Becerril-Sánchez, 2012]. Así

mismo, *Sii* tiende a persistir hacia el final de la fermentación [Díaz-Ruiz *et al.*, 2003; Bolaños, 2004] con tolerancia a la disminución del pH. En otras fermentaciones de productos vegetales, las bacterias ácido lácticas amilolíticas detectadas y que predominan pertenecen al género *Lactobacillus*, incluso en fermentaciones de maíz (con maíz no nixtamalizado, Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplos de alimentos fermentados tradicionales de origen vegetal donde el género dominante es *Lactobacillus*, la especie indicada es señalada como la predominante en la fermentación

Origen	Producto	Vegetal	Especie	Referencia
Colombia	Almidón agrio	Yuca	<i>L. manihotivorans</i>	Morlon-Guyot <i>et al.</i> , 1998
México	Atole agrio	Maíz	<i>L. plantarum</i>	Valderrama, 2012
Filipinas	Burong isda	Pescado con arroz	<i>L. plantarum</i>	Olympia <i>et al.</i> , 1995
Golfo Balkánico	Boza	Maíz	<i>L. plantarum</i>	Petrova <i>et al.</i> , 2010
África				
Tanzania	Togwa	Maíz	<i>L. plantarum</i>	Mugula <i>et al.</i> , 2003
Nigeria	Garri y fufu	Yuca	<i>L. plantarum</i> <i>L. plantarum</i>	Ngaba & Lee, 1979 Nwankwo <i>et al.</i> , 1989; Brauman, 1996
Nigeria	Ogi	Maíz o sorgo	<i>L. plantarum</i> <i>L. confusus*</i> <i>L. fermentum</i>	Johansson <i>et al.</i> , 1995 Oguntoyinbo <i>et al.</i> , 2011
Nigeria	Fufu, burkutu, ogi-baba, kuzu-zakki	Yuca o sorgo	<i>L. fermentum</i> <i>L. plantarum</i>	Sanni <i>et al.</i> , 2002
Ghana, Nigeria	Kenkey	Maíz	<i>L. plantarum</i>	Olasupo <i>et al.</i> , 1996
Ghana	Kenkey	Maíz	<i>L. fermentum</i>	Hayford <i>et al.</i> , 1999
Benin	Ogi y mawè. Mawè	Maíz	<i>L. fermentum</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. brevis</i>	Agati <i>et al.</i> , 1998 Hounghouian <i>et al.</i> , 1993
Botswana	Mahewu	Maíz	<i>Lactococcus lactis</i>	Steinkraus <i>et al.</i> , 1993

*El basónimo es *L. confusus*, actualmente *Weissella confusa* es más aceptado acorde al Comité Internacional en Sistemática Bacteriana [ICSB, 2000].

En presencia de almidón, *S. infantarius* crece rápidamente con una conversión sustrato-biomasa muy eficiente [Díaz-Ruiz *et al.*, 2003], además de ser xilanolítico y también poder degradar el arabinosilano [Cooper-Bribiesca *et al.*, 2018], lo cual le proporciona una ventaja ecológica que permite su desarrollo y proliferación en comparación con otras BAL. Así mismo, contribuye en la disminución del pH del pozol al producir, también como subproducto de la fermentación, ácido láctico e igualmente acetato, formato y etanol por medio de otras

rutas metabólicas, sin producción de gas, que brindan sabor y aroma característicos de esta bebida [Wood & Holzapfel, 1995].

El punto de introducción de *Sii* en el pozol no está del todo claro. Es posible que ocurra durante o después de la molienda, lo cual sería consistente con el trabajo de López (2006). En éste, se observó la presencia de esta bacteria en muestras obtenidas de 7 productores que utilizaron el mismo molino y cuyo producto, antes de la molienda, mostró perfiles de Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE) no relacionados entre sí. Igualmente, en masa de algunos de los productores, *S. infantarius* no se detectó inmediatamente después de la molienda pero sí se detectó en las fases tardías de la fermentación. Por lo tanto, existe la posibilidad de que su número quedara por debajo del límite de detección (detección molecular por medio de PCR del gen *rpoB*), tanto en masa recién molida, así como en las etapas iniciales de la fermentación. Al parecer, las particularidades del nixtamal a diferencia de masa de maíz sin nixtamalizar, está proporcionando un nicho especial para el desarrollo particular de *S. infantarius*, posiblemente facilitando la colonización.

La importancia de las BAL en este alimento radica tanto en su capacidad fermentativa así como en la producción de diferentes metabolitos [Wacher et al., 1995]. Algunas de estas sustancias contribuyen a ejercen actividad antimicrobiana contra otras bacterias, principalmente los ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético), bacteriocinas, CO₂ y peróxido de hidrógenos [Streinkraus, 1983; Daeschel, 1989]. Algunos miembros del CSBSE son productores de bacteriocinas con actividad contra otras BAL, bacterias asociadas a la descomposición del alimento o patógenas [Pieterse *et al.*, 2008; DeVuyst & Tsakalidou, 2008; Rashid *et al.*, 2009; Jans *et al.*, 2012a] y es uno de los enfoques que actualmente se trabaja para determinar si cepas del género *Streptococcus*, aisladas del pozol, producen esta clase de compuestos. Igualmente, las BAL también contribuyen en la producción de sustancias que pueden ser sustratos para otras poblaciones microbianas, particularmente las BALA como *S. infantarius* pueden liberar mono-, di- y oligosacáridos [Díaz-Ruiz *et al.*, 2003]. Estas sustancias pueden difundir a través de la masa de pozol y pueden ser consumidos por otros grupos microbianos o antagonizar con otros, contribuyendo en la formación de microambientes [Wacher, 1995].

1.3 El género *Streptococcus*

El género *Streptococcus* pertenece al dominio Bacteria, phylum *Firmicutes*, clase *Bacilli*, al orden *Lactobacillales* y es parte de la familia *Streptococcaceae*. Son cocos Gram-positivos que forman cadenas, no móviles, no esporulados y son de bajo contenido de GC (37.6%). Las bacterias que pertenecen a este género son quimiorganótrofos y requieren medios de cultivo ricos en nutrientes y muchos de ellos tienen necesidades complejas de factores de crecimiento como vitamina B1, aminoácidos, etc. Son anaerobios facultativos con actividad de superóxido dismutasa, son catalasa y oxidasa negativo y llegan a requerir 5% de CO₂ para tener mejor crecimiento. Los estreptococos forman parte del grupo de las BAL y poseen un metabolismo fermentativo con una gran variedad de especies homofermentativas, generando como subproducto principal del metabolismo ácido láctico sin formación de gas.

Este género tiene una amplia variedad de hábitats, por ejemplo, algunos estreptococos son comensales de vertebrados. A través del análisis metagenómico de la microbiota del tracto gastrointestinal del ser humano, diversos estudios han demostrado presencia importante y constante de este género a pesar de que se trate de muestras procedentes de personas de diferentes regiones geográficas y de poblaciones con hábitos alimenticios diferentes. *S. suis*, *S. thermophilus*, *S. gallolyticus* y *S. agalactiae* son representantes del género con persistencia en estos metagenomas² [Kurokawa *et al.*, 2007; Turnbaugh *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2010; Stearns *et al.*, 2011; Yatsunenکو *et al.*, 2012; Human Microbiome Project].

² Análisis de los metagenomas realizado utilizando el servidor MG-RAST (*Metagenome Analysis, Best Hit Classification*, visualización en *Barchart*, Fig. 4). Esto con el fin de sustentar la presencia natural de este género en el tracto gastrointestinal de individuos sanos. Los metagenomas analizados que permitieron efectuar esta observación, de acuerdo al orden de la referencia del artículo original que les dio origen, pertenecen a los proyectos: Human Faeces-Kurokawa; Twin Gut Microflora Study (muestras de materia fecal, mujeres, 25 a 32 años, gemelas, EE. UU.); Human Gut Microbial Metagenome (materia fecal, Dinamarca); Bacterial Biogeography of the human digestive tract (biopsias de diferentes partes del tracto digestivo, Canadá); Human gut microbiomes viewed across age and geography (materia fecal de adultos, Malawi) y Human Microbiome Project (muestras de material fecal, EE. UU.). Este último proyecto, dirigido por el National Institute of Health de los EE. UU. con sede en Maryland.



Figura 4. Distribución relativa de especies del género *Streptococcus* entre la población evaluada en el Human Microbiome Project. Los datos fueron obtenidos de la base de datos MG-RAST y para su análisis se recurrió a las herramientas de este mismo servidor. Cada barra representa la abundancia relativa de la especie indicada en el eje vertical, en un metagenoma que corresponde a la muestra de un individuo adulto y sano de población de EE. UU. Para este análisis en particular se escogieron al azar 15 metagenomas de este proyecto que corresponden a los pertenecientes a los códigos: 4478631.3, 4478630.3, 4478625.3, 4478624.3, 4478623.3, 4478622.3, 4478621.3, 4478620.3, 4478619.3, 4478618.3, 4478617.3, 4478616.3, 4478612.3, 4478611.3 y 4478610.3. *S. pyogenes*, *S. suis* y *S. pneumoniae* son las especies mayormente representadas en estos metagenomas.

La Figura 4 representa un esquema de distribución relativa de las primeras 3 especies del género *Streptococcus* más abundantes entre miembros de la población estudiada en el Human Microbiome Project, obtenido por medio de la base de datos Metagenome Analysis Server (MG-RAST: <https://www.mg-rast.org/>). Este análisis se efectuó (27 mayo, 2013) para mostrar la presencia natural de este género en el tracto gastrointestinal del humano, recurriendo a la información de libre acceso disponible en el mismo servidor.

Para su diferenciación, los estreptococos pueden ser identificados y clasificados acorde a la morfología macroscópica (morfología colonial), hemólisis y por pruebas bioquímicas y serológicas [de la Maza *et al.*, 2013].

Una de las primeras reestructuraciones del género, en un intento por distinguir especies patógenas de las no patógenas, fue el separarlo en tres diferentes géneros. Por medio de la homología DNA-DNA (hibridación DNA-DNA considerándose misma especie con $\geq 70\%$ de homología) se dividió en los géneros: *Lactococcus* (estreptococos importantes para la industria láctea) y *Enterococcus* (especies de estreptococos de origen fecal), manteniéndose

también el género *Streptococcus* [Schleifer *et al.*, 1985; Schleifer & Kilpper-Bälz, 1987]. Por lo que, más recientemente, el análisis genético es pieza clave para la identificación de las especies de este género. Siendo así también la reestructuración del complejo *S. bovis/S. equinus*, antes englobados en los no-enterococos del grupo D, al cual pertenece *Sii*.

1.3.1 Complejo *S. bovis/S. equinus*

El CSBSE corresponde a los estreptococos del grupo D de Lancefield, comprendiendo a los anteriormente denominados *Streptococcus bovis* biotipos I y *Streptococcus bovis* biotipos II que se diferencian por ser manitol positivo y negativo respectivamente. Adicionalmente, el biotipo II se subdivide en II.1 y II.2 de acuerdo con las pruebas indicadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Pruebas bioquímicas para diferenciar a los estreptococos del CSBSE biotipo II.1 y II.2.

Biotipo	Fermenta			β -glucoronidasa	β -glucosidasa
	almidón	glucógeno	trehalosa		
II <u>II.1</u>	+	+	-	-	-
II.2	-	-	+	+	+

+ Prueba positiva; - Prueba negativa [basada en la información de: Schlegel *et al.*, 2000].

Esta descripción bioquímica para diferenciar a los miembros del CSBSE y esta nomenclatura solían bastar, principalmente en el área clínica donde aún llegan a ser utilizadas. Sin embargo, con el continuo aislamiento de cepas de origen diferente al humano como las aisladas de alimentos fermentados con estatus de inocuidad ambiguo, entre otras, esto no proporciona suficiente resolución. Por ej., Díaz-Ruiz *et al.* (2003), reportan en pozol algunas cepas como *S. bovis*, en la actualidad se sabe, por comparación de secuencias de genes, que al menos la cepa *S. bovis/S. infantarius* subsp. *coli*-25124 corresponde a *S. infantarius* subsp. *infantarius* [Domínguez-Ramírez *et al.*, 2020]. Así, gracias a que estas técnicas son cada vez más accesibles y a que las bases de datos son cada día más robustas, se han generado cambios en la taxonomía de todo el género *Streptococcus* y también del CSBSE [Poyart *et al.*, 1998, 2000, 2002; Hinse *et al.*, 2011].

Cabe mencionar que para determinar las relaciones evolutivas (filogenéticas) o poder identificar y clasificar a los microorganismos (taxonomía), es importante contar con una macromolécula (gen) reconocida como cronómetro evolutivo. Esto es, una molécula que da medida del cambio evolutivo que han tenido los microorganismos al considerar las

modificaciones en la secuencia de sus genomas. Uno de los recursos más utilizados para mejorar la resolución en la identificación de bacterias, incluyendo a los miembros del género *Streptococcus*, es por medio de la secuenciación y el análisis comparativo de genes como el 16S rRNA. Utilizando este gen, dos microorganismos se consideran de la misma especie al tener de un 98.2 a 99.0% de similitud de la secuencia [Stackebrandt & Goebel, 1994].

Sin embargo, si bien la secuencia del gen 16S rRNA es ampliamente utilizada con fines de identificación y taxonómicos, también ocurre que en ocasiones la diferenciación entre dos taxones no puede realizarse correctamente por lo altamente conservado de ésta. Esto se observa entre organismos muy estrechamente relacionados filogenéticamente. Por ejemplo, *Salinispora tropica* y *Salinispora arenicola* son reconocidas como especies diferentes a pesar de que ambas poseen una similitud entre las secuencias del gen 16S rRNA de 99.53%, lo que representa una diferencia de cerca de 7 nucleótidos [Jensen & Mafnas, 2006]. Y dentro del CSBSE, *S. equinus* y *S. gallolyticus*, así como *S. gallolyticus* y *S. infantarius* poseen 97.1% de identidad entre sus secuencias; en tanto que *S. bovis* y *S. infantarius* un 99.8% [Poyart *et al.*, 2002]. Por este motivo también se ha sugerido el uso de otros genes monocopia que sean blanco alternativo y que posean mayor divergencia que el gen 16S rRNA para proporcionar mayor resolución en la diferenciación.

Poyart *et al.* (1995, 1998, 2000, 2002), han propuesto el uso del gen *sodA* que codifica para una superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD-Mn). La estrategia consiste en amplificar y secuenciar cerca del 83 al 85% de la secuencia del gen con oligonucleótidos degenerados diseñados para segmentos altamente conservados. Los oligonucleótidos son: *d1*-CCITAYICITAYGAYGCIYTIGARCC (para la cadena codificante) y *d2*-ARRTARTAIGCRTGYTCCCAIACRTC (para la cadena complementaria) [Poyart *et al.*, 1995]. Con esto, como resultado del análisis filogenético de la proteína SOD-Mn se constató que los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* constituyen dos grupos monofiléticos bien definidos [Poyart *et al.*, 1995]. Esto significa que todos los organismos incluidos en el grupo han evolucionado a partir de una población ancestral común y todos los descendientes del ancestro están incluidos en el grupo.

Después se sugirió esta metodología para la diferenciación a nivel de especie para el género *Streptococcus* [Poyart *et al.*, 1998] y para *Enterococcus* [Poyart *et al.*, 2000]. A la

fecha, el número de secuencias de este gen registradas en el GenBank ha aumentado, no sólo para estos 2 géneros sino que también para otros. En la actualidad se reúnen más de 14,104 secuencias para una amplia variedad de especies bacterianas (último acceso 11 noviembre, 2020). Con ello se aprecia la gran relevancia del uso de este gen para la identificación. Esto ha permitido llegar a nivel de subespecie y ha generando la reubicación taxonómica de algunos miembros del taxón. Este es el caso de *S. infantarius* subsp. *infantarius*, parte del CSBSE (antes *S. bovis* biotipo II.1) [Poyart *et al.*, 2002]. E incluso se ha utilizado como método de referencia para sugerir nuevas técnicas de identificación rápida de miembros de este género [Hinse *et al.*, 2011]. Así, con todos estos aportes se ha reorganizado el CSBSE generándose propuestas para una nomenclatura taxonómicamente más adecuada (Tabla 3) mayormente aceptada en la actualidad, aunque aún se acepta el uso de los nombres originalmente propuestos (basónimos).

Tabla 3. Nomenclaturas aceptadas para los estreptococos pertenecientes al CSBSE y asignaciones previas

Miembros del grupo*	Biotipo	Basónimo	Hábitat
<i>S. bovis</i>	<i>S. bovis</i> I	n.a.	Ganado bovino
<i>S. equinus</i>	<i>S. bovis</i> I	n.a.	Caballos
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	<i>S. bovis</i> I	<i>S. gallolyticus</i>	Seres humanos, ganado bovino, koalas, osos
<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	<i>S. bovis</i> II.1	<i>S. infantarius</i>	Seres humanos, ganado bovino
<i>S. lutetiensis</i>	<i>S. bovis</i> II.1	<i>S. infantarius</i> subsp. <i>coli</i>	Seres humanos
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	<i>S. bovis</i> II.2	<i>S. pasteurianus</i>	Seres humanos
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	n.a.	<i>S. macedonicus</i> **	Quesos
<i>S. alactolyticus</i> ***	n.a.	n.a.	Cerdos, perros, gallos
<i>S. suis</i>	Grupo R, S, T de Lancefield	n.a.	Cerdos, ganado bovino, humanos

n.a. no aplica. *Nomenclatura acorde a la propuesta aceptada más recientemente. **Manachini *et al.* (2002) proponen la reclasificación de *S. waius* [Flint *et al.*, 1999] como *S. macedonicus* [Tsakalidou *et al.*, 1998] aunque hay algunos autores que los consideran sinónimos. ***Vandamme *et al.* (1999) proponen reivindicar a *S. intestinalis* [Robinson *et al.*, 1988] como *S. alactolyticus* [Farrow *et al.*, 1984] aunque hay autores que los consideran sinónimos.

Las propuestas de las nomenclaturas corresponden a: Coykendall & Gustafson, 1985 (biotipos); Kilpper-Bälz & Schleifer, 1987 (*S. suis*); Osawa *et al.*, 1995 (*S. gallolyticus*); Bouvet *et al.*, 1997 (*S. infantarius*); Schlegel *et al.*, 2000 (*S. infantarius* subsp. *infantarius*, *S. infantarius* subsp. *coli*); Poyart *et al.*, 2002 (*S. lutetiensis*, *S. pasteurianus*); Schlegel *et al.*, 2003 (*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*, *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*).

[Con información adicional de: Winn *et al.*, 2008; Jans *et al.*, 2013a].

1.3.2 *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*

Streptococcus infantarius subsp. *infantarius* (*Sii*) posee las características generales del CSBSE del grupo D de Lancefield pero presenta respuesta variable a la hidrólisis de la

esculina (la mayor parte de las cepas da respuesta negativa). La Tabla 4 indica las pruebas bioquímicas que sirven para su diferenciación de otros estreptococos de este grupo.

Tabla 4. Características fisiológicas para diferenciar a *S. infantarius* subsp. *infantarius* de *S. bovis* y otros estreptococos del CSBSE

Característica	1	2	3	4	5	6	7
Hidrólisis de la esculina	v	+	+	+	+	+	-
Producción de:							
α-Galactosidasa	+	+	+	-	v	+	-
β-Galactosidasa	-	-	-	v	+	-	-
β-Glucosidasa	v	+	+	+	+	+	-
β-Glucuronidasa	-	-	-	-	+	-	-
β-Manosidasa	-	-	-	-	+	v	-
Producción de ácido a partir de:							
Glucógeno	+	-	+	-	-	+	-
Inulina	-	-	+	v	-	+	-
Lactosa	+	+	+	-	+	+	+
D-Manitol	-	-	-	-	-	+	-
Melobiosa	+	-	+	-	-	-	-
Metil β-D.glucopiranosido	v	+	+	v	+	+	v
Pullulano	+	-	-	-	-	+	-
Trehalosa	-	-	-	+	+	+	-
Almidón	+	v	+	-	-	+	+

Cepas: 1. *S. infantarius* subsp. *infantarius*; 2. '*S. infantarius* subsp. *coli*'; 3. *S. bovis* biotipo II.1; 4. *S. equinus*; 5. *S. bovis* biotipo II.2; 6. *S. gallolyticus*; 7. *S. macedonicus*. + indica que el 85% de las cepas dan positivo; - indica que menos del 15% de las cepas dan positivo; v, 15-85% de las cepas dan prueba positiva [adaptada de: Schlegel *et al.*, 2000].

Como ya se ha mencionado, la cepa tipo fue aislada de una muestra de materia fecal de un bebé sano (Reino Unido, 1949) mostrando presencia como comensal (cepa NCIMB 700599 [NCDO 599, HDP³ 90056, CIP⁴ 103233, ATCC⁵ BAA-102, CCUG⁶ 43820; cepas isogénicas]). Pero, como se mencionó en la sección Introductoria ("1.1 Introducción"), también ha sido aislado de chicharos congelados [Schlegel *et al.*, 2000] y de alimentos fermentados de forma natural [Bouvet, *et al.*, 1997; Tsakalidou *et al.*, 1998; Jans, 2001; Díaz-Ruiz *et al.*, 2003; Abdelgadir *et al.*, 2008; Hamza *et al.*, 2009; Rashid *et al.*, 2007; Wullschleger *et al.*, 2013; Jans *et al.*, 2012a; Mukisa *et al.*, 2012; Jans *et al.*, 2013b] y también ha sido asociado a diversos cuadros clínicos como septicemias y endocarditis [Schlegel *et al.*, 2000; Biarc *et al.*, 2004; Beck *et al.*, 2008; Correidora *et al.*, 2008]. Sin embargo, considerando estos estudios, hay que mencionar que aún presentan cierta

³ HDP, Centre National de Référence des Streptocoques, Service de Microbiologie, Hôtel-Dieu Paris, Francia.

⁴ CIP, Collection de l'Institut Pasteur en Paris, Francia.

⁵ ATCC, American Type Culture Collection, Virginia, EE. UU.

⁶ CCUG, Culture Collection, University of Göteborg, Suecia.

ambigüedad, p. ej., en los métodos de identificación de aquellas especies patógenas, derivado de las modificaciones en la taxonomía y nomenclatura del CSBSE que contrasta con los antiguos reportes donde *S. bovis* fue aislado e identificado en muestras de origen clínico.

Los miembros del CSBSE, incluyendo *Sii*, habían sido conocidos con el nombre de *S. bovis*, considerado como un patógeno emergente [Puerto Alonso *et al.*, 2007], comportándose como un oportunista afectando particularmente a adultos mayores [Correidora *et al.*, 2005; Hoen *et al.*, 2005]. *S. bovis* fue asociados a casos clínicos de bacteremia, endocarditis, cáncer y tumores de colon [Correidora *et al.*, 2005; Hoen, 2002, Hoen *et al.*, 2005; Schlegel *et al.*, 2000] y particularmente *S. bovis* biotipo II (ambigüedad que incluye a *Sii*, *S. lutetiensis* y a *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*) se detectó en casos de septicemia y endocarditis [Correidora *et al.*, 2005]. Los resultados señalan a *Sgg* como el principal causante de infecciones en el ser humano [Beck *et al.*, 2008], mostrando mayor relación con el desarrollo de cáncer de colon [Boleij *et al.*, 2011; Correidora *et al.*, 2008; Fernández-Ruiz *et al.*, 2010; de la Maza *et al.*, 2013] y mostrando gran potencial patogénico [Boleij *et al.*, 2011].

Cepas de *Sii* aisladas de alimentos muestran ciertas particularidades asociadas con su origen y que se pueden considerar factores selectivos para el nicho. Estas particularidades parecen ser también indicativo de una divergencia de éstas respecto a las cepas aisladas de muestras clínicas, teniendo una mejor adaptación a la matriz alimentaria [Jans *et al.*, 2012c, 2013a], tal vez prescindiendo de genes de virulencia a través de la reducción genómica como se aprecia en *S. thermophilus* [Hols *et al.*, 2005]. En estudios recientes han llegado a identificar linajes de *Sii* potencialmente aptos para uso en alimentos, mayormente obtenidos de leches fermentadas, y linajes considerados patobiontes [Kaindi *et al.*, 2018].

Se cree que estas adaptaciones selectivas para el nicho también se deben a la alta densidad y complejidad de la microbiota de los alimentos fermentados que contribuye en la modificación genética espontánea por medio de transferencia horizontal de genes, como lo observado entre cepas de *Sii* y *S. thermophilus* (en *gariss* africano), así como en otras BAL [Abdelgadir *et al.*, 2008; Hols *et al.*, 2005; Jans *et al.*, 2012b, 2012c, 2013a]. Además de que, al parecer, *S. infantarius* posee un estado de competencia constitutivo de manera natural

[Morrison *et al.*, 2013]. Así, se ha especulado que *Sii* evolucionó por transferencia horizontal de genes homólogos de *S. thermophilus*, por tanto, con la capacidad de utilizar la lactosa como ventaja selectiva para desarrollarse durante la fermentación natural de la leche [Abdelgadir *et al.*, 2008; Jans *et al.*, 2012b, 2012c, 2013a]. Incluso se las llama variantes africanas de *Sii* ya que se diferencian de *Sii* ATCC-BAA-102^T (de origen clínico) por la presencia de un operon *gal-lac* ausente en otros miembros del CSBSE además de ser similar, al igual que su patrón de fermentación de lactosa a *S. thermophilus* [Jans *et al.*, 2012c, 2013b].

Por su parte, algunas de las cepas obtenidas de pozol tienen capacidad *in vitro* para adherirse a células Caco-2, HeLa-3, HEp-2 y HT-29 [Ramírez-Chavarín *et al.*, 2014]. Bajo ciertas condiciones esta capacidad de adherencia podría ser considerada como un factor de virulencia, p. ej., al conjuntarse con otros más como la producción de exotoxinas pirogénicas, proteína inhibitoria de complemento, la producción de hemolisina, etc., que al parecer no están presentes en estos estreptococos aislados de pozol. Pero junto con la ausencia de factores de virulencia, la capacidad de adherencia a células epiteliales, tolerancia a la acidez, a las sales biliares, el efecto antimicrobiano (por la producción de bacteriocinas u otros compuestos con actividad antimicrobiana) son deseables en cepas probióticas [Mishra & Prasad, 2005; van de Guchte *et al.*, 2002].

Para este proyecto, el interés en esta bacteria surge de la recurrencia de su detección como parte de la microbiota natural del pozol, el cual muestra grandes diferencias respecto a los otros nichos a los que ha sido asociado. De modo que el comprender sus particularidades fisiológicas ante la respuesta a los principales factores de estrés asociados a la elaboración del pozol (modificaciones del pH tras nixtamalizar) podría ser significativo para entender si le confieren ventaja para colonizar el nicho, dominar en etapas tempranas de la fermentación y persistir en etapas tardías.

1.4 Cambios en el pH de la masa de pozol

Como ya se ha mencionado, uno de los principales efectos que tiene la presencia de BAL en el pozol durante la fermentación es la producción de ácido láctico, siendo también que el

crecimiento de éstas va a la par con el descenso del pH. Estas modificaciones pueden tener un impacto importante sobre la microbiota que puede desarrollarse durante la fermentación.

El pH de los granos de maíz se ha reportado estar entre 5.7 o 5.9, del nixtamal 7.5 [Ulloa, *et al.*, 1983] y aunque el pH de la solución con cal (Ca(OH)_2) del nejayote es de 11.7 [Cooper, comunicación personal], durante los lavados el valor de pH vuelve a quedar cercano a la neutralidad. Finalmente, al mezclarse tras la molienda, alcanza los valores de pH reportados como los iniciales de la fermentación (Tabla 5). Sin embargo, si no se lleva a cabo un lavado adecuado tras la nixtamalización, ciertamente el pH puede estar ligeramente arriba de pH 7.0.

Tabla 5. Modificaciones del pH de la masa de pozol al inicio y al término de la fermentación

pH inicial	pH final	Periodo de fermentación	Referencia
7.5	4.1	3 días	Cabra, 2000
7.4	4.4	3 días	Díaz-Ruiz <i>et al.</i> , 2003
6.8	3.9	8 días	Ulloa, <i>et al.</i> , 1983
6.8	3.9-3.6	9 días	Nuraida <i>et al.</i> , 1995
6.8	3.9	4 días	Escamilla-Hurtado & Mozqueda-González, 1992
5.3	3.9	7 días	Morales-Ferrero, 2011

Durante la fermentación se ha reportado que la concentración de ácido láctico aumenta de 0.1-0.4 a 0.5-0.8 g/100 g de masa húmeda [Morales-Ferrero, 2011], aunque la presencia de hidróxido de calcio remanente de la nixtamalización de los granos de maíz puede contribuir a disminuir el efecto inicial de la acidificación de las BAL. El pH de 7.5 a 7.0 cambia a 5.0 o 4.0 en 12 horas, cuando las bacterias dominantes son BAL. Aproximadamente después de medio día de fermentación se ha observado que los valores de pH oscilan en torno a valores de 4.7 a 4.0. Durante 6 a 9 días de almacenamiento declina a valores de 3.9 o hasta 3.6, aunque en la superficie de la masa los valores son cercanos a 4.4 o 4.0 [Nuraida *et al.*, 1995]. El pKa del ácido láctico es de 3.86, para que el pH disminuya por debajo de este valor es posible que se estén produciendo otros ácidos orgánicos en la fermentación que aún puedan liberar protones para incrementar la acidez de la masa (ácido fórmico, pKa 3.75; ácido málico, pKa 3.46; ácido cítrico, pKa 3.13; ácido glutámico, pKa 2.23).

El pH ácido de los alimentos fermentados posee un efecto en la selección de los microorganismos que en él se desarrollan, solamente la subpoblación con capacidad para tolerar y adaptarse a estas condiciones sobrevivirá [Sainz *et al.*, 2001].

1.5 Respuesta microbiana al estrés

El estrés puede quedar definido como cualquier modificación en el ambiente que resulta en una disminución de la velocidad de crecimiento o la supervivencia de los microorganismos reflejado en cambios a nivel genómico o proteómico [Booth, 2002]. Así, cuando la célula es expuesta a un ambiente que posee condiciones de crecimiento fuera del rango óptimo (por arriba de éste o en un rango subóptimo), entonces es sometida a estrés y tratará de mantener las condiciones internas minimizando cualquier fluctuación, esto es la homeostasis celular (Figura 5).

Para lograr lo anterior, la célula puede inducir una respuesta general al estrés o montar una respuesta específica a un tipo particular de estrés. Ambos mecanismos contribuyen a incrementar la supervivencia de la población por medio de la expresión coordinada de genes que alteran diversos procesos celulares para incrementar la tolerancia al estrés. Esto puede derivar en una respuesta adaptativa de tolerancia como en el caso de la acidez (*acid tolerance response* o ATR) o a la alcalinidad (*alkali tolerance response* o AITR [Giotis *et al.*, 2008]). Esta adaptación es aquella en la cual tras exponer una población microbiana a condiciones ambientales subóptimas de crecimiento (estrés subletal) le permite adaptarse y sobrevivir exposiciones subsecuentes del mismo tipo y grado o un mayor grado de estrés (incluso estrés letal), a las que de manera natural es susceptible; esto mismo también puede ocurrir como respuesta ante un tipo particular de estrés, induciendo tolerancia a otro tipo de estrés siendo entonces una inducción de protección cruzada [Gahan *et al.*, 1996; Hartke *et al.*, 1996; Flahaut *et al.*, 1997; Scheyhing *et al.*, 2004; Tong *et al.*, 2011]. Por ejemplo, en BAL ha sido reportada la protección cruzada para pH ácido inducida por calor, posiblemente como respuesta al choque térmico [DeAngelis & Gobbetti, 2004].

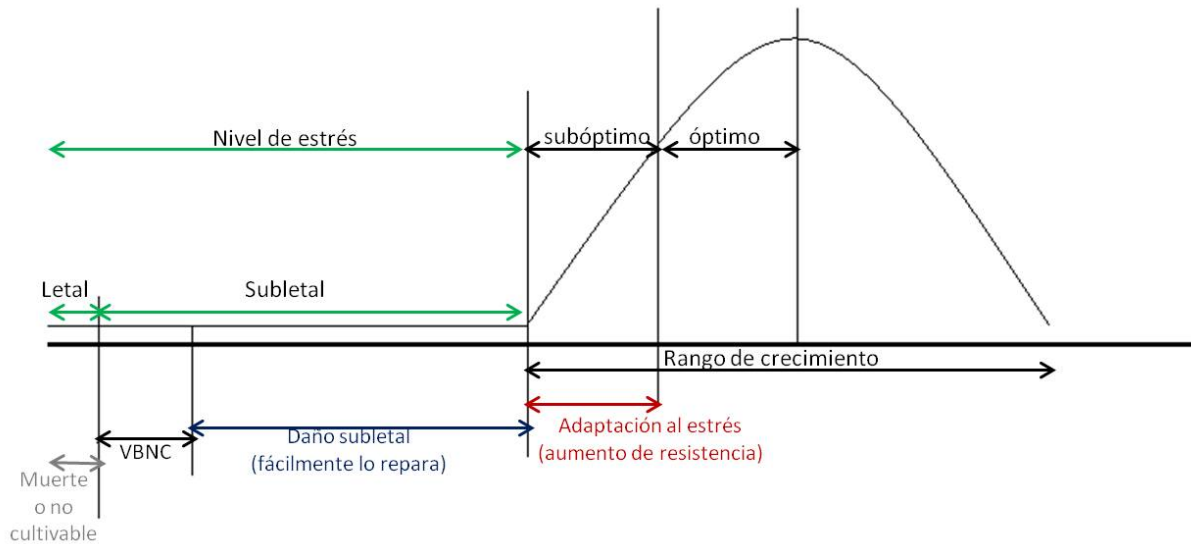


Figura 5. Representación esquemática del grado de estrés y efecto general en la población microbiana ante condiciones ambientales, físicas o químicas, por debajo de las condiciones óptimas de crecimiento. VBNC, viable but non-culturable, estado viable pero no cultivable [modificado de: Ray & Bhunia, 2014].

Esta adaptación también se ha observado en ambientes particulares como los alimentos. Por ejemplo, la adaptación de *Listeria monocytogenes* a pH 5.5 le confiere mayor supervivencia en alimentos ácidos como yogurt, queso cottage, queso cheddar, jugo de naranja y aderezo para ensalada e incluso durante la fermentación activa de leche, en comparación con células no adaptadas (crecidas previamente en medio con pH 7.0) [Gahan *et al.*, 1996].

1.5.1 Respuesta a estrés ácido

En el caso de la acidez, usualmente utilizada para conservar alimentos, ésta genera estrés en los microorganismos por efecto de ácidos orgánicos y por ácidos débiles. El ácido láctico es un ácido débil, al estar en su forma protonada puede atravesar la membrana celular al no poseer carga y al internarse en citoplasma puede liberar su protón acidificando el pH interno. El pH interno debe ser cercano a la neutralidad para, entre otras cosas, evitar la desnaturalización de proteínas, ácidos nucleicos o la modificación de fosfolípidos. Igualmente, la internalización de ácidos débiles afecta el balance de cargas al acumular aniones, esto incrementa la turgencia celular, es decir, la presión que ejercen el citoplasma y el contenido de la célula sobre la pared celular y en caso grave, provocar lisis celular.

Entre las definiciones que giran en torno a la respuesta al estrés ácido aún hay cierta ambigüedad, depende mucho del autor el uso de cada expresión, pese a ello se pueden tener como base las siguientes [Ray & Bhunia, 2014]:

- ◆ *Tolerancia a la acidez o respuesta de tolerancia a la acidez (ATR)* consiste en la respuesta protectora generada por la exposición breve a una condición de acidez moderada que permite la sobrevivencia a una exposición drástica subsecuente a un medio con pH de 4.0 a 2.4.
- ◆ *Respuesta de choque ácido* corresponde a la respuesta que se presenta en un medio con pH bajo sin una exposición adaptativa previa.

De esta manera, estudiando la cinética de sobrevivencia de una población microbiana expuesta por tiempo prolongado a un pH ácido subletal, así como el reconocer la adaptabilidad y la tolerancia al estrés ácido de la misma, se puede entender la capacidad de los microorganismos para persistir en determinados nichos [Chan *et al.*, 1998]. Inclusive mostrando potencial para sobrevivir tratamientos de conservación o modificaciones físico-químicas propias del alimento como los que ocurren durante la fermentación.

La capacidad que algunos microorganismos poseen para mantener su pH interno estable a pesar de los cambios ambientales se denomina homeostasis del pH y puede regularse ya sea de forma pasiva o de forma activa [Cueto, 2001].

De forma pasiva puede darse limitando la permeabilidad de la membrana para permitir el paso de protones y otros iones al interior de la célula o bien, por la capacidad amortiguadora del citoplasma.

Por la forma activa, la célula puede controlar el movimiento de iones (Na^+ , K^+ y H^+) a través de la membrana, tanto hacia el interior como al exterior. Así mismo, puede inducirse la descarboxilación de aminoácidos como lisina y arginina o, incluso, generarse el bombeo activo de iones.

Ya se han descrito mecanismos de tolerancia al estrés ácido en bacterias Gram-positivas, incluyendo bacterias del género *Streptococcus*, de éstas principalmente en especies

involucradas en la formación de placa dentobacteriana o de caries dental que son consideradas acidúricas [Hamilton & Buckley, 1991; Cotter & Hill, 2003; Lemos & Burne, 2008]. Estos mecanismos posiblemente también estén presentes en los estreptococos aislados del pozol y son los que les permitirían sobrevivir la disminución del pH durante la fermentación, contribuyendo con su persistencia.

La F_1F_0 -ATPasa parece poseer el rol más importante en la homeostasis ante modificación del pH ambiental. Si el pH interno se acidifica, esta proteína adopta la actividad de ATPasa expulsando protones al medio externo a expensas del gasto de ATP; por el contrario, si el pH interno se alcaliniza actuará como una ATPsintasa promoviendo la entrada de protones acoplado a la producción de ATP (Figura 6). En estreptococos de cavidad oral como *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, se ha observado que al encontrarse en pH ácido la actividad de la F_1F_0 -ATPasa y su concentración se ven incrementadas [Bender *et al.*, 1986; Belli & Marquis, 1991; Lemos *et al.*, 2007], al igual que en *S. pneumoniae* [Martín-Galiano *et al.*, 2001] y otras BAL como: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y en *L. lactis* subsp. *cremoris* [Hartke *et al.*, 1996], en *L. casei* [Nannen & Hutkins, 1990] así como en *Enterococcus faecalis* [Kobayashi *et al.*, 1986] y *E. hirae* [Belli & Marquis, 1991].

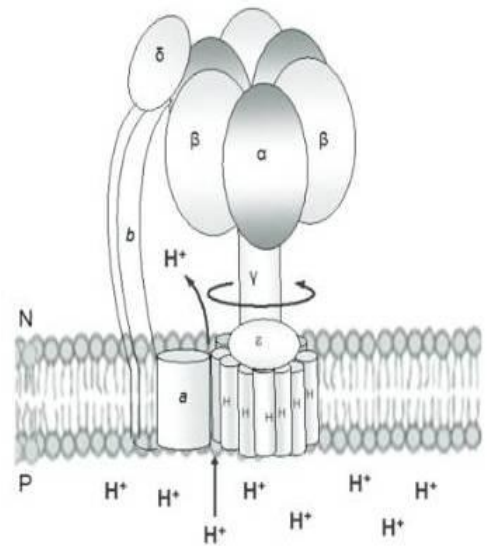


Figura 6. Estructura de la F_1F_0 -ATPasa y esquematización del flujo de protones hacia el interior de la célula con la consecuente producción de ATP generado por la fuerza protomotriz, comportándose como ATPsintasa. Si por el contrario, el flujo es hacia el exterior de la célula, ésta invierte energía para expulsar los protones excedentes, comportándose como ATPasa [Cano-Estrada & González-Halphen, 2011].

Además de la ATPasa, algunos otros mecanismos involucrados en la adaptación al estrés por pH ácido son:

(1) Producción de proteínas de protección como las proteínas de choque térmico que también modifican su expresión durante estrés por pH ácido e incluso en condiciones alcalinas, p. ej.: chaperonas DnaK, GrpE y chaperoninas como GroEL y GroES; RecA que es

una recombinasa y regulador del sistema SOS [Hartke *et al.*, 1996; Flahaut *et al.*, 1997; Jayarama *et al.*, 1997; Sanders *et al.*, 1999].

(2) Modificaciones en la composición de membrana celular, como el cambio del perfil de ácidos grasos que modifica la permeabilidad en *S. mutans* que en pH 5.0 aumenta la proporción de ácidos grasos monoinsaturados y ácidos grasos de cadena larga [Quivey *et al.*, 2000; Fozo & Quivey, 2004].

(3) Modificación en el metabolismo de aminoácidos como el aumento de la descarboxilación de glutamato, con ello se consumen protones del citoplasma y se genera como producto extracelular gamma-aminobutirato que alcaliniza el medio externo [Sanders *et al.*, 1999; Cotter & Hill, 2003]; el sistema arginina deiminasa (ADS) que libera NH₄ contribuyendo también en la alcalinización del medio [Burne & Marquis, 2000]; y en *S. mutans*, que carece del sistema ADS hay una vía análoga, el sistema agmatina deiminasa (AgDS) que genera también NH₄ y alcaliniza hasta cierta medida el citoplasma [Griswold *et al.*, 2006].

Los mecanismos mencionados han sido descritos en algunos miembros del género *Streptococcus*, principalmente especies presentes en la cavidad oral del hombre [Hamilton & Buckley, 1991; Cotter & Hill, 2003; Lemos *et al.*, 2007]. Y hay algunos estudios realizados en bacterias filogenéticamente relacionadas como enterococos y lactococos [Hartke *et al.*, 1996; Flahaut *et al.*, 1997] que antes eran parte del grupo D de Lancefield junto con el CSBSE del que forma parte *Sii*.

1.5.2 Respuesta a estrés alcalino

La capacidad que poseen las bacterias para adaptarse a las condiciones del medio son muy características acordes al nicho del que provienen. En cuanto a la respuesta a estrés alcalino éste es de gran relevancia en el área clínica (aún cuando hay pocos sitios del cuerpo con pH alcalino como el ducto biliar con pH≥10), en la biorremediación de suelos contaminados con desechos de la industria minera, en ecosistemas marinos, asociados a plantas o en ambientes alcalinos extremos como pozas hidrotermales [Padan *et al.*, 2005].

Se ha reportado que las bacterias tienen la capacidad de habituarse a condiciones alcalinas e incrementar su tolerancia a condiciones alcalinas extremas (similar a la ATR) o incluso inducir protección cruzada. Por ejemplo, *E. coli* puede inducir tolerancia a la alcalinidad a pH 10.5 previa adaptación en pH 9.0 [Goodson & Rowbury, 1990] o inducir termotolerancia en *Salmonella enteritidis* a 55° C [Humphrey *et al.*, 1991]; en *E. faecalis* la exposición a pH 10.5 indujo una mejora en la termotolerancia a 62° C [Flahaut *et al.*, 1997].

Entre las estrategias que utilizan las bacterias para mantener la homeostasis (pH interno ~7.6) en ambientes alcalinos se encuentran [Padan *et al.*, 2005]: (1) incrementar la producción de ácidos por medio de desaminación de aminoácidos y fermentación de azúcares; (2) incrementar la actividad de F₁F₀-ATPasa que acopla la entrada de H⁺ con la producción de ATP (con actividad de ATP sintasa); (3) cambios en la membrana celular para modificar la permeabilidad de protones e (4) incrementar la actividad de antiportador de cationes monovalentes y protones que, además, parecen tener un papel esencial y aparentemente son el mecanismo dominante en la homeostasis celular ante pH alcalino.

Algunos antiportadores activos en condiciones alcalinas ya han sido descritos. Bacterias del género *Enterococcus* en condiciones alcalinas cuentan con la actividad de esta clase de sistemas transportadores que trabajan sin la necesidad de fuerza protomotriz, parecen tener activo un sistema de extrusión ATPasa estimulado por sodio y una Na⁺-ATPasa translocasa, así como un antiportador Na⁺/H⁺, aunque éste parece no tener un rol destacado [Kinoshita *et al.*, 1984; Kakinuma & Igarashi, 1989]. También parece que poseen un sistema de exclusión de K⁺ esencial para el crecimiento en estas condiciones (K⁺/H⁺ antiportador) [Kakinuma & Igarashi, 1999]. En el caso de *Bacillus subtilis* se ha descrito un operón putativo para un K⁺(Na⁺)/H⁺, antiportador que es inducido también por choque alcalino [Saito & Kobayashi, 2003].

Así mismo, ya que el pH del medio ambiente influye en el balance de cargas en la superficie de la célula, en pH alcalino puede haber una hiperpolarización que también se observa en casos de estrés térmico [Zilberstein *et al.*, 1984]. Esto explicaría una posible protección cruzada entre estrés térmico y pH alcalino. Por ejemplo, se sabe que en condiciones alcalinas hay inducción de proteínas de choque térmico y proteínas RecA-independientes en *E. coli* [Taglicht *et al.*, 1987; Goodson & Rowbury, 1990]. En *E. faecalis* el

pH alcalino también induce la expresión de GroEL y DnaK, proteínas de choque térmico, generando también protección cruzada para estrés por temperaturas elevadas y por sales biliares [Flahaut *et al.*, 1997].

1.5.3 Respuesta a choque térmico

El efecto de las altas temperaturas sobre los microorganismos ha sido motivo de estudio tanto para conocer las temperaturas más adecuadas para eliminarlos eficientemente sin alterar los alimentos (p. ej., a través del valor de termodestrucción), así como para determinar lo que le ocurre a las células durante los tratamientos térmicos. Igualmente, es importante para la conservación de alimentos fermentados que contienen probióticos que requieren pasteurización pues es necesario que estos microorganismos se mantengan íntegros y funcionales.

En *E. coli* y otras bacterias mesófilas incluyendo BAL (que poseen temperatura óptima de crecimiento entre 25 y 40° C), cuando hay un aumento abrupto de temperatura la expresión de varios genes es reprimida pero se ha observado la inducción específica de un grupo de más de 20. Las proteínas para las que codifican estos genes son llamadas *proteínas de choque térmico* (*Hsp* por sus siglas en inglés). Muchas de éstas son necesarias para el crecimiento y la supervivencia a temperaturas altas pero aunque la termotolerancia es acompañada por la inducción de Hsps, no se puede afirmar que son éstas las que la confieren [Boutibonnes *et al.*, 1991, 1992; Auffray *et al.*, 1995].

S. thermophilus es un ejemplo de las bacterias usadas en la fermentación de productos lácteos y es considerada una bacteria termotolerante; sobrevive durante 30 minutos a 60° C e incluso la pasteurización rápida a 72° C durante 15 segundos [Auffray *et al.*, 1995; Hutkins, 2000; Flint *et al.*, 2002]. Así mismo, es considerada como un estreptococo termófilo con un rango de temperatura de crecimiento de 20 a 52° C [Bridge & Sneath, 1983; Marshal, 1987; Auffray *et al.*, 1995] y también es una de las especies bacterianas de importancia en alimentos en que se ha estudiado el efecto del choque térmico al igual que en *L. lactis* subsp. *lactis*, en *E. faecium* y en diferentes especies de *Lactobacillus* [Boutibonnes *et al.*, 1991, 1992; Auffray *et al.*, 1995; Broadbent *et al.*, 1997; Ahmad *et al.*, 2002]. En estas bacterias se ha observado un aumento en la expresión de Hsps como: DnaK, DnaJ, GroEL, GrpE, entre

otras. Algunas de estas Hsps parecen poseer también una expresión diferenciada ante distintos tipos de estrés como ya se ha mencionado antes, como p. ej., modificaciones abruptas en el pH [Taglicht *et al.*, 1987; Goodson & Rowbury, 1990; Hartke *et al.*, 1996; Flahaut *et al.*, 1997; Jayarama *et al.*, 1997; Sanders *et al.*, 1999; Nascimento *et al.*, 2004].

Algunas de las Hsps mejor conocidas son: DnaK, DnaJ, HrcA y GrpE (familia Hsp70), GroE (Hsp60) conformado por GroEL (chaperonina) y GroES (co-chaperona), ClpB que participa en la degradación de proteínas y forma parte de una familia de proteínas con función chaperona/proteasas ATP-dependientes como ClpC, ClpE, ClpL, ClpP, etc.; RecA, una recombinasa que induce una respuesta SOS que puede generar mutaciones del DNA o la adquisición de funciones pre-evolutivas por transferencia horizontal de genes. Ésta última es expresada diferencialmente ante diferentes valores de pH [Len *et al.*, 2004].

La termotolerancia también puede ser adquirida por medio de una exposición previa a temperaturas ligeramente menores a la letal (como se ha indicado para el caso del estrés por efecto del pH) o por efecto de protección cruzada generada ante otro estímulo subletal [Boutibonnes *et al.*, 1991, 1992; Auffray *et al.*, 1995; Broadbent *et al.*, 1997]. Aunque también puede tratarse de un elemento que genera protección cruzada. En BAL ha sido reportada la protección cruzada inducida por calor, posiblemente como respuesta al choque térmico [DeAngelis & Gobbetti, 2004].

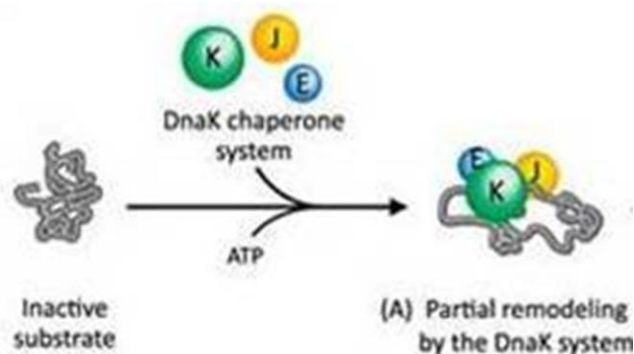


Figura 7. Modelo del plegamiento de polipéptidos (sustrato inactivo) por la actividad en colaboración de la proteína de choque térmico DnaK (K) junto con DnaJ (J) y GrpE (E) [Kerrigan, 2011].

Conociendo algunas de las proteínas cuya expresión o actividad se ven modificados bajo condiciones de estrés por pH y por temperatura, se propone el estudio de la expresión diferenciada de cuatro genes ante la respuesta a estrés ácido, alcalino y térmico como parte de la caracterización de la respuesta

de *Sii-25124*: *atpB* que representa la subunidad *a* del dominio F_0 de la F_1F_0 -ATPasa, *ptsG* para monitorear el estado metabólico (a través del flujo glucolítico) de la célula y la respuesta de los genes *dnaK* y *groEL* que codifican para las chaperonas DnaK y GroEL.

La DnaK es una chaperona inducible por calor que posee actividad de ATPasa. Esta proteína pertenece a la familia Hsp70 (proteínas de choque térmico de 70 kDa) e interactúa con las co-chaperonas DnaJ y GrpE (Figura 7) cuyos genes, junto con *dnaK*, forman un operón. DnaK es un monómero con dos dominios, el C-terminal que corresponde al de unión a sustrato y el N-terminal con actividad de ATPasa. DnaJ (Hsp40), asociado al polipéptido, se une a la cavidad formada en el dominio C-terminal de DnaK e induce la hidrólisis de ATP permitiendo la captura del sustrato, siendo GrpE (20 kDa) quien libera el ADP y permite el cambio conformacional que reduce la afinidad de DnaK por el complejo DnaJ-polipéptido. De esta manera, además de disgregar proteínas, DnaK se encarga de volver a plegar proteínas solubles que han sufrido daño como respuesta al estrés, siendo una chaperona de tipo I (de plegamiento). Además, se ha propuesto que DnaK puede recibir al mismo sustrato en sucesivos plegamientos de forma cíclica o el correcto plegamiento puede ser concluido por GroEL/GroES [Saibil, 2013].

Aunque su función básica es asistir el proceso de plegamiento de proteínas, también se cuentan el plegamiento de proteínas recién sintetizadas, ensamblar y desensamblar complejos protéicos y regular las rutas de transducción de señales por medio del control de la estabilidad de proteínas cinasas y factores de transcripción [Erbse *et al.*, 2004].

DnaK interactúa con casi todas las proteínas no plegadas y parece que se une a un motivo *core* formado por 5 aminoácidos ricos en residuos hidrofóbicos, flanqueados a ambos lados por regiones con residuos con carga preferentemente positiva, este motivo está ampliamente distribuido entre las proteínas aunque suele estar protegido al ser hidrofóbico cuando está correctamente plegada [Erbse *et al.*, 2004].

GroEL es también una chaperona de tipo I que pertenece a la familia Hsp60. Esta chaperona promueve el plegamiento de polipéptidos que han sido desnaturalizados bajo condiciones de estrés, con la ayuda de la unión con la co-chaperona GroES. Al igual que DnaK. GroEL posee actividad de ATPasa que genera cambios conformacionales en su

estructura para mediar el plegamiento del sustrato. Cabe destacar que GroEL y DnaK son reguladas por el regulón HrcA-CIRCE (Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression).

Igualmente, otro cambio destacable que se ha observado como consecuencia del estrés es la actividad de la glucosa permeasa del sistema fosfotransferasa fosfoenolpiruvato dependiente (PEP-PTS). La EII^{Glc} (enzima II; PTS glucosa permeasa, PEP-glucosa fosfotransferasa, PtsG) posee tres dominios (por lo

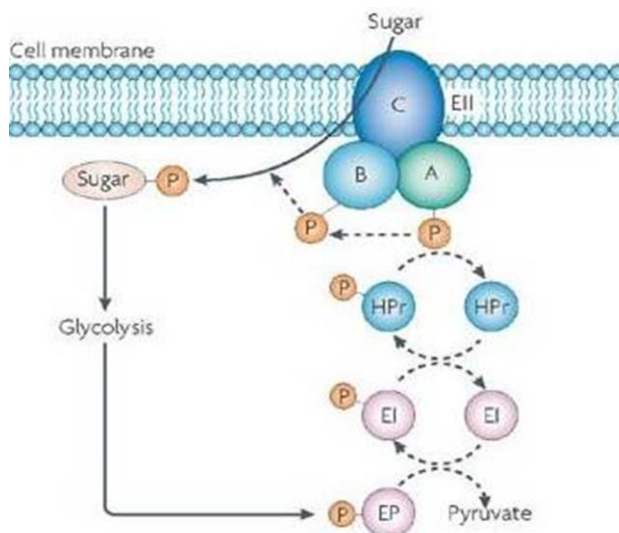


Figura 8. Sistema fosfotransferasa fosfoenolpiruvato dependiente, participa en la represión catabólica por carbono. La proteína PtsG corresponde a EII y también es llamada glucosa permeasa IIABC. [Görke & Stülke, 2008].

que también es llamada glucosa permeasa IIABC) y se trata de un transportador específico de glucosa que fosforila al carbohidrato al introducirlo a la célula (Figura 8). En condiciones de acidez, *S. mutans* se reprime la expresión pero en *S. sobrinus* es inducida y aumenta su actividad como respuesta al choque ácido [Nascimento *et al.*, 2004]; a diferencia de EI y HPr, los otros dos componentes del sistema PTS, que no parecen ser afectados [Vadeboncoeur *et al.*, 1987]. La actividad de la permeasa y el estado de fosforilación de las proteínas del sistema PTS, son reflejo del flujo glucolítico y del estado metabólico de la célula. Además, se ha observado que metabolitos como glucosa y sacarosa contribuyen en la supervivencia de algunas BAL ante pH bajo, siempre y cuando las enzimas de la glucólisis no se vean seriamente afectadas [Corcoran *et al.*, 2005; Sheng & Marquis, 2006].

Cabe mencionar que el hincapié que se ha hecho en cuanto a los mecanismos de homeostasis en *Enterococcus* sp. y *Lactococcus* sp. se debe al hecho de que de las bacterias más estudiadas bajo estas condiciones, éstas son filogenéticamente más próximas a los estreptococos. Por ello, en caso de no haber caracterización previa, como ocurre con la respuesta al estrés alcalino o térmico, son la referencia para efectuar comparaciones.

Igualmente, los enterococos son bacterias cuyo estatus como patógeno tampoco está del todo claro y aún así poseen gran importancia en la maduración de quesos europeos tradicionales e incluso algunos son productores de bacteriocinas [Giraffa, 2003], al igual que algunos *Sii* [Jans *et al.*, 2012a]. Ambos géneros parecen tener buena adaptabilidad a ambientes con condiciones fuera del rango óptimo de crecimiento como pH ácido, temperatura elevada y alta concentración de sales. *E. faecalis* crece en el rango de pH de 5.0 a 9.6 con pH_{óptimo} de 7.0-7.5, tolera 6.5% NaCl, muestra crecimiento entre 10 a 45° C y muchos resisten 62.8° C por 30 minutos [Flahaut *et al.*, 1997; Giraffa *et al.*, 2003]. En el caso de la cepa de referencia de *Sii*, la descripción indica que su crecimiento se ve inhibido con 6.5% NaCl, o a pH 9.6, tolera hasta 4 h en pH de 2.7 y posee temperatura máxima de crecimiento de 45° C, aunque se han descrito cepas termodúricas [Schlegel *et al.*, 2000].

Por ende, la presencia de mecanismos de tolerancia al estrés en miembros de estos grupos microbianos hace suponer que también se encuentren presentes en los estreptococos que se han aislado del pozol y les confiera la capacidad para permanecer presentes en la fermentación incluso en etapas tardías caracterizadas por pH ácido.

2. JUSTIFICACIÓN

De la colección de cepas procedentes del pozol que posee el laboratorio L-324, de un grupo identificado como *Streptococcus* sp., es necesario efectuar la identificación a nivel de especie para integrarlas a las evaluaciones fisiológicas y reconocer si existe diversidad entre ellas.

Asimismo, ya que se han reportado BAL capaces de adaptarse favorablemente en condiciones de estrés subletales y sobrevivir a la exposición subsecuente a condiciones de estrés letal, resulta de interés identificar si estas cepas aisladas de pozol, particularmente *S. infantarius* subsp. *infantarius*, tienen un comportamiento similar, siendo de mayor interés la respuesta de tolerancia a la acidez (ATR) y como un punto nuevo, a la alcalinidad (AITR) pues este último también ha sido poco estudiado en las BAL; y si llega a inducirse una respuesta de protección cruzada.

Esto con el fin de entender cómo es que estas bacterias se adaptan a cambios que ocurren de manera natural en el pozol, lo que es relevante ya que se cuentan pocos estudios sobre el comportamiento y la respuesta ante el estrés de este género en ambientes vegetales en comparación con cepas aisladas de ambientes asociados a mamíferos. También considerando aspectos como el estrés provocado por tratamientos de conservación de los alimentos (como la fermentación, congelación, envasado al vacío y presurizado con altas presiones hidrostáticas, entre otras), comparando con los estudios que se enfocan en entender la relación patógeno-hospedero y la respuesta al estrés derivada de esta relación.

Esto puede contribuir a entender si los estreptococos aislados del pozol tienen o no la capacidad para desarrollar una ATR y con ello mejorar su supervivencia en condiciones ácidas.

3. HIPÓTESIS

Ya que la presencia de especies de *Streptococcus* spp. es recurrente en masa de nixtamal pese a que durante la fermentación del pozol pasa de un pH casi neutro o ligeramente alcalino a un pH ácido, entonces es posible que estas cepas cuenten con mecanismos que les permitan tolerar y sobrevivir estos cambios de pH ya sea induciendo una ATR o por inducción de protección cruzada, como lo sería la inducción de tolerancia a la acidez por estrés alcalino o la inducción de tolerancia a estrés alcalino o ácido por choque térmico.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar si tratamientos con condiciones moderadas de estrés por pH inducen ATR o si el estrés térmico induce protección cruzada a estrés por pH en *S. infantarius* subsp. *infantarius* cepa 25124.

4.2 Objetivos particulares

∞ Identificar una colección de cepas de *Streptococcus* spp. aisladas de pozol a nivel de (sub)especie y determinar las similitudes y diferencias fisiológicas de éstas (potencial amilolítico, xilanolítico, fermentación de lactosa; velocidad específica de crecimiento en caldo APT; tolerancia a los valores máximos y mínimos de pH) respecto a *Sii-25124*.

∞ Determinar la respuesta de *Sii-25124* ante estrés por pH y temperatura alta a través de aspectos como: los valores de pH cardinales, la termotolerancia comparando con una cepa reconocida como termotolerante (*S. thermophilus* ATCC19258), si presenta una ATR inducida por pH subletal (ácido o alcalino) y si existe protección cruzada inducida por choque térmico. Adicionalmente, buscar en el *draft* del genoma de la cepa *Sii-25124* la presencia de secuencias de genes relacionados con la respuesta general a estrés: *dnaK*, *groEL*, así como la secuencia de: *atpB* y *ptsG*, para el diseño de oligos específicos para RT-qPCR. De esta manera, evaluar la expresión diferenciada de estos genes bajo las condiciones de adaptación a estrés por pH para determinar parte de su contribución en la ATR.

5. MATERIALES Y METODOLOGÍA

Este trabajo consta de 2 partes fundamentales que corresponden a: (1) la identificación y la determinación de similitudes y diferencias fisiológicas entre cepas de *Streptococcus* spp. aisladas de pozol y *S. infantarius* subsp. *infantarius*-25124 y, por otro lado, (2) la respuesta de *S. infantarius* subsp. *infantarius*-25124 ante estrés por pH y temperatura (Figura 9), quedando incluidos en este último algunos aspectos moleculares indicados en la Figura 10.

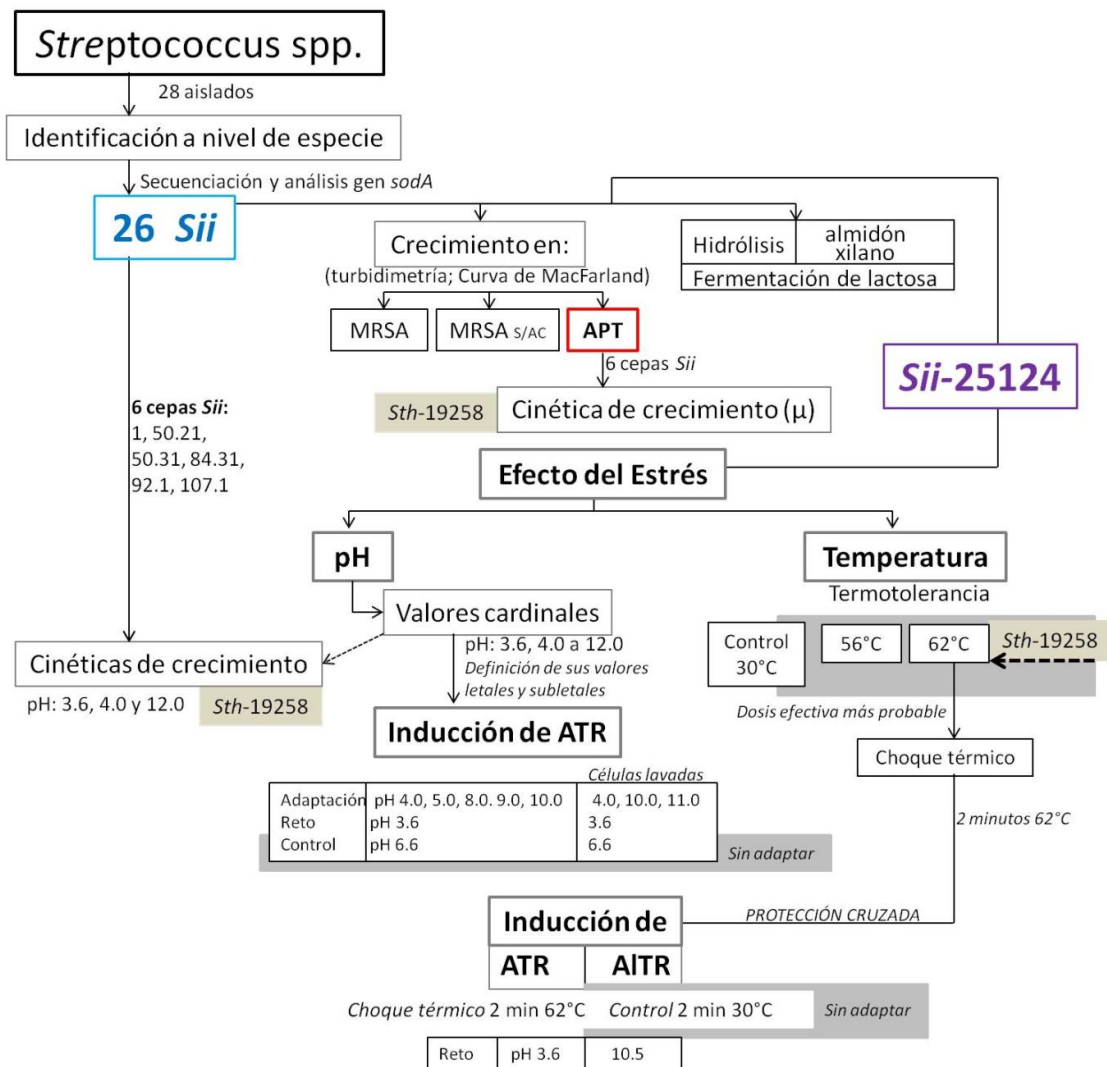


Figura 9. Síntesis de la estrategia metodológica para el estudio del comportamiento fisiológico de las cepas de *Streptococcus* spp. y *Sii*-25124 aislados del pozol ante diferentes condiciones. En la parte superior, aspectos para reconocer similitudes y diferencias de los aislados del pozol respecto a *Sii*-25124 y en la parte inferior (*Efecto del Estrés*), las estrategias para el estudio del comportamiento y supervivencia de *Sii*-25124 ante estrés por pH y por temperatura elevada. ATR. Respuesta de tolerancia a la acidez. AITR. Respuesta de tolerancia a la alcalinidad. S/Ac. Sin acetato, agente semi-selectivo en el medio MRS. *Sii*. *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*. *Sth*-19258. *S. thermophilus* ATCC 19258. μ . Velocidad específica de crecimiento expresada en h^{-1} .

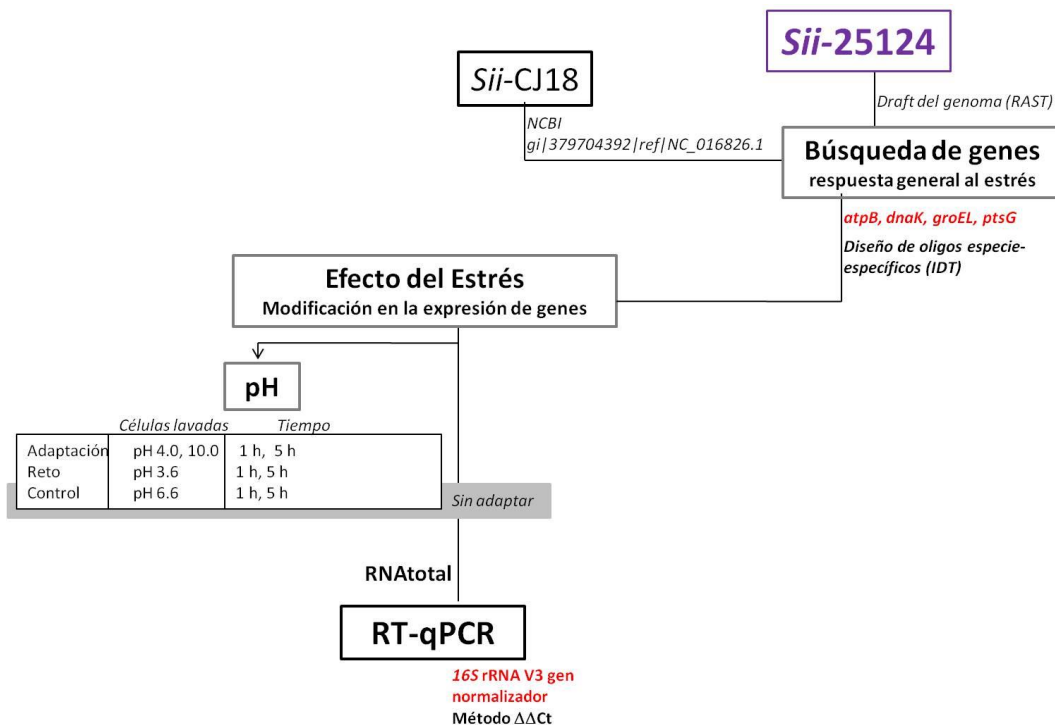


Figura 10. Estrategia metodológica para la evaluación de la expresión diferenciada de genes asociados a la respuesta general al estrés en *Sii-25124*, evaluados ante pH ácido y alcalino. *Sii. Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*. Bases de datos y herramientas utilizadas: IDT (Integrated DNA Technologies), <http://www.idtdna.com/site>, *PrimerQuest Tool*; NCBI, (National Center for Biotechnology Information), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, *Blast Tool*, *Gene* y *Genome Databases*. RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology), <http://rast.nmpdr.org/>.

5.1 Cepas de trabajo

Las cepas identificadas como *Streptococcus* spp. empleadas en este trabajo corresponden a los primoaislamientos obtenidos por Becerril-Sánchez (2012) a partir de una muestra de pozol mestizo de Villahermosa, Tabasco (2009) y guardan gran similitud fenotípica con la cepa antes identificada como *Streptococcus bovis/S. infantarius* subsp. *coli* 25124 [Díaz-Ruiz *et al.*, 2003].

Usando estas cepas, se corroboró su pureza para dar continuidad a su aislamiento, de ser necesario, de la siguiente manera: 50 μ L de cultivo conservado se reactivaron en caldo MRS con Almidón (MRSA, preparado por componentes como se indica en el Anexo A, usando como carbohidrato almidón soluble de papa al 2% p/v; J.T. Baker, India) y se incubó durante 24 h a 30° C. Se realizaron diluciones seriadas de 500 μ L en 4.5 mL de solución salina isotónica (SSI, NaCl al 0.85% p/v) y se sembró en agar MRSA y en agar APT (BD-Difco,

México) por agotamiento, incubando las placas 24 h a 30° C. Se observó la morfología macroscópica de las colonias obtenidas, se realizaron frotis y tinción de Gram para corroborar morfología microscópica buscando cocos Gram-positivos.

En los casos en que una cepa mostrara colonias con morfología macroscópica diferente y se correspondieran microscópicamente con cocos Gram-positivos, se picaron e inocularon independientemente en caldo APT (BD-Difco, México), repitiendo el proceso para obtener colonias aisladas en agar APT y corroborando nuevamente la pureza por medio de tinción de Gram de un frotis proveniente del caldo y una de las colonias crecidas en agar APT. De esta manera se obtuvieron las cepas indicadas en la Tabla 6 que se conservan en caldo APT con glicerol al 20% (v/v), en ultracongelación a -72° C. Estas bacterias actualmente forman parte de la colección de cepas del Laboratorio L-324 del Dpto. de Alimentos y Biotecnología del Conjunto E, Facultad de Química/UNAM.

Tabla 6. Cepas de *Streptococcus* spp. obtenidas de pozol de Villahermosa, Tabasco

Cepa	Identidad ARDRA [Becerril-Sánchez, 2012]	Identidad Vitek2 [Wacher, comunicación personal]	Probabilidad % Vitek	Cepas Aisladas [este trabajo]
<i>S. infantarius</i> -25124 Cepa principal				
11				11
49				49
56				56
1	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>S. alactolyticus</i>	95.00	1
50.1	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>S. mitis/S. oralis</i>	94.91	50.11 50.12 50.13
50.2	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>S. mitis/S. oralis</i>	93.88	50.21 50.22 50.23
50.3	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>S. mitis/S. oralis</i>	93.88	50.31 50.32
68.1	<i>S. bovis</i>	<i>S. sanguinis</i>	85.14	68.11 68.12
68.2	<i>S. bovis</i>	<i>S. mitis/S. oralis-S. sanguinis</i>	50.00-50.00	68.2
84.1	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>S. alactolyticus</i>	94.38	84.1
84.3	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>S. mitis/S. oralis</i>	93.65	84.31 84.32
92.1	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>S. infantarius</i> spp. coli/ <i>S. bovis</i>	94.38	92.1
93.1	<i>S. bovis</i>	<i>S. alactolyticus</i>	85.81	93.1
107.1	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>S. alactolyticus</i>	89.80	107.1
107.2	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>S. alactolyticus</i>	81.69	107.2
115.2	<i>Streptococcus</i> sp.	Sin Identificar	-	115.21 115.22
130.1	<i>S. bovis</i>	<i>S. alactolyticus</i>	95.00	130.1
130.2	<i>S. bovis</i>	<i>S. alactolyticus</i>	95.00	130.21 130.22
154.2	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>S. alactolyticus</i>	93.00	154.2

Adicionalmente se incluyen también tres cepas obtenidas en otro muestreo realizado en septiembre de 2007 [Rodríguez-Navarro & Villalva-Fuentes, 2010] (Tabla 6, celdas en gris) y la cepa antes identificada como *S. bovis*-25124 [Díaz-Ruiz *et al.*, 2003] pero que actualmente se tiene identificada como *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*-25124 (*Sii*-25124). Igualmente se ha trabajado con la cepa *S. thermophilus* ATCC 19258 proporcionada por el Cepario de la Facultad de Química/UNAM (Laboratorio 1C, primer piso, Edificio A).

Para la realización de la evaluación del comportamiento de *Streptococcus* spp. ante condiciones de estrés (por pH y temperatura), la cepa de trabajo principal es: *Sii*-25124, adicionalmente se trabajó con la cepa *S. thermophilus* ATCC 19258 y las identificadas como *Sii* (este trabajo): *Sii*-1, *Sii*-50.21, *Sii*-50.31, *Sii*-84.31, *Sii*-92.1 y *Sii*-107.1 de acuerdo a como se mencione en cada caso.

5.1.1 Conservación de cepas

Habiendo aislado exitosamente, a partir de la siembra en agar APT se recuperó una colonia con la morfología característica de la cepa y se inoculó en 4.5 mL de caldo APT incubando a 30° C durante 24 h. De este cultivo se transfirió una alícuota de 1 500 µL a un microtubo y se centrifugó 10 minutos a 10 000 rpm (Microcentrífuga Hermle Z160M; Barnstead International, EE. UU.). El sobrenadante se descartó y se lavaron las células con 1.5 mL de SSI, resuspendiendo nuevamente en el mismo volumen de SSI. Se centrifugó 10 min, 10 000 rpm y se repitió el lavado y el centrifugado 2 veces más, descartando el sobrenadante en cada ocasión (cosecha celular). Finalmente, se adicionaron 750 µL de medio APT con glicerol (al 20% v/v) y se resuspendieron las células. Del microtubo se transfirió a un criovial y se adicionaron 750 µL de medio con glicerol (al 20% v/v) para tener un volumen final de 1 500 µL, resuspendiendo para homogenizar. Estos crioviales se conservan en ultracongelación a -72°C.

La reactivación consiste en descongelar estas cepas y resuspender 30 µL en 4.5 mL de caldo APT, incubando a 30° C durante 24 h.

5.2 Identificación a nivel de especie de las cepas de *Streptococcus* spp. aisladas de pozol por secuenciación del gen de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (*sodA*)

5.2.1 Obtención de la secuencia del gen *sodA*

5.2.1.1 Cultivo y cosecha de células

Se reactivó la cepa y después del periodo de incubación se transfirió una alícuota de 1 mL a un tubo de ensayo con 9 mL de caldo APT fresco y nuevamente se incubó a 30° C durante 24 h.

De los tubos con caldo APT se recuperó 1 mL de cultivo transfiriendo a microtubos, trabajando por duplicado cada muestra. Las células se centrifugaron a 14 000 rpm durante 10 min. Este procedimiento se realizó dos veces más para obtener las células de un volumen de 3 mL, descartando el sobrenadante después de cada centrifugación. Tras el último ciclo de centrifugación se retiró todo el medio de cultivo remanente con micropipeta, procurando no extraer el pellet formado y se adicionaron 500 µL de SSI resuspendiendo el pellet por agitación, finalmente centrifugando 5 minutos a 14 000 rpm. Se retiró toda la SSI remanente con micropipeta y se mantuvo a -20° C hasta el momento de la extracción de DNA.

5.2.1.2 Extracción de DNA genómico

(Fast ID/DNA extraction kit; Genetic ID NA, Inc., EE. UU.)

La extracción se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante con las modificaciones indicadas en Domínguez-Ramírez (2013). Para efectuar la electroforesis horizontal (la preparación de gel de agarosa y la tinción de éste) para corroborar la extracción exitosa de DNA genómico, se procedió acorde a lo indicado en Domínguez-Ramírez (2013).

5.2.1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación parcial del gen *sodA*

La PCR se llevó a cabo considerando los oligonucleótidos (oligos): **d1** 5'-CCITAYCITAYGAYGCIYTIGARCC-3' y **d2** 5'-ARRTARTAIGCRTGYTCCCAIACRTC-3' dirigidos al gen *sodA* (I inosina; R adenina o guanina; Y citosina o timina) y que amplifican un fragmento de 480 bp; con un programa con una desnaturalización inicial de 3 min a 95° C, 30 ciclos de desnaturalización a 95° C por 30 s, alineamiento a 37° C por 60 s y extensión a 72° C por 60

s (Termociclador T-Personal Combi; Biometra, Alemania) [Poyart *et al.*, 2002]. En la Tabla 7 se enlistan los reactivos y las concentraciones correspondientes para la mezcla de reacción.

Tabla 7. Concentración de reactivos utilizados para la amplificación del gen *sodA* mediante PCR

Reactivo	Concentración del reactivo	Concentración del reactivo en tubo de reacción	µL
Buffer de la enzima	10x	1x	5
MgCl₂	25 mM	1.5 mM	3
dNTP's	10 mM	0.2 mM	1
Oligo d1		0.5 µM	1
Oligo d2		0.5 µM	1
Taq polimerasa		1 u/µL	1
DNA*	Variable	Variable	10
H₂O estéril		c. b. p.	9
Volumen total			50

*DNA ~250 ng/µL. [Poyart *et al.*, 2002]

Para apreciar si la extracción de DNA fue exitosa, se elaboró un gel de agarosa al 1% y se corrió una electroforesis con 90 V durante 30 minutos. Para la determinar la amplificación positiva del producto de PCR con los oligos degenerados d1-d2 se elaboró un gel de agarosa al 2%, corriendo la electroforesis a 70 V durante 90 minutos. Se recurrió a lo indicado en Domínguez-Ramírez (2013) para la elaboración del gel y tinción. La fotodocumentación se realizó con el equipo GelDocTM XR+ (BioRad, México).

5.2.1.4 Purificación del DNA amplificado (PCR CleanUp, Millipore, México)

La extracción de llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para corroborar la pureza de este DNA amplificado se realizó un gel de agarosa al 1.5% corriendo la electroforesis con 70 V, 60 minutos.

5.2.1.5 Determinación de la pureza de los fragmentos del gen *sodA* amplificados y cálculo de la concentración

Para poder llevar a cabo la determinación de la pureza y la concentración de los amplicones del gen *sodA*, se recurrió a la fotografía del gel de agarosa al 1.5%, éste se corrió en la electroforesis correspondiente, tiñendo con bromuro de etidio (0.5 mg/L). La fotografía se obtuvo con el equipo GelDocTM XR+ (BioRad, México) y la concentración del DNA amplificado fue calculada por medio de la Quantity Tool perteneciente al software *ImageLab*

3.0 del mismo fabricante. En el gel se incluyó un marcador de peso molecular con bandas de concentración conocida (GeneRuler LowRange DNA Ladder, Thermo; Scientific Fermentas) junto con dos muestras de DNA cromosomal de concentración conocida para ser usados como referencia para la curva de calibración que requiere el software.

5.2.2 Secuenciación del fragmento de *sodA* amplificado con el oligo d1 e identificación

La secuenciación estuvo a cargo de MacroGen Inc. (<http://macrogen.com/eng/>; Sequencing Kit: Big Dye®, Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems; Sequencer AB13730xl DNA Analyzer, 96 Capillary Type) a quien se le proporcionó el oligo d1 (Tabla 8) en una concentración 25 pmol para llevar a cabo la reacción. Se solicitó secuenciación estándar usando un oligo (forward).

Los resultados obtenidos fueron recibidos en formato *fasta*. Las secuencias fueron analizadas utilizando el software *BioEdit Sequence Alignment Editor* [Hall, 1999] y también se efectuó la comparación con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, EE. UU.) por medio de la herramienta Blast (utilizando el modo *Highly similar sequences*, algoritmo megablast y *Somewhat similar sequences*, algoritmo blastn).

5.2.3 Procesamiento de la información para su interpretación

5.2.3.1 Elaboración de dendrograma con secuencias del gen *sodA* de *Streptococcus* spp. utilizando el método de Neighbor-Joining

La identificación de las cepas de la colección de trabajo (Tabla 6) se hizo originalmente por medio de ARDRA [Becerril-Sánchez, 2012] y también por medio de pruebas bioquímicas (Vitek2®) [Wacher, comunicación personal], obteniendo datos a nivel de género y a nivel de especie respectivamente (en algunos casos). Sin embargo, ya que los resultados de las pruebas bioquímicas no proporcionan buena resolución en la identificación de especies del género *Streptococcus*, y en particular, el sistema Vitek2® puede generar datos ambiguos al estar diseñado para aplicación clínica, se recurrió a una herramienta de identificación taxonómica con mejor resolución. Esto es la secuenciación del gen *sodA* [Poyar *et al.*, 2000, 2002] y el correspondiente alineamiento con secuencias del GenBank (blast) y el

alineamiento múltiple entre ellas (ClustalW). Además, es importante confirmar su identidad complementando el blast realizado.

De este modo, para visualizar mejor la semejanza que guardan las secuencias entre ellas y los grupos que forman de acuerdo a la similitud entre los nucleótidos que las componen, se efectuó un agrupamiento (*clustering*) por el método de Neighbor-Joining (NJ). Para esto, se usaron las secuencias de las 28 cepas aisladas de pozol y también se utilizaron secuencias del mismo gen pero de otras especies obtenidas del GenBank a través del servidor del NCBI. En la Tabla 8 se indican los nombres de estas últimas y su número de ascensión en el GenBank (gb) o en EMB (emb) de acuerdo a la nomenclatura del NCBI.

Tabla 8. Cepas cuyas secuencias del gen *sodA* se utilizaron para elaborar diferentes dendrogramas

Otras Cepas	NCBI Accession
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	emb AM490310.1
<i>Enterococcus faecalis</i>	gb JN180473.1
<i>Lactococcus lactis</i>	gb U17388.1
<i>S. agalactiae</i>	emb Z49249.1
<i>S. alactolyticus</i>	emb AJ297181.1
<i>S. bovis</i>	gb AY344537.1
<i>S. gallolyticus</i>	gb JF820327.1
<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> CIP106106	emb AJ306979.1
<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> CJ18	gb CP003295.1
<i>S. luteciae</i>	emb AJ297188.1
<i>S. lutetiensis</i>	gb GU991777.1
<i>S. macedonicus</i>	gb GU991782.1
<i>S. oralis</i>	gb EU798267.1
<i>S. pyogenes</i>	emb AJ223292.1
<i>S. salivarius</i>	gb JN181304.1
<i>S. sanguinis</i>	gb AY943072.1
<i>S. thermophilus</i>	emb Z95921.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	gb AF121672.3

Clostridium botulinum ATCC 19397 se usó como grupo externo para efectuar el análisis. Así mismo, *Staphylococcus aureus* también se utilizó en este ensayo ya que dos cepas fueron identificadas como miembros de este género (cepas 115.21 y 115.22); *Lactococcus lactis* y *Enterococcus faecalis* fueron considerados también ya que además de formar parte de las BAL, anteriormente ambos géneros formaban parte del género *Streptococcus* pero por diferentes particularidades fueron separados para formar dos grupos aparte [Schleifer *et al.*, 1985; Schleifer & Kilpper-Bälz, 1987]. Igualmente, se introdujeron varias especies de *Streptococcus*, incluyendo ‘*Streptococcus luteciae*’ (el término más aceptado es *S. lutetiensis*, formalmente ‘*Streptococcus infantarius* subsp. *coli*’) y las secuencias de otras

cepas de *S. infantarius* subsp. *infantarius* (CJ18 y CIP106106), así como la cepa *Sii-25124* [Wacher, comunicación personal] para el análisis.

Todas las secuencias se utilizaron en formato *fasta*. El alineamiento (ClustalW) y el algoritmo para efectuar el Neighbor-Joining (versión 3.6a2.1), fueron realizados usando el software BioEdit versión 7.2.0 [Copyright 1986-1993, Joseph Felsenstein & the University of Washington], para los dendrogramas se utilizó la herramienta DNADIST versión 3.5c.

5.3 Determinación semicuantitativa del potencial amilolítico y xilanolítico de cepas de *Streptococcus* spp. aisladas de pozol

La colección de cepas fue evaluada a nivel semicuantitativo para determinar si poseían actividad amilolítica y xilanolítica utilizando el método de inmersión en yodo (*iodine flooding*) de la siguiente manera. Las cepas de la colección aisladas como parte de este trabajo, *Sii-25124*, las cepas 11, 49, 56, así como las cepas control: *Lactobacillus plantarum* A6 [Giraud *et al.*, 1991], *Weissella confusa* L9 (Lilis9 [Bolaños, 2004]) y *Cellulomonas flavigena* CDBB531 [Pérez-Avalos *et al.*, 1996; Horcasitas *et al.*, 1998], fueron reactivadas en caldo APT incubando 24 h a 30° C. Una alícuota de 500 µL de cultivo se inoculó en caldo MRSA y 500 µL en caldo MRS-Xilano (MRSX; xilano de abedul al 1.5% p/v; Sigma, Alemania) incubando 24 h a 30° C. Esto para inducir la adaptación al uso de estos carbohidratos, si es que le es posible a la célula hidrolizarlos. Después de esto se inoculó por picadura el agar correspondiente, agar MRSA o MRSX, incubando a 30° C, 48 h o 4 días respectivamente. La actividad se determinó por medio de la formación de halos de degradación (hidrólisis) visibles utilizando reactivo revelador (lugol: yoduro de potasio 1% p/v, yodo 2% p/v; J.T. Baker, México) en ambos casos, determinando el diámetro del halo. El control positivo para la actividad amilolítica es *L. plantarum* A6 y como control negativo *W. confusa* L9. *C. flavigena* es control positivo para la actividad xilanolítica.

5.4 Determinación de la capacidad de cepas de *Streptococcus* spp. aisladas de pozol para fermentar lactosa

Las cepas de la colección y *Sii-25124* fueron evaluadas para determinar si son capaces de fermentar la lactosa. Para ello se utilizó cultivo de 24 h y con alícuotas de 30 µL se inocularon viales con 7 mL de caldo rojo de fenol con lactosa (Dibico, México), incubando a 30° C. La

lectura se efectuó a las: 6, 24 y 48 h. Se utilizó como control positivo la cepa *E. coli* 95269 H10 [Sainz *et al.*, 2001] y como control negativo una cepa de *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium ATCC 14028.

5.5 Determinación de la concentración de biomasa, relación biomasa-densidad óptica

La concentración de biomasa se realizó de forma indirecta por medio de la determinación de DO_{600nm} (UV/Vis Spectrophotometer Lambda 3B, PerkinElmer, EE. UU.), relacionándola con una curva de DO_{600nm} vs. Peso seco.

Se transfirieron 500 μ L de cultivo de 24 horas en 4.5 mL caldo APT fresco y se incubó 24 h a 30° C. Tras 24 h se transfirió una alícuota de 5 mL a un matraz con 95 mL de caldo APT para tener 10^5 UFC/mL (ajustando el inóculo por espectrofotometría). Tras incubar 6 h a 30° C, las células se cosecharon por centrifugación (J2-21M/E Centrifuge; Beckman, EE. UU.) 15 minutos a 4° C, 14 000 rpm y se lavaron 2 veces con SSI, centrifugando con las mismas condiciones. Finalmente, las células se resuspendieron en 100 mL de agua destilada estéril y se realizaron diluciones en agua destilada estéril para tener suspensiones al 100, 90, 80, 75, 60, 50, 40, 25, 20 y 10% (v/v). Estas suspensiones se utilizaron para determinar la DO_{600nm} y después se filtraron para determinar el valor de la biomasa por peso seco.

Previamente al filtrado, membranas de 45 mm de diámetro y 0.45 μ m de poro (Millipore HVLP04700) se secaron a 70° C (horno, Binder, EE. UU.) hasta peso constante (peso inicial). Se montó la membrana en el equipo de filtración (Millipore), se humedeció uniformemente con agua destilada estéril y se procedió a filtrar, realizando un lavado final con 20 mL de agua destilada estéril. Después de filtrar, las membranas se secaron a 70° C hasta peso constante (peso final) y por diferencia entre éste y el peso inicial se determinó la masa celular de cada dilución.

5.6 Cinética de crecimiento de cepas de *Streptococcus* spp. aisladas de pozol en medio APT

Se llevó a cabo el estudio del crecimiento de las cepas seleccionadas bajo condiciones óptimas de desarrollo en caldo APT para proseguir el trabajo y tener un marco de referencia (bajo condiciones normales posee un pH de 6.6).

Para estudiar la cinética de crecimiento se recuperaron 500 μL de suspensión microbiana con crecimiento de 24 h y se inocularon en 4.5 mL de caldo APT fresco, incubando 24 h más a 30° C. Tras el tiempo de incubación se inoculó un matraz con un volumen final de 30 mL, ajustando el inóculo (Genesys 10S UV-Vis; ThermoScientific, EE. UU.) a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0.4 (como parte de este estudio se determinó que esto es equivalente a 10^6 UFC/mL); se homogenizó y se tomó una alícuota correspondiente a la muestra del tiempo cero ($t_{0\text{h}}$). El matraz con el cultivo se incubó a 30° C y se tomaron alícuotas de 1 mL para leer $\text{DO}_{600\text{nm}}$ cada hora hasta completar 8 horas; adicionalmente se tomó muestra a las 24 h y en algunos casos a 30 y 48 h. El blanco se ajustó con caldo APT estéril.

Se realizó cuenta en placa a $t_{0\text{h}}$, $t_{5\text{h}}$ y $t_{24\text{h}}$. Para la cuenta en placa se realizaron diluciones seriadas de 500 μL en 4.5 mL de SSI y de las diluciones de trabajo se inocularon 100 μL de suspensión bacteriana en placas Petri con Agar APT, por duplicado. Estas placas se incubaron a 30° C durante 24 h, momento en el cual se cuantificaron las UFC (unidades formadoras de colonias). Para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento (μ , expresado en h^{-1}) se utilizó el logaritmo natural (Ln) de las UFC/mL en la fase logarítmica de crecimiento.

La curva de crecimiento se realizó por triplicado para las cepas: *Sii-1*, *Sii-50.21*, *Sii-50.31*, *Sii-84.31*, *Sii-92.1*, *Sii-107.1*, *Sii-25124* y *S. thermophilus* ATCC 19258.

5.7 Estudio de la supervivencia bacteriana como respuesta a estrés

5.7.1 Efecto del pH en *Sii-25124*

5.7.1.1 Determinación de los valores cardinales de pH

Quinientos μL de suspensión microbiana con crecimiento de 24 h se inocularon en 4.5 mL de caldo APT fresco, incubando a 30° C durante 24 h más. Posteriormente se procedió al ajuste del inóculo para las pruebas de reto, para inocular células entrando a fase estacionaria con una cuenta inicial de 10^6 UFC/mL. El uso de un cultivo en estas condiciones es importante para las pruebas de reto pues en esta fase las células están entrando a un estado en que suelen presentar mayor resistencia ante diferentes formas de estrés.

Tras el ajuste de inóculo correspondiente, se incubó el precultivo durante 5 horas, tiempo en que, acorde con el estudio de las cinéticas de crecimiento de las cepas de trabajo, se comienza la fase estacionaria en caldo APT a 30° C.

Alícuotas de 1.2 mL de precultivo se inocularon en un volumen final de 12 mL de caldo APT con pH ajustado para tener una carga microbiana inicial de 10^6 UFC/mL. Los valores de pH a evaluar fueron: 4.0, 5.0, 6.6 (control), 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 y 12.0, incubando a 30° C y tomando muestra a t_{0h} , t_{1h} , t_{2h} , t_{3h} , t_{4h} , t_{5h} y t_{24h} para determinar DO_{600nm} (Genesys 10S UV-Vis; ThermoScientific, EE. UU.). Valores ácidos por debajo de pH 6.6 se ajustaron con ácido láctico (J. T. Baker, 87.9% de pureza) y valores alcalinos por arriba de pH 6.6 con NaOH (Mallinckrodt AR) 1M.

Adicionalmente, a t_{5h} y t_{24h} se recuperó inóculo para efectuar cuenta en placa, realizando dilución seriada en SSI y sembrando 100 μ L en agar APT (pH normal, 6.6) e incubando de 24 a 48 h a 30° C para realizar la cuenta de UFC. Cada siembra en placa se efectuó por duplicado.

5.7.1.2 Efecto del pH ácido en la supervivencia (acid killing test) y en la inducción de respuesta de tolerancia a la acidez en *Sii-25124*

Se inocularon 500 μ L de cultivo de 24 h en 4.5 mL de caldo APT fresco. Tras incubar 24 h a 30° C, este cultivo fue utilizado para inocular 1 400 μ L en matraces con 25 mL de caldo APT ajustados a pH 4.0, 10.0 y 11.0, al igual que en un tubo con 10 mL de caldo APT (pH 6.6) que fue inoculado con 400 μ L (representa el control de células sin adaptación). Posterior a la incubación de 5 h a 30° C (periodo de adaptación), las células se cosecharon centrifugando 15 minutos a 4° C, 14 000 rpm y se lavaron 2 veces con SSI, centrifugando con las mismas condiciones. Finalmente, se resuspendió en suficiente SSI para ajustar el inóculo por DO_{600nm} para tener de 10^6 a 10^7 UFC/mL al inocular los medios para la prueba de reto con pH letal. De cada suspensión de células (adaptadas a pH 4.0, 10.0, 11.0 y del control, es decir, células no adaptadas) se recuperó una alícuota de 1 mL y se inocularon los caldos de APT (9 mL) ajustados a pH 3.6, recuperando muestras a los t_{0min} , t_{5min} , t_{15min} , t_{30min} y t_{60min} para llevar a cabo cuenta en placa en agar APT, incubando a 30° C de 24 a 48 h para determinar porcentaje de supervivencia (la cuenta a t_0 corresponde al 100%).

5.7.2 Comparación del desarrollo de cepas de *Streptococcus* spp. aisladas de pozol en los valores de pH umbral para *Sii-25124*: cinética de crecimiento en pH 3.6, 4.0 y 12.0

De acuerdo al dendrograma construido por NJ, las cepas aisladas de pozol identificadas como *S. infantarius* subsp. *infantarius* por medio de la secuenciación parcial del gen *sodA* forman un cluster consistente con cepas tipo de esta misma subespecie. Así mismo, en esta agrupación de las cepas obtenidas de pozol se pueden apreciar 6 clusters (Figura 15, sección “6.3.1.1 Elaboración de dendrograma con secuencias del gen *sodA* de *Streptococcus* spp. utilizando el método de Neighbor-Joining”, en Resultados y Discusión). De cada uno de estos clusters se seleccionó una cepa para determinar su desarrollo en caldo APT con pH 3.6, 4.0 y 12.0 para contrastar con los resultados del crecimiento observados en la cepa *Sii-25124* y saber si poseen el mismo patrón de desarrollo o similar. Las cepas seleccionadas corresponden a: *Sii-1*, *Sii-50.21*, *Sii-50.31*, *Sii-84.31*, *Sii-92.1* y *Sii-107.1*.

De cada cepa se inocularon 3 mL de cultivo de 24 h en 27 mL de caldo APT y se incubó 5 h a 30° C para obtener células llegando a fase estacionaria. Se cosecharon y lavaron células como ya se ha descrito y se resuspendió en SSI para obtener un inóculo inicial de 10^7 UFC/mL. Con esto se inocularon 1.5 mL de cultivo en tubos con 13.5 mL de caldo APT ajustados a pH 3.6, 4.0 y 12.0. El seguimiento del crecimiento del cultivo se realizó por DO_{600nm} . Los tiempos de muestreo para los medios con pH 3.6 fueron: t_{0min} , t_{5min} , t_{10min} , t_{15min} , t_{20min} , t_{25min} , t_{30min} y t_{3h} . Adicionalmente a t_{30min} y t_{3h} se tomó una asada del cultivo para sembrar por estría simple una placa con agar APT y corroborar viabilidad, incubando de 24 a 48 h a 30° C. Para los medios con pH 4.0 y 12.0 los tiempos de muestro fueron: t_{0h} , t_{1h} , t_{2h} , t_{3h} , t_{4h} , t_{5h} , t_{24h} y t_{48h} . Igualmente, se sembró una asada del cultivo en agar APT para corroborar viabilidad a t_{24h} y t_{48h} .

5.7.3 Efecto de altas temperaturas sobre *Sii-25124*

5.7.3.1 Determinación del valor de reducción decimal (D_{56} y D_{62})

El valor de reducción decimal o tiempo de termodestrucción (valor D) se define como el tiempo necesario para que el número de supervivientes de una población microbiana expuesta a un tratamiento térmico se reduzca al 10% del valor inicial. Es decir, para que el logaritmo del número de supervivientes disminuya 1 unidad, siendo usado como una medida

de la termotolerancia de los microorganismos. El valor D será particular para cada temperatura por lo que ésta suele indicarse como un subíndice. Así, valor D_{56} indica el valor de termodestrucción de la cepa en estudio a 56°C .

Para llevar a cabo esta determinación, se inocularon 10 mL de caldo APT fresco con 350 μL de cultivo de 24 h, incubando a 30°C durante 5 h. Al obtener el cultivo en fase estacionaria se procedió a cosechar y lavar células con SSI como ya se ha descrito, resuspendiendo finalmente en 3 mL de SSI (para tener una concentración de 10^6 UFC/mL). Con esta suspensión se inoculó 1 mL en un tubo con 9 mL de caldo APT que había permanecido 1 h a 30°C , misma temperatura a la que se incubó durante el experimento (control); también se inoculó 1 mL en un tubo con 9 mL de caldo APT que había sido mantenido en baño térmico a 56°C durante 1 hora y el cual se mantuvo bajo estas condiciones durante el experimento (temperatura de reto). De cada tubo se recuperaron alícuotas correspondientes a $t_{0\text{min}}$ inmediatamente después de inocular y homogenizar, resuspendiendo en viales con 4.5 mL de agua peptonada (peptona 1% p/v, BD-Bacto, NaCl 0.5% p/v, J. T. Baker) previamente enfriados en baño de agua-hielo (0°C). La suspensión en agua peptonada se mantuvo en el baño de agua-hielo durante medio minuto y se procedió a efectuar dilución seriada en SSI para llevar a cabo la siembra para cuenta en placa. El vial de agua peptonada corresponde a la primera dilución (10^{-1}).

De esta misma manera se procedió a tomar muestra del tubo a 56°C a los tiempos: $t_{2\text{min}}$, $t_{4\text{min}}$, $t_{8\text{min}}$, $t_{10\text{min}}$, $t_{15\text{min}}$, $t_{20\text{min}}$, $t_{30\text{min}}$, $t_{60\text{min}}$, $t_{80\text{min}}$. Otra muestra del tubo control (incubado a 30°C) fue tomada a $t_{60\text{min}}$.

Durante todo el procedimiento se mantuvo el control de la temperatura del baño térmico y del baño de agua-hielo utilizando un tubo adicional con caldo APT sin inocular.

Todas las placas de agar APT fueron inoculadas con 100 μL de dilución, plaqueando por duplicado e incubando a 30°C ; la lectura de UFC se realizó a las 24 y 48 h.

Para determinar el valor D_{62} se procedió de la misma manera pero los tiempos de muestreo corresponden a: $t_{0\text{min}}$, $t_{1\text{min}}$, $t_{2\text{min}}$, $t_{3\text{min}}$, $t_{4\text{min}}$, $t_{5\text{min}}$, $t_{10\text{min}}$, $t_{11\text{min}}$ y $t_{15\text{min}}$. Y las muestras del control incubado a 30°C fueron obtenidas a $t_{0\text{min}}$ y $t_{60\text{min}}$. Adicionalmente se trabajó con la

cepa *S. thermophilus* ATCC 19258, cepa termotolerante (Hutkins, 2000; Flint *et al.*, 2002), manteniendo en baño térmico y tomando muestras a los tiempos: $t_{0\text{min}}$, $t_{1\text{min}}$, $t_{2\text{min}}$, $t_{3\text{min}}$, $t_{4\text{min}}$, $t_{5\text{min}}$, $t_{10\text{min}}$, $t_{15\text{min}}$, $t_{20\text{min}}$ y $t_{50\text{min}}$. Igualmente, se mantuvo otro tubo inoculado con *S. thermophilus* ATCC 19258 a 30° C, tomando muestra de él a: $t_{0\text{min}}$ y $t_{50\text{min}}$.

5.7.4 Protección cruzada a pH ácido y a pH alcalino inducida por choque térmico

Se inocularon 5 mL de cultivo de 24 h de la cepa *Sii-25124* en 45 mL de caldo APT fresco y se incubó durante 5 h a 30° C. Posteriormente se cosecharon células. Las células lavadas se resuspendieron en SSI para tener un inóculo inicial con una concentración de 10^9 UFC/mL. Inoculando en tubos con 9 mL de caldo APT fresco: el correspondiente al Choque Térmico (CT) que se mantuvo en baño térmico a 62° C y el control que se mantuvo a 30° C. El choque térmico a 62° C se efectuó durante 2 minutos, mismo tiempo que se consideró mantener el cultivo control a 30° C. Tras este tiempo, se inoculó 1 mL del cultivo CT o del cultivo control en 9 mL de caldo APT ajustado a pH 3.6 y 1 mL de cultivo en 9 mL de caldo APT ajustado a pH 10.0 con el fin de determinar si el choque térmico genera protección cruzada para tolerar estrés por acidez y/o por alcalinidad.

Las muestras para cuenta en placa se tomaron a $t_{0\text{min}}$, $t_{5\text{min}}$, $t_{15\text{min}}$, $t_{30\text{min}}$ y $t_{60\text{min}}$, realizando dilución seriada e inoculando 100 μL en placas con agar APT. Las placas se incubaron a 30°C efectuando lectura a las 48 h. Se evaluó el porcentaje de supervivencia por medio de la cuenta en placa considerando el t_0 de cada tubo como el 100% para cada caso.

5.8 Estudio de la expresión diferenciada de genes ante la respuesta a estrés

5.8.1 Búsqueda de genes relacionados con estrés en *Sii-25124*

Los genes cuya expresión diferenciada se ha visto relacionada con los tipos de estrés estudiados en este proyecto (ácido, alcalino, térmico) que se propusieron para el diseño de oligos se describen en la Tabla 9. Las secuencias correspondientes a estos genes pertenecen a bacterias de diferentes especies de estreptococos y fueron obtenidas del GenBank (en formato *fasta*) a través de la base de datos *Gene* del NCBI.

Tabla 9. Genes que han mostrado expresión diferenciada ante diferentes tipos de estrés propuestos para su identificación en el genoma de *Sii-25124* y para el diseño de oligos específicos para determinar si hay variaciones en su expresión debido a estrés por pH y por temperatura

gen	Tipo de proteína	gen	Tipo de proteína
<i>atpB</i>	Subunidad a de F ₁ F ₀ -ATPasa	<i>hrcA</i>	Represor transcripcional inducido por calor
<i>dnaK</i>	Hsp - Chaperona	<i>grpE</i>	Hsp activadora de DnaK
<i>dnaJ</i>	Hsp - Chaperona	<i>recA</i>	Recombinasa
<i>ptsG</i>	Sistema de transporte de glucosa	<i>clpP</i>	Proteasa ATP dependiente, unidad proteolítica
<i>groEL</i>	Hsp - Chaperonina	<i>clpC</i>	Subunidad c de unión a ATP
<i>groES</i>	Hsp - Co-chaperona	<i>clpE</i>	Subunidad de unión a ATP

Hsp. Heat shock protein, proteína de choque térmico.

La base de datos *Genome* del NCBI cuenta con la secuencia completa del genoma de *S. infantarius* subsp. *infantarius* CJ18, con el número de acceso NC_016826.1 [Jans *et al.*, 2012b] y el *draft* de *S. infantarius* subsp. *infantarius* ATCC BAA-102^T con el número de acceso NZ_D5572694.1 (dividido en 21 fragmentos). Sólo *Sii-CJ18* (cepa obtenida de un producto lácteo fermentado) fue usado como referencia por las dificultades técnicas que resultan de la consulta y accesibilidad de los scaffolds de la cepa ATCC (cepa de origen clínico). De este modo, con cada secuencia obtenida para los genes propuestos, de forma independiente, se realizaron alineamientos contra el genoma de *Sii-CJ18* por medio del *blast* especializado: *Align (bl2seq)* del mismo servidor (NCBI), utilizando la opción *Somewhat similar sequences* (algoritmo blastn) o *Highly similar sequences* (algoritmo megablast). Los datos buscados para un buen alineamiento para un posible gen fueron: localización en el genoma de las cepas de referencia, porcentaje de identidad (respecto a la secuencia de la cepa usada como referencia), Valor de E, dirección en la hebra de DNA, porcentaje de pares de bases (bp, abreviación del inglés) semejantes entre la secuencia de *Sii* y la de referencia, así como el total de bp en el gen.

Para determinar si en efecto se tiene el gen diana, la secuencia identificada en *Sii-CJ18* fue seccionada y utilizada con *Align* para otro alineamiento múltiple contra toda la base de datos *Gene*, usando la opción *Highly similar sequences* (megablast) para dar mayor astringencia a la búsqueda.

Lo anterior se llevó a cabo pues aunque posteriormente se accedió al *draft* correspondiente al genoma de la cepa *Sii-25124* en el servidor *Rapid Annotations using Subsystems Technology* (RAST: <http://rast.nmpdr.org/>), donde se buscaron los genes: *atpB*, *dnaK*, *groEL* y *ptsG*, al no estar depositada en una base de datos como el NCBI no se

considera del todo confiable, contrastando con las secuencias anteriores se buscó mejorar la confiabilidad en la predicción. Las secuencias sugeridas como las más probables para ser el gen diana fueron trabajadas con las herramientas proporcionadas por el mismo servidor para visualizar el alineamiento con secuencias de otras bacterias y el contexto genómico.

Las secuencias predichas para estos genes en *Sii-25124* se analizaron posteriormente con el programa BioEdit, añadiendo también secuencias obtenidas en el NCBI para otros estreptococos y las secuencias identificadas en *Sii-CJ18*. El objetivo fue efectuar el alineamiento múltiple (ClustalW) y construir dendrogramas por NJ para corroborar la similitud con *Sii-CJ18* y *S. lutetiensis* 033, apoyando estos resultados por medio de un *blastn* (a través del NCBI). Así, acorde con la similitud que guardan las secuencias de estos genes en *Sii-25124*, *Sii-CJ18* y *S. lutetiensis* 033, se planteó considerarlos para el diseño de oligonucleótidos para qPCR.

5.8.2 Efecto del estrés por pH sobre la expresión de genes

5.8.2.1 Diseño de oligonucleótidos específicos para genes de respuesta general y respuesta específica a estrés

Los genes a los que se dirigen los oligos diseñados son *atpB* (subunidad *a* de F₁F₀-ATPasa), *dnaK* (chaperona, hsp70), *groEL* (chaperona de la familia hsp60) y *ptsG* (permeasa específica de glucosa del PEP-PTS). Los datos obtenidos del análisis comparativo de las secuencias de estos genes del *draft* del genoma de *Sii-25124* y los datos de *Sii-CJ18* y de *S. lutetiensis* 033 se emplearon para este diseño.

Se utilizó la herramienta *PrimerQuest Tool* del servidor de *Integrated DNA Technologies* (IDT: www.idtdna.com/site; 19 octubre, 2015), introduciendo en formato *fasta* la secuencia del gen blanco, con la opción de diseño para PCR (2 *primers*), ajustando los parámetros (*Custom Design Parameters*) teniendo las siguientes consideraciones [Head, 2004; Koolman & Röhm, 2004]:

- ♦ Largo de 15-20 bp, tamaño del amplicón de 90 a 130 pb
- ♦ 50-60% GC para el producto de amplificación y para los oligos
- ♦ Temperatura de desnaturalización (T_m) entre 55-65° C
- ♦ Extremos 3' no complementarios para evitar formar dímeros, pero deben tener 1 o 2 nucleótidos para formar GC, evitando tener T
- ♦ Evitar *tándems* de 5 o más nucleótidos GC o AT consecutivos
- ♦ Evitar la formación de horquillas

Un resultado favorable de la PCR estará definida por dos factores de acuerdo con el objetivo del uso de ésta: 1) Especificidad para tener mínima hibridación con DNA que no es el blanco y 2) Cobertura, p. ej., cuántos miembros del clado (grupo filogenético) responden amplificando el fragmento esperado; esto dependerá de la calidad y cantidad de secuencias usadas para el diseño de los oligos [Stach *et al.*, 2003]. En este caso los oligos diseñados se plantearon específicos para *Sii* pues para su diseño sólo se tomaron en consideración secuencias de la especie *S. infantarius* (*Sii-25124*, *Sii-CJ18*, *S. lutetiensis*). Si bien, analizar la especificidad respecto a otras especies cercanas filogenéticamente no es parte de los objetivos de este trabajo.

Con lo anterior se generaron varios juegos de oligos (directos e inversos) para cada gen. Así mismo, para cada oligo se llevaron a cabo pruebas *in silico*: se evaluó la formación de horquillas (herramienta proporcionada por el mismo servidor con cálculo de ΔG , T_m , etc.), se corroboró especificidad por medio del algoritmo *blastn* (recurriendo al NCBI por liga directa con el servidor del IDT) y se verificó también el amplificado generado por cada juego de oligos por medio del mismo algoritmo (directamente en el servidor NCBI).

Los criterios finales para la elección del juego de oligos para cada gen fueron: el mínimo de horquillas formados, que las T_m de éstos no se correspondieran con las temperaturas implicadas en la PCR, la ausencia de tándems de 5 o más nucleótidos GC o AT consecutivos a lo largo de los oligos y la presencia de 1 o 2 nucleótidos para formar GC en 3', lo cual mejora la unión del oligo y la amplificación por la *Taq* polimerasa.

La síntesis y purificación fueron llevadas a cabo por Uniparts, México.

5.8.2.2 Validación *in vitro* de oligonucleótidos, PCR en punto final

Para corroborar la amplificación de los fragmentos esperados acorde al diseño de oligos, se recurrió a una amplificación por PCR en punto final utilizando DNA genómico, éste se obtuvo de las cepas *Sii-25124*, *Sii-92* y *S. thermophilus* ATCC 19258.

A partir de un cultivo de 24 horas en caldo APT, se cosecharon células y se realizó la extracción del DNA con el Fast ID/DNA extraction kit (Genetic ID NA, Inc., EE. UU.).

La concentración y calidad del DNA obtenido se determinó por medio del NanoDrop (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, AccesoLab, México). Este DNA fue utilizado para la PCR correspondiente (T Personal Thermocycler, Biometra, Reino Unido) con un ciclo de desnaturalización inicial a 95° C durante 5 min, 29 ciclos de desnaturalización a 94° C 1 min, alieneamiento a 60° C por 1 min y extensión a 72° C por 1 min, terminando con una extensión final durante 10 min a 72° C. La concentración de reactivos está indicada en la Tabla 10.

Tabla 10. Concentración de reactivos utilizados en la reacción de PCR (Taq PCR Core Kit; QIAGEN, Alemania)

Reactivo	Concentración del reactivo	Concentración del reactivo en tubo de reacción	µL
10x Buffer CoralLoad*	10x	1x	2.50
5x Solución Q	5x	1x	5.00
dNTP mix	10 mM**	0.2 mM	0.50
Oligo Fw	10 µM	0.5 µM	1.25
Oligo Rv	10 µM	0.5 µM	1.25
Taq polimerasa	5 U/µL	0.625 U	0.13
DNA***	Variable	Variable	1.00
H ₂ O estéril libre de RNAsas		c. b. p.	13.38
Volumen total			25.00

*Contiene MgCl₂ 15 mM; **dNTP mix, 10µM cada uno; ***DNA ~50 ng/µL

Para apreciar si la amplificación fue exitosa se elaboró un gel de agarosa al 2% y se corrió una electroforesis con 80 V durante 40 minutos.

5.8.2.3 Evaluación de la expresión diferenciada de genes por RT-qPCR

5.8.2.3.1 Cultivo de células bajo condiciones de estrés con pH ácido y alcalino

Se reactivó la cepa *Sii-25124* bajo condiciones de rutina en caldo APT, efectuando un segundo cultivo en caldo fresco reinoculando en una proporción 1:10, incubando 24 horas; se transfirió a caldo fresco una segunda ocasión, para incrementar la carga celular, inoculando nuevamente en una proporción 1:10 para obtener dos matraces de 500 mL de cultivo. Tras la incubación de 24 horas, las células se cosecharon por centrifugación (Centrífuga Beckman, rotor JA-14; Beckman Coulter Inc., EE. UU.) utilizando 10 000 rpm, 10 minutos a 4° C, lavando con SSI dos veces y centrifugando bajo las mismas condiciones. El pellet se resuspendió en 160 mL de SSI y la suspensión se utilizó para inocular (en una proporción

1:10) los caldos APT con pH modificado, trabajando por duplicado cada valor de pH. Se trabajó con caldo APT (volumen final de 200 mL) sin modificar (pH 6.6) como control; pH ácido de 3.6 y 4.0 (ajustado con ácido láctico) y pH alcalino 10.0 (ajustado con NaOH 3 M).

Tras la inoculación los medios fueron incubados a 30° C y se recuperaron 100 mL de cada uno de ellos tras 1 hora de incubación (t_1) y otra muestra tras 5 horas de incubación (t_2). Al realizar el muestreo de 100 mL de cultivo, este volumen fue recibido en 150 mL de buffer de fosfatos 0.1M pH 7.5 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, J. T. Baker, México) y se cosecharon las células por centrifugación bajo las condiciones ya descritas, realizando 2 lavados con SSI y obteniendo el pellet finalmente en un microtubo. El remanente de SSI fue retirado con micropipeta y las células fueron conservadas en congelación (-20° C) hasta el momento de realizar la extracción de RNA total. El experimento se llevó a cabo por duplicado, de forma independiente.

5.8.2.3.2 Extracción de RNA total

La extracción se efectuó por el método de Trizol. Al pellet celular recuperado se le adicionaron 800 μL de Trizol (Tri-Reagent; Molecular Research Center, EE. UU.). Se adicionaron 200 μL de cloroformo frío (Cloroformo al 99+%; Sigma, EE. UU.), mezclando por inversión 10 veces. Las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm, 15 minutos a 4° C y se recuperó la fase acuosa transfiriendo a un nuevo microtubo; se adicionaron 500 μL de isopropanol frío y se incubó 20 minutos a -70° C.

Tras la incubación en frío, las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm, 15 minutos a 4° C. Se descartó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de etanol al 75% frío (Alcohol Etílico Absoluto; Reactivos y Productos Químicos Finos, México). La dilución de etanol absoluto se preparó con agua inyectable (PiSA, México) la cual también fue utilizada en las reacciones de PCR, retro-transcripción y qPCR.

Las muestras fueron centrifugadas bajo las condiciones descritas, volviendo a descartar el sobrenadante y adicionando 0.5 mL de etanol al 75% (frío), centrifugando nuevamente. Se descartó el sobrenadante y se permitió secar el remanente de etanol a temperatura ambiente. El pellet obtenido fue resuspendido en 40 μL de agua inyectable. La calidad e

integridad del RNA total extraído se determinó utilizando el equipo NanoDrop (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, AccesoLab, México).

5.8.2.3.3 Obtención de cDNA por retrotranscripción (RT-PCR)

Se utilizó el volumen de suspensión equivalente a 3 µg de RNA total; se adicionó 1 µL de Oligo T (Oligo(dT)15 Primer; Promega, EE. UU.) completando el volumen a 15 µL con agua inyectable (PiSA, México). La mezcla se incubó 5 minutos a 70° C en termociclador (T Personal Thermocycler, Biometra, Reino Unido). Trabajando en hielo, se adicionaron 5 µL de buffer de la enzima (M-MLV 5x Buffer; Promega, EE. UU.), 1.5 µL de dNTPs (dNTP Mix, 10 mM; Promega, EE. UU.) y 1 µL de enzima RT (M-MLV Reverse Transcriptase; Promega, EE. UU.), completando el volumen a 25 µL con agua inyectable (PiSA, México). La mezcla se incubó 60 minutos a 42° C en termociclador, adicionando un tiempo de espera de 10 minutos a 4° C (T Personal Thermocycler, Biometra, Reino Unido). El cDNA obtenido se cuantificó en NanoDrop, considerando una buena concentración de 1 000 a 2 000 ng.

5.8.2.3.4 Análisis de la expresión de los genes de interés por RT-qPCR

Para preparar la mezcla de reacción se adicionaron, por reacción: 15.0 µL de Master Mix (Taq 1.1x Master Mix, 2.0 mM MgCl₂; Ampliqon, Dinamarca), 0.5 µL de oligo Forward y 0.5 µL de oligo Reverso, 0.5 µL de Colorante EvaGreen (EvaGreen Dye, 20x in water; Biotium, EE. UU.), 0.3 µL de Colorante ROX (ROX Reference Dye; Invitrogen, Thermo Scientific, México), entre 100 a 150 ng/µL de cDNA y agua inyectable (PiSA, México) para completar un volumen final de 20.0 µL.

Se evaluó la expresión de los genes: *atpB*, *dnaK*, *groEL*, *ptsG* y se utilizó el gen 16S rRNA como gen de referencia, amplificado por medio de los oligos 338V3For (5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-) y 158V3Rev (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-), ambos sintetizados por Sigma-Aldrich, México.

La qPCR se llevó a cabo en el equipo Rotor-Gene Q (Qiagen, Alemania), Rotor-Gene Q Series Software v2.0.2 (Qiagen, Alemania), con un rotor de 36, utilizando un programa de dos pasos: 95° C, 10 segundos y 60° C, 45 segundos, repetido en 40 ciclos.

La recopilación de datos se realizó utilizando el software del equipo, Rotor-Gene Q Series Software v2.3.1.49 (Qiagen, Alemania), y se efectuó cuantificación relativa normalizando con el gen 16S rRNA, utilizando como control los datos obtenidos en pH 6.6, y se utilizó el método Delta delta Ct (doble delta, $\Delta\Delta Ct$ [Livak & Schmittgen, 2001]) para estimar cambios en la expresión de los genes de interés. Los valores de Ct se calcularon considerando un *Threshold* (umbral) de 0.1, utilizando el mismo software del equipo para una estimación automática.

Ct (threshold cycle, ciclo umbral) también puede ser referido como Cq (quantification cycle, ciclo de cuantificación), Cp (crossing point, punto de cruce) o TOP (take-off point, punto de arranque) y se corresponde con el punto (ciclo de la PCR) en el que la fluorescencia de la reacción comienza a ser detectada por encima de la línea base (o de fondo) de forma estadísticamente significativa.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Cepas de trabajo

Después de corroborar la pureza (o aislamiento) de las cepas de *Streptococcus* spp., se obtuvieron un total de 28 cepas que ahora forman parte de la colección del Laboratorio L-324 del Dpto. de Alimentos y Biotecnología del Conjunto E, Facultad de Química UNAM. En la Tabla D.1 (Anexo D) se muestra la descripción de las mismas junto con las tres cepas del muestreo de septiembre de 2007 [Rodríguez-Navarro & Villalva-Fuentes, 2010] y la cepa *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*-25124.

6.2 Identificación a nivel de especie de las cepas de *Streptococcus* spp. aisladas de pozol por secuenciación del gen de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (*sodA*)

6.2.1 Obtención de la secuencia del gen *sodA*

6.2.1.1 Extracción de DNA y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La identificación de la mayor parte de las cepas se hizo originalmente por medio de ARDRA [Becerril-Sánchez, 2012] y también por medio de pruebas bioquímicas (Vitek2® [Montiel, comunicación personal]), sin embargo, no han ofrecido la suficiente resolución en la identificación satisfactoria a nivel de especie y por ello se recurrió a la secuenciación del gen *sodA* (oligos d1-d2) [Poyar *et al.*, 2000, Poyart *et al.*, 2002] y el correspondiente alineamiento comparativo con secuencias del GenBank (algoritmo *blastn*), considerándose una mejor aproximación. En la figura 11 se muestran ejemplos de la amplificación exitosa, obteniendo fragmentos cercanos a lo reportado: 480 bp [Poyart *et al.*, 2002].

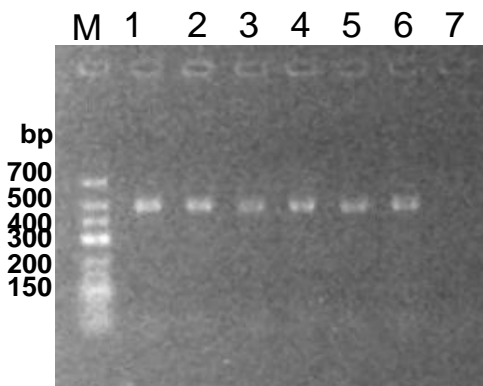


Figura 11. Ejemplo de gel de agarosa donde se aprecia la separación electroforética de los productos de PCR utilizando los oligos d1-d2 (480 bp), dirigidos al gen *sodA*. (M) Marcador de peso molecular (Gene Ruler Low Range DNA Ladder, Fermentas), cepa (1) 50.12, (2) 50.22 (3) 50.23, (4) 50.31, (5) 50.32, (6) 92.1, (7) Control negativo de DNA para la PCR. Gel de agarosa al 2%, electroforesis con 70 V, 60 min.

6.2.1.2 Determinación de la pureza de los fragmentos del gen *sodA* amplificados y cálculo de la concentración

Los productos amplificados por PCR fueron purificados y se muestran en la Figura 12, con la cual se estimó la concentración a través de densitometría usando la “Quantity Tool” (ImageLab 3.0, BioRad), del fotodocumentador GelDoc™ XR+ (BioRad). El carril M (Marcador de peso molecular) se usó para generar la curva patrón para estimar la concentración de los amplificados. Los números corresponden a los asignados a cada una de las cepas de *Streptococcus* spp. aisladas de pozol. Adicionalmente, en la Tabla 11 se indican las cepas, el número asignado a cada una como *muestra* y la concentración calculada con ayuda del software.

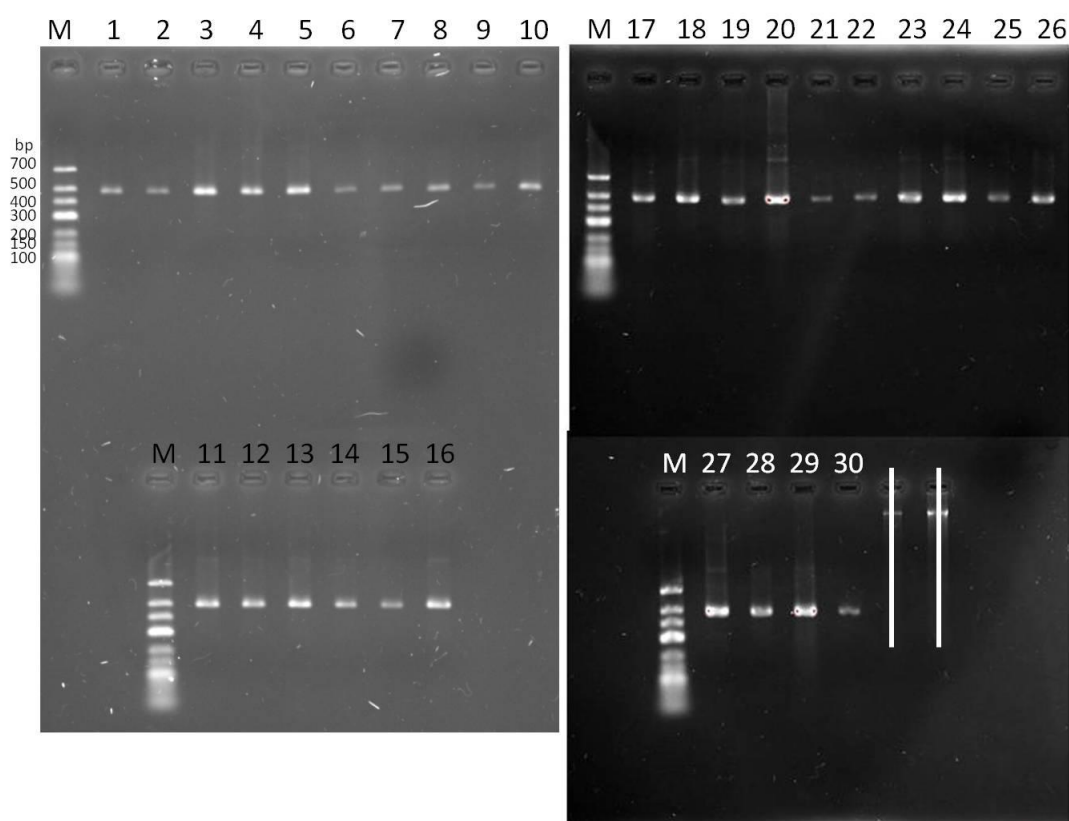


Figura 12. Gel de agarosa al 1.5% utilizado para calcular la concentración de DNA. M, marcador de peso molecular (Gene Ruler Low Range DNA Ladder, Fermentas); la numeración del 1 al 30 corresponde a las claves de muestra asignadas al DNA de las cepas de *Streptococcus* spp. La amplificación se realizó con los oligos d1-d2, dirigidos al gen *sodA* (superóxido dismutasa dependiente de Mn^{2+}).

Tabla 11. Concentración del DNA amplificado con los oligos d1-d2 (*sodA*)

Cepa	Muestra	Concentración (ng/μL)	Cepa	Muestra	Concentración (ng/μL)
1	1	9.02	84.32	16	17.86
50.11	2	6.76	92.1	17	16.66
50.12	3	20.15	93.1	18	26.22
50.13	4	14.06	107.1	19	16.43
50.20	5	19.49	107.2	20	32.12
50.21	6	7.72	115.21	21	7.40
50.22	7	9.41	115.22	22	8.99
50.23	8	11.84	130.1	23	25.95
50.31	9	7.77	130.21	24	30.40
50.32	10	13.49	130.22	25	11.54
68.11	11	17.97	154.2	26	19.83
68.12	12	15.85	49	27	25.73
68.2	13	18.39	56	28	16.77
84.1	14	9.78	11	29	23.53
84.31	15	9.13	SL2	30	7.77

6.2.2 Secuenciación del fragmento de *sodA* con el oligos d1 e identificación de las cepas de *Streptococcus* spp. aisladas de pozol a nivel de especie

6.2.2.1 Procesamiento de la información para su interpretación

Las secuencias obtenidas (MacroGen Inc, Corea) fueron ingresadas en el NCBI para realizar alineamientos locales (algoritmo *blastn* y para dar mayor astringencia también se recurrió al *megablast*). Se determinó que 26 de 28 cepas incluidas en la identificación corresponden a *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* (*Sii*), incluso cuando presentaron ciertas diferencias morfológicas a nivel micro y/o macroscópico (Anexo D, Tabla D.1). Las secuencias de estas cepas mostraron gran parecido con tres cepas: *Sii*-CJ18, obtenida de un producto africano de leche de camella fermentada (suusac [Jans *et al.*, 2012b]); *Sii*-CIP106106, Colección del Instituto Pasteur, obtenida de muestra de heces fecales de un infante; *Sii*-CCUG 47736 de la Colección de la Universidad de Göteborg, Suiza, obtenida de una muestra de sangre humana e identificada inicialmente como *S. equinus*; así como con la cepa *Sii*-25124 de la colección de nuestro laboratorio.

Los códigos acceso de estas cepas están indicados en la Tabla 12 junto con el porcentaje de identidad obtenido en el blast, el valor de E (valor estadístico que indica la probabilidad de que la similitud entre las secuencias comparadas haya sido resultado del azar, conforme este valor tienda a cero habrá sido menor la contribución del factor azar), así como el porcentaje de cobertura de las secuencias con que se alineó. Estos parámetros proporcionan información sobre la similitud de la secuencia de la muestra respecto a la secuencia de la

base de datos con las que mostró coincidencias. El mejor resultado corresponde al menor valor de E y al mayor porcentaje de cobertura (%Q cob).

Tabla 12. Identificación de cepas de *Streptococcus* spp. procedentes de pozol

Cepa	Identidad Vitek2®*	Probabilidad % ID	Aislados [este trabajo]	ID <i>sodA</i>	%ID	E-val	%Q cob	Número de acceso de la coincidencia más cercana
<i>S. infantarius</i> **			✓					
11***			✓	CIP106106 CIP106107 <i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99	0.0	87	AJ306979.1 AJ306980.1
49***			✓	CIP106106	97	0.0	85	AJ306979.1
56***			✓	CJ18	99	0.0	90	CP003295.1
1	<i>S. alactolyticus</i>	95.00	✓	CIP106106	100	0.0	86	AJ306979.1
50.1	<i>S. mitis/S. oralis</i>	94.91	50.11	CIP106106	100	0.0	90	AJ306979.1
			50.12	CJ18 CIP106106	99 99	0.0 0.0	90 88	CP003295.1 AJ306979.1
			50.13	CIP106106	99	0.0	88	AJ306979.1
50.2	<i>S. mitis/S. oralis</i>	93.88	50.20	CJ18 CIP106106	97 99	0.0 0.0	93 88	CP003295.1 AJ306979.1
			50.21	CJ18 CIP106106	97 99	0.0 0.0	98 91	CP003295.1 AJ306979.1
			50.23	CIP106106	100	0.0	87	AJ306979.1
50.3	<i>S. mitis/S. oralis</i>	93.88	50.31	CIP106106	99	0.0	88	AJ306979.1
			50.32	CJ18	98	0.0	92	CP003295.1
68.1	<i>S. sanguinis</i>	85.14	68.11	CIP106106	99	0.0	88	CP003295.1
			68.12	CIP106106 CJ18	99 98	0.0 0.0	91 88	AJ306979.1 CP003295.1
68.2	<i>S. mitis/S. oralis-S. sanguinis</i>	50.00-50.00	✓	CIP106106	100	0.0	89	AJ306979.1
84.1	<i>S. alactolyticus</i>	94.38	✓	CJ18	98	0.0	92	CP003295.1
84.3	<i>S. mitis/S. oralis</i>	93.65	84.31	CIP106106	83	1e ⁻⁸⁰	75	AJ306979.1
			84.32	CIP106106 CJ18	98 97	0.0 0.0	87 89	AJ306979.1 CP003295.1
92.1	<i>S. infantarius</i> spp. coli/ <i>S. bovis</i>	94.38	✓	CJ18	98	0.0	94	CP003295.1
93.1	<i>S. alactolyticus</i>	85.81	✓	CIP106106 CJ18	99 98	0.0 0.0	92 95	AJ306979.1 CP003295.1
107.1	<i>S. alactolyticus</i>	89.80	✓	CCUG47736 CJ18	99 95	0.0 0.0	84 91	GU991779.1 CP003295.1
107.2	<i>S. alactolyticus</i>	81.69	✓	CCUG47736 CIP106106 CJ18	99 96 95	0.0 0.0 0.0	84 88 90	GU991779.1 AJ306979.1 CP003295.1
115.2	Sin Identificar	-	115.21	<i>Staphylococcus pasteurii</i> CIP103540 ^T	99	0.0	90	AJ343920.1
			115.22	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	98	0.0	93	AF410177.1
130.1	<i>S. alactolyticus</i>	95.00	✓	CJ18	98	0.0	92	CP003295.1
130.2	<i>S. alactolyticus</i>	95.00	130.21	CIP106106 CJ18	99 98	0.0 0.0	88 91	AJ306979.1 CP003295.1
			130.22	CJ18	98	0.0	93	CP003295.1
154.2	<i>S. alactolyticus</i>	93.00	✓	CIP106106	97	0.0	87	AJ306979.1

*Montiel, comunicación personal. **Díaz-Ruiz *et al.*, 2003. *S. bovis*-25124, actualmente *S. infantarius* subsp. *infantarius*-25124. ***Rodríguez-Navarro & Villalva-Fuentes, 2010. ✓ Proveniente de cultivo puro, manteniendo la nomenclatura inicial homogéneas. Siglas: ID. Identidad. E-val. Valor de E. ID *sodA*, aludiendo a la cepa de *Sii* con la que ha mostrado mayor similitud la secuencia de *sodA* evaluada. CIP, Collection de l'Institut Pasteur en Paris, Francia. CCUG, Culture Collection, University of Göteborg, Suecia.

Es importante resaltar que los porcentajes de identidad obtenidos para las cepas identificadas como *Sii* con este método son superiores a los obtenidos con las pruebas bioquímicas (Vitek2®). Igualmente, resulta muy interesante que todas las cepas hayan sido identificadas como la misma subespecie, apoyando las observaciones previas de que esta especie tiene gran predominancia en el pozol. Este predominio es consistente con su detección sistemática en muestras de pozol de diferentes productores y muestras obtenidas en diferentes fechas de muestreo [Díaz-Ruiz *et al.*, 2003; Bolaños, 2004; López, 2006].

Las cepas de trabajo son nombradas *Sii* seguidas del número clave de la cepa, p. ej., *Sii*-92.1, para abreviar, con excepción de aquellas cepas que fueron identificadas como parte del género *Staphylococcus* (115.21 y 115.22).

6.2.2.2 Elaboración de dendrograma con secuencias del gen *sodA* de *Streptococcus* spp. utilizando el método de Neighbor-Joining

Para complementar el *blast* realizado y visualizar mejor la similitud que guardan las secuencias y los grupos que forman, se efectuó un alineamiento múltiple (ClustalW) y un dendrograma por el método de NJ (Figura 13). La cepa que posee el código “*S. lutetiensis* (16S rRNA)” corresponde a un aislado de una muestra de pozol obtenido por otro grupo de trabajo y fue incluida ya que había sido identificado previamente como *S. lutetiensis* (basónimo *S. infantarius* subsp. *coli*) por secuenciación del gen 16S rRNA.

En la Figura 13 se observa que las secuencias de los aislados de pozol identificados como *Sii* forman un *cluster* homogéneo con las secuencias de *Sii*-CIP106106, *Sii*-CJ18, la cepa antes identificada como *S. lutetiensis* y *Sii*-25124. Se observa también que los aislados de pozol forman 6 clusters, aunque 107.1 y 107.2 están separados del resto como si fueran un grupo externo del aparente *core* que forman las demás, todos forman un conjunto en torno a las cepas de referencia confirmando su estatus actual como *Sii*.

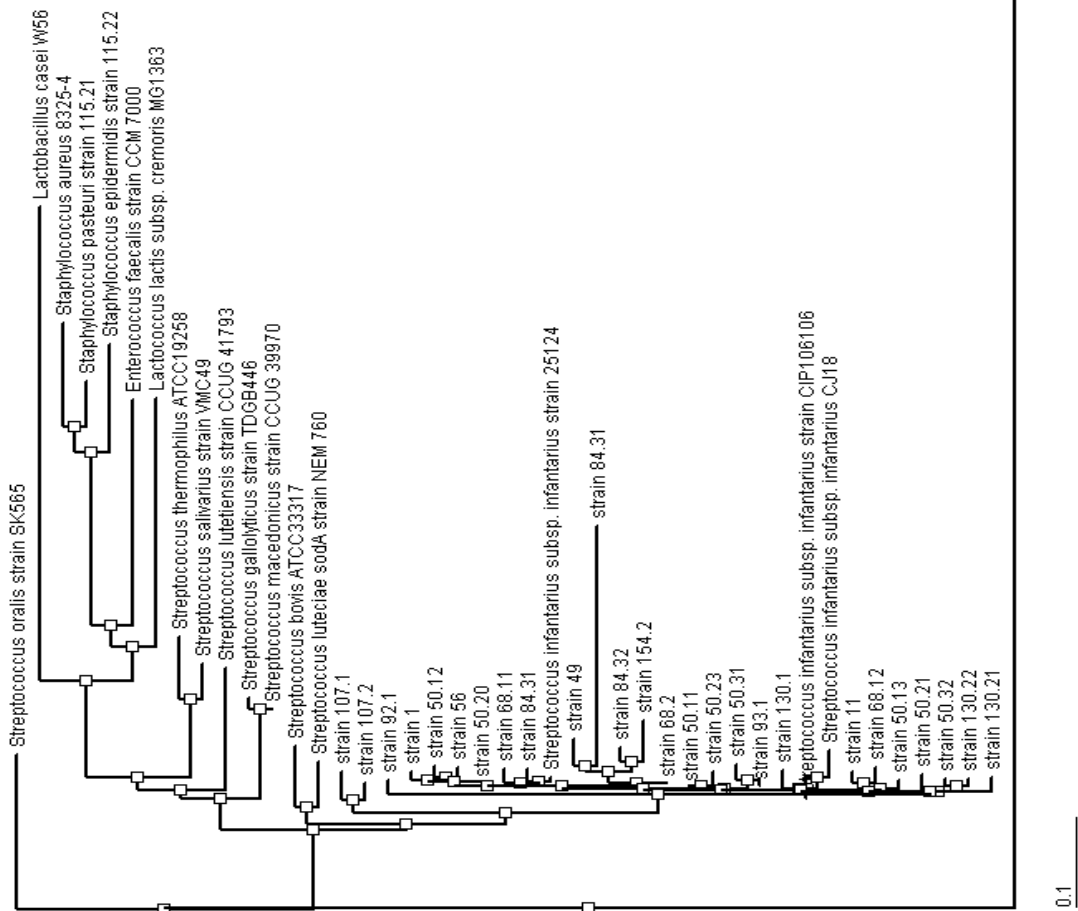


Figura 13. Dendrograma generado por NJ basado en el gen *sodA* de cepas de *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* aisladas de pozol, otros estreptococos, y cepas de géneros relacionados y no relacionados. Las secuencias de las cepas que no corresponden a las de los estreptococos aislados de pozol se obtuvieron del GenBank. *Clostridium botulinum* como grupo externo. La barra horizontal en la base del dendrograma indica las unidades del número de sustituciones por sitio entre pares de secuencias (distancia entre ellas). Bootstrap=1000.

Así, el *cluster* de *Sii* queda bien definido y separado del resto de las especies de estreptococos pero mantiene relación con el formado por *S. lutetiensis*⁷ (nombrado como '*S. luteciae* NEM 760' en el NCBI, corresponde a la cepa emb|AJ297188.1 o gi|14594950) y *S. bovis* ATCC 33317. Poniendo con ello de manifiesto la relación de *Sii* con el CSBSE, relación que también se observa con las secuencias del gen 16S rRNA y *groEL* [Facklam, 2002; Jans *et al.*, 2013a]. Así quedan ordenados en un mismo cluster: *S. infantarius*, *S. bovis* junto con *S. alactolyticus*, *S. gallolyticus* y *S. macedonicus*, miembros de este Complejo. Por ello puede asumirse que el uso de *sodA* ha proporcionado buena resolución en la identificación y en la correlación de las cepas aisladas de pozol, como ha sido descrito previamente [Poyart *et al.*, 2000, 2002].

Por otra parte, las 2 cepas identificadas como *Staphylococcus* por medio del alineamiento local forman un grupo separado del resto de las cepas y quedan en cluster con la secuencia de *S. aureus* usada como referencia. Estas cepas son 115.21 y 115.22 y guardan mayor similitud con *S. pasteurii* y *S. epidermidis* respectivamente, por lo tanto fueron excluidas del estudio de la respuesta a estrés. Sin embargo, es el primer reporte de la presencia de estas especies en pozol pues con anterioridad sólo se había encontrado a *S. aureus* y se habían detectado otros estafilococos pero sin identificarlos a nivel de especie [Morales-Ferrero, 2011].

De esta manera, con la identificación de estas cepas como *Sii* procedentes de dos muestreos diferentes (2007, 2009) [Rodríguez-Navarro & Villalva-Fuentes, 2010; Becerril-Sánchez, 2012], aunado a los reportes previos donde se ha identificado la presencia de *S. infantarius* o *S. bovis* (debido a la ambigüedad que hay en la diferenciación de ambas especies utilizando métodos tradicionales e incluso, en ocasiones, el gen 16S rRNA) en pozol de Villahermosa, Tabasco [Ben Omar & Ampe, 2000; Díaz-Ruiz *et al.*, 2003; Bolaños, 2004; López, 2006], se contribuye a la asignación de un estatus de ubicuidad en el pozol, siendo, por tanto, parte de la microbiota nativa de éste. Esta persistencia debe tener fundamento en características fisiológicas que le permiten mantener una presencia importante en un alimento tan particular como el pozol. La capacidad amilolítica que posee la cepa *Sii*-25124 ciertamente contribuye con ello [Díaz-Ruiz *et al.*, 2003] pese a no ser tan

⁷ *S. lutetiensis* es la nomenclatura sugerida por Poyart *et al.*, (2002) para el antes nombrado *S. infantarius* subsp. *coli* [Schlegel *et al.*, 2000].

amilolítico como cepas del género *Lactobacillus*. Si en efecto las cepas de *Sii* poseen mecanismos de tolerancia al estrés por pH o por otro tipo de estrés, esto también tendría una contribución importante para dotar a este grupo microbiano de una mejor capacidad adaptativa a los cambios físico-químicos del nicho, siendo por tanto más apto para colonizarlo y dominar la fermentación del pozol, al menos en etapas tempranas, y persistiendo en etapas tardías.

6.3 Determinación semicuantitativa del potencial amilolítico y xilanolítico de cepas de *Streptococcus* spp. aisladas de pozol

Ya que el metabolismo del almidón y del xilano son importantes para que estas cepas puedan desarrollarse en el nixtamal, se realizó la evaluación semicuantitativa de la capacidad amilolítica y xilanolítica de las cepas de la colección de *Sii* indicadas en la Tabla 13, por el método de inmersión en yodo. Todas las cepas identificadas como *Sii* poseen ambas actividades (Figura 14), algunas aparentemente con mayor potencial que otras, poniendo de contraste a *Lactobacillus plantarum* A6 como control positivo para actividad amilolítica (además de ser una cepa con gran capacidad amilolítica) y *Weissella confusa* L9 como control negativo para esta misma actividad. *Cellulomonas flavigena* representa el control positivo de actividad xilanolítica, aunque es importante señalar que aunque es positiva no posee gran actividad (reflejado en los halos de poco diámetro obtenidos).

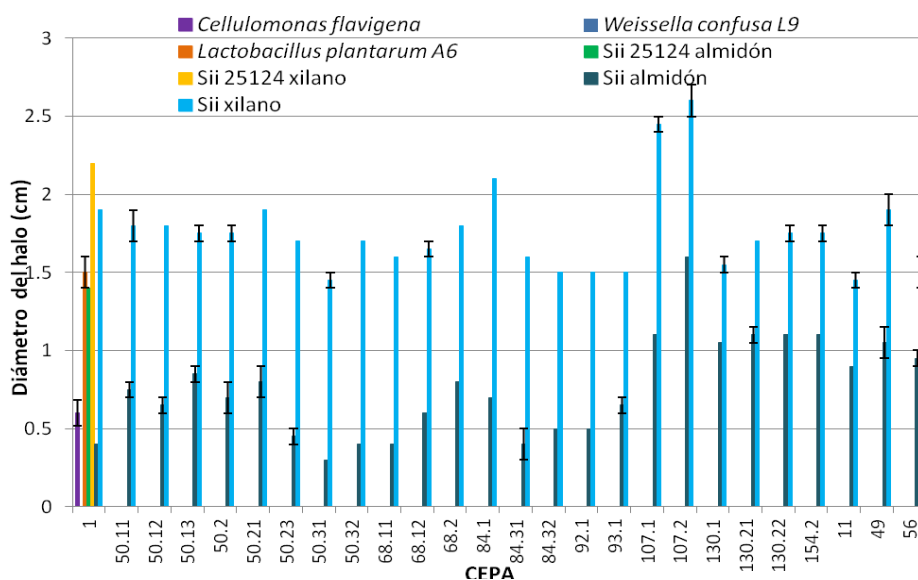


Figura 14. Diámetro de los halos de degradación (cm) obtenidos para la determinación de la actividad amilolítica y xilanolítica de cepas de *Sii* aisladas de pozol. *Cellulomonas flavigena*, control positivo para la hidrólisis del xilano; *Lactobacillus plantarum* A6, control positivo para hidrólisis del almidón y *Weissella confusa* L9 control negativo por lo que no hay barra en el gráfico asociada a esta última. Las barras de error indican \pm DS (desviación estándar) resultado de 3 réplicas.

6.4 Determinación de la capacidad de cepas de *Streptococcus* spp. aisladas de pozol para fermentar lactosa

Resulta importante destacar que a diferencia de la hidrólisis del almidón y del xilano, no todas las cepas de *Sii* aisladas de pozol tienen la capacidad de fermentar la lactosa (Tabla 13). Las fermentadoras rápidas son las cepas *Sii*-50.32, *Sii*-68.11 y *Sii*-68.12; fermentadores tardíos son las cepas *Sii*-107.2 y *Sii*-154.2, que a pesar de haber tenido muy buen desarrollo en caldo APT tardaron hasta 48 horas para generar vire del rojo de fenol. Otros fermentadores de lactosa positivos son las cepas *Sii*-56, *Sii*-84.31, *Sii*-92.1 y *Sii*-93.1, representando un total de 9 cepas positivas, cerca del 47% del total de las cepas de trabajo. Las 19 restantes son negativas, incluyendo a *Sii*-25124.

Tabla 13. Resultado de la fermentación de lactosa por parte de las cepas de *Streptococcus* spp. aisladas del pozol de Villahermosa, Tabasco

Cepa	Lac			Lactosa	Cepa	Lac			lactosa
	6h	24h	48h			6h	24h	48h	
1	-	-	-	-	92.1	-	+	+	+
50.11	-	-	-	-	93.1	-	+	+	+
50.12	-	-	-	-	107.1	-	-	-	-
50.13	-	-	-	-	107.2	-	-	+	+
50.20	-	-	-	-	130.1	-	-	-	-
50.21	-	-	-	-	130.21	-	-	-	-
50.23	-	-	-	-	130.22	-	-	-	-
50.31	-	-	-	-	154.2	-	-	+	+
50.32	+	+	+	+	11	-	-	-	-
68.11	+	+	+	+	49	-	-	-	-
68.12	+	+	+	+	56	-	+	+	+
68.2	-	-	-	-	<i>Sii</i> -25124	-	-	-	-
68.3	-	-	-	-	115.22	-	-	+	+
84.1	-	-	-	-	<i>E. coli</i> 95269 O7:H10	+	+	+	+
84.31	-	+	+	+	<i>Salmonella</i> Typhimurium	-	-	-	-
84.32	-	-	-	-					

+, lactosa positivo; -, negativo. *E. coli* control positivo. *Salmonella* Typhimurium control negativo.

Esto es un contraste interesante ya que dentro de la descripción de Schlegel *et al.* (2000) se indica que casi todas las cepas del CSBSE, incluyendo *Sii*, son positivas para la fermentación de lactosa, con excepción de *S. equinus* que es negativo. Adicionalmente, las variantes africanas de *Sii* muestran ser positivas para lactosa, siendo una cualidad muy importante considerando el nicho del que proceden. Incluso, como resultado del análisis de la

semejanza que guarda la secuencia del operon *lac* de la cepa *Sii*-CJ18 respecto a *S. thermophilus*, se especula que es posible que estas variedades de *Sii* aislados de leches hayan evolucionado por transferencia horizontal de genes homólogos teniendo como ventaja selectiva el uso de la lactosa para desarrollarse en este nicho [Abdelgadir *et al.*, 2008; Jans *et al.*, 2012c, 2013a]. Justamente estas cepas son aquellas que, bajo los argumentos de Jans *et al.*, muestran diferencias respecto a cepas clínicas (*Sii* ATCC BAA-102^T) y son denominadas *variantes Africanas* [Jans *et al.*, 2013a], que además se han identificado como posibles cepas (linaje) para uso en alimentos (*food-grade linages*) [Kaindi *et al.*, 2018].

Es común que en las comunidades microbianas naturales, como las de alimentos fermentados, existan algunas diferencias entre las cepas de una misma especie. Se han descrito diferencias fenotípicas a pesar de mostrar el mismo genotipo [Ackermann *et al.*, 2008; Skandamis *et al.*, 2008; Lenz *et al.*, 2010; Danne *et al.*, 2011; Kint *et al.*, 2012; Diard *et al.*, 2013; Vasan *et al.*, 2013], como ejemplo se pueden mencionar diferencias atípicas en la fermentación de carbohidratos como lo observado en aislados de *S. thermophilus* provenientes de diferentes productos lácteos [Giraffa *et al.*, 2001]. De esta manera, los estreptococos del pozol podrían también ser *variantes* respecto a otros *Sii* que tienen como origen otros nichos como las leches fermentadas, aislados clínicos, etc., dando fundamento a la diferenciación de los linajes observados por Kaindi *et al.* (2018).

Si bien, cabe señalar que por lo general se considera que una especie es positiva para una prueba bioquímica cuando más del 85% de las cepas dan positivo, negativo cuando menos del 15% dan positivo y se consideran variable cuando del 15 al 85% dan positivo [Schlegel *et al.*, 2000]. Se sugeriría ampliar el número de cepas aisladas del pozol para tener una visión más global sobre diferencias o similitudes en el metabolismo de carbohidratos de éstas, como la fermentación de lactosa.

6.5 Cinética de crecimiento de cepas de *Streptococcus* spp. aisladas de pozol en medio APT

Habiendo seleccionado el medio APT para realizar las pruebas de reto con valores modificados de pH y con altas temperaturas, se llevó a cabo el estudio del crecimiento de las cepas seleccionadas bajo condiciones óptimas para proseguir el trabajo teniendo un marco

de referencia. Las cepas sujetas a esta evaluación corresponden a: *Sii-25124*, *Sii-1*, *Sii-50.21*, *Sii-50.31*, *Sii-84.31*, *Sii-92.1* y *Sii-107.1*, así como a *S. thermophilus* ATCC 19258 (para abreviar: *Sth-19258*), realizando cada curva de crecimiento por triplicado.

En conjunto estos resultados se aprecian en la Figura 15, definiendo el crecimiento como el aumento en la DO_{600nm} . Se observa que las cepas de *Sii* aisladas de pozol poseen un comportamiento muy similar entre ellas como también se aprecia en las velocidades específicas de crecimiento de la tabla 14. Todas parten de la misma DO_{600nm} al tiempo 0 h y la fase *log* (logarítmica) de crecimiento comienza casi inmediatamente al efectuarse la inoculación del medio fresco, prolongándose hasta cerca de las 5 horas de incubación, momento en el que comienza a apreciarse la formación de la meseta que corresponde a la fase estacionaria (Figura 5). Diferente es el comportamiento de la cepa *Sth-19258* que posee una tasa de crecimiento menor, que no permitió poder siquiera iniciar con la misma DO_{600nm} que con el resto de las cepas; en su curva se aprecia lo que parece una fase *lag* (de adaptación) durante las primeras 5 horas de incubación y su fase *log* parece prolongarse de las 5 horas hasta las 20 horas de incubación, aproximadamente, donde parece haber alcanzado la fase estacionaria.

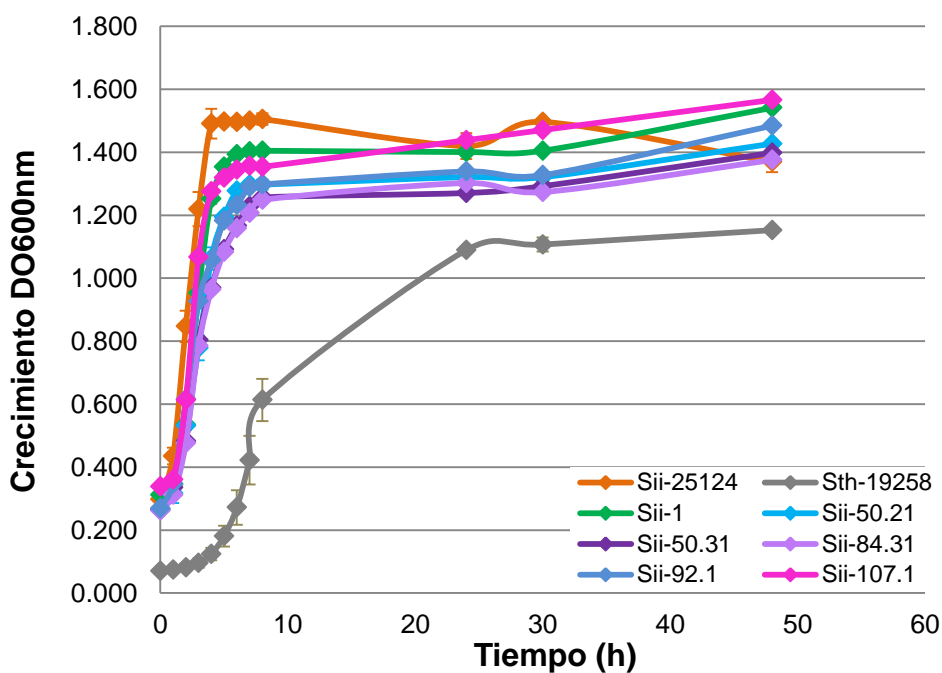


Figura 15. Cinéticas de crecimiento de cepas de *Streptococcus* spp. aisladas de pozol, en caldo APT incubado a 30° C. DO_{600nm} como indicativo del aumento en la población celular *Sii* es la etiqueta de las cepas que se identificaron molecularmente como *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* y *Sth-19258* representa la cepa *S. thermophilus* ATCC 19258. ± DS resultado de tres repeticiones independientes.

6.5.1 Determinación de la velocidad específica de crecimiento de cepas de *Streptococcus* spp. aisladas de pozol en medio APT a 30° C

Los valores obtenidos para las velocidades específicas de crecimiento se indican en la Tabla 14.

Tabla 14. Velocidad específica de crecimiento estimada por biomasa de cepas de *Sii* en caldo APT, 30° C

Cepa	μ (h ⁻¹)	Cepa	μ (h ⁻¹)
<i>Sth</i> ATCC 19258	0.4032	<i>Sii-50.31</i>	0.4605
<i>Sii-25124</i>	0.4984	<i>Sii-84.31</i>	0.4740
<i>Sii-1</i>	0.5194	<i>Sii-92.1</i>	0.4995
<i>Sii-50.21</i>	0.4462	<i>Sii-107.1</i>	0.5517

μ -velocidad específica de crecimiento; *Sii*- *S. infantarius* subsp. *infantarius*; *Sth*- *S. thermophilus*.

Con los resultados anteriores se puede observar que para las cepas de *Sii* y *Sii-25124* las velocidades específicas de crecimiento en general se mantienen muy similares teniendo un promedio de 0.4928 ± 0.0334 h⁻¹. A diferencia de *Sth-19258*, cuya velocidad específica de crecimiento en caldo APT incubado a 30° C fue de menor valor. De esta manera, se puede considerar que el comportamiento general de las cepas de *Sii* aisladas del pozol parece mostrar una tendencia de crecimiento similar y consistente entre ellas.

Es importante considerar que esta velocidad es específica para el medio y las condiciones utilizadas: caldo APT, incubación a 30° C. Así mismo, hay que recordar que este medio es enriquecido, haciendo de este medio de cultivo adecuado para efectuar las pruebas de reto con estrés ácido o alcalino y estrés térmico. Además, el medio no limita o restringe el crecimiento de estas cepas de ninguna forma y les proporciona los nutrientes adecuados para un buen desarrollo.

Durante la fermentación el valor de pH del medio disminuye, inicialmente se tiene un pH de 6.6 y hacia las 30 h de fermentación éste es de 4.0 (para la cepa 1, tras 48 h de cultivo se registró un pH de 3.9 ± 0.1 y para la cepa 92.1 un pH de 4.0 ± 0.0); las cepas de *Sii* aisladas del pozol persisten llegando a detectarse células viables a las 24 h e incluso hasta las 48 h (observación hecha durante los seguimientos por cuenta en placa). Se ha reportado que el pH mínimo que alcanza el pozol es cercano a 4.0 tras 4 días de fermentación [Wacher *et al.*, 1993; Cabra, 2000; Ben Omar & Ampe, 2000; Díaz-Ruiz *et al.*, 2003], o hasta 3.8 con hasta 9

días de fermentación [Ulloa *et al.*, 1983; Escamilla-Hurtado & Mozqueda-González, 1992; Nuraida *et al.*, 1995; Morales-Ferrero, 2011]. Un tiempo común de fermentación de la bola de masa de pozol es de 3 días, por lo que, dadas estas observaciones, se considera que estas cepas de *S. infantarius* subsp. *infantarius* se mantienen en buenas condiciones en un pH de 4.0, tanto en el pozol como en el APT, por tiempo mayor a 48 h.

Esto muestra la capacidad de estas cepas para mantenerse viables en el pozol y explica su presencia en diferentes etapas de la fermentación, incluso cuando el pH cae hasta 4.0. Ciertamente posee mecanismos para tolerar esta acidez pero no se sabe si ésta puede generar inducción de tolerancia a estrés por un valor de pH menor, como pH 3.8, 3.6 o hasta de 3.0. De tal manera que pH 4.0 fue elegido como el mínimo para determinar los valores cardinales de pH y podría ser considerado un valor subletal de pH adecuado para la adaptación.

6.6 Estudio de la supervivencia bacteriana como respuesta a estrés

6.6.1. Efecto del pH en *Sii-25124*

6.6.1.1 Determinación de los valores cardinales de pH

El desarrollo de la cepa *Sii-25124* fue evaluado en caldos APT ajustados a diferentes valores de pH (ácidos y alcalinos) con el fin de determinar los valores de pH mínimo, máximo y óptimo de crecimiento. El pH de este medio en condiciones normales es de 6.6.

En la Figura 16A, en la cual el crecimiento está expresado en términos de biomasa (obtenidos de la relación Biomasa-DO_{600nm}), puede observarse que el desarrollo de la cepa *Sii-25124* está favorecido en los valores de pH de 8.0 y 9.0, este último equiparable a lo observado en pH 7.0 y 6.6; en los cuatro casos, aparentemente la fase estacionaria es alcanzada alrededor de las 5 h de incubación a 30° C. Para el resto de valores de pH evaluados, el crecimiento de la cepa no es tan abundante y en algunos casos no resulta posible identificar el punto en que se alcanza la fase estacionaria (pH 4.0 y pH≥10.0). Es evidente que al no encontrarse en un medio óptimo las velocidades específicas de crecimiento se ven disminuidas pero el valor de pH óptimo corresponde con el de la mejor velocidad específica registrada (Tabla 15). Esto es en el cultivo con pH 8.0.

Los valores de la Tabla 15 fueron determinados a partir de la ecuación de la recta obtenida de graficar el Ln de la biomasa vs. tiempo de muestreo o de crecimiento (h) (Figura 16A), para los valores de pH 5.0, 6.6, 7.0, 8.0 y 9.0 usando los tiempos de 0 h a 5 h y para los valores de pH 4.0, 10.0, 11.0 y 12.0 de 0 h a 24 h.

Tabla 15. Velocidades específicas de crecimiento de la cepa *Sii-25124* en caldo APT ajustado a diferentes valores de pH e incubado a 30° C

pH	μ (h ⁻¹)	pH	μ (h ⁻¹)
4.0	0.0155	9.0	0.6269
5.0	0.4492	10.0	0.0774
6.6	0.5897	11.0	0.0566
7.0	0.6275	12.0	--
8.0	0.6335		

μ -velocidad específica de crecimiento.

La Figura 16B muestra el desarrollo alcanzado por la cepa *Sii-25124* al término de 24 h de cultivo bajo las condiciones ya mencionadas, pero en esta figura resulta más evidente que el pH óptimo de crecimiento para ella es de 8.0, donde se alcanza el máximo desarrollo. Los valores de pH 11.0 y 4.0 resultan ser los valores de pH máximo y mínimo de crecimiento, respectivamente, ya que tras inocular e incubar en agar APT la cepa se recuperó normalmente, no así el inóculo crecido en pH 3.6 que a las 3 h pierde viabilidad.

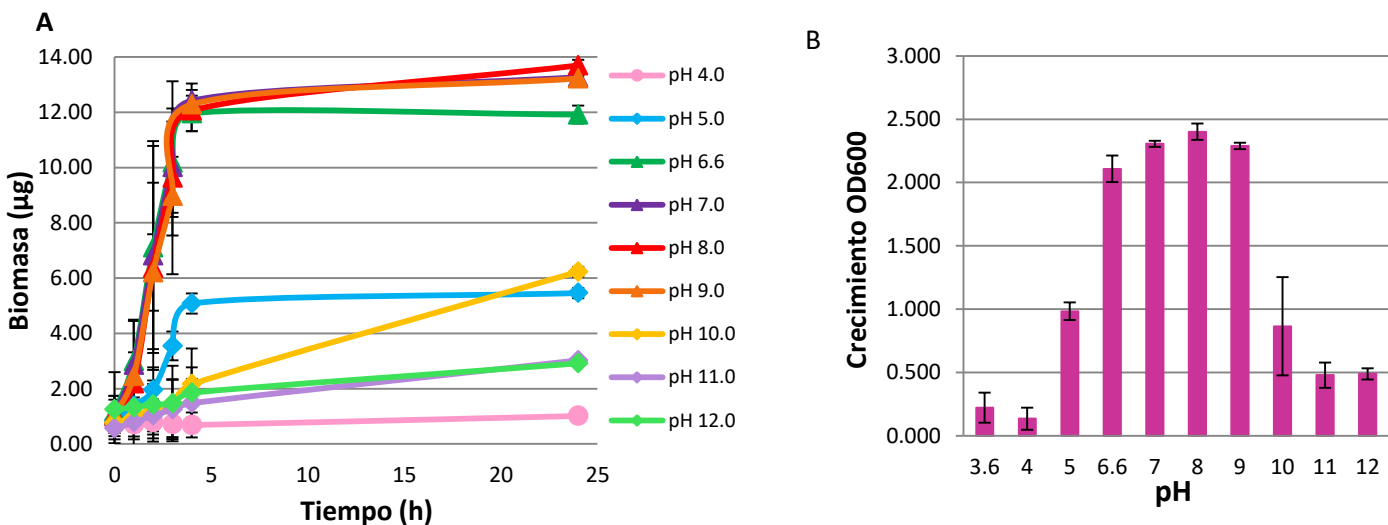


Figura 16. Crecimiento de la cepa *Sii-25124* en caldo APT ajustado a diferentes valores de pH e incubado a 30°C A. Cinética de crecimiento. B. Comparación del máximo de crecimiento de la cepa *Sii-25124* en caldo APT ajustado a diferentes valores de pH después de incubar 24 h a 30° C. Las barras de error indican \pm DS resultado de 3 réplicas.

Sii-25124 muestra ser más tolerante a la alcalinidad que a la acidez pues se adapta y crece mejor en estas condiciones comparado con el crecimiento en pH < 6.6.

En la Tabla 16 se registra el resultado de los valores cardinales para esta cepa y se contrastan con valores cardinales de otras bacterias como: *Enterococcus faecalis*, que posee buena tolerancia a la alcalinidad [Flahaut *et al.*, 1997] y varias especies de *Lactobacillus* spp. que son muy comunes en alimentos fermentados con pH ácido. Al observar los intervalos de pH en los que pueden crecer las bacterias utilizadas como ejemplo, se puede apreciar que la cepa *Sii-25124* posee un rango muy amplio de crecimiento que le confiere mayor o tolerancia incluso al compararse con *E. faecalis* quien es descrito como una bacteria con gran adaptabilidad a ambientes extremos pero con poca capacidad para acidificar [Giraffa, 2003].

Tabla 16. Valores cardinales de pH para diferentes bacterias ácido lácticas comunes en fermentaciones tradicionales y *Sii-25124*

Bacteria	pH _{mínimo}	pH _{óptimo}	pH _{máximo}	Referencia
<i>L. fermentum</i>	3.00	5.77	8.10	Le Blanc <i>et al.</i> , 2004
<i>L. plantarum</i>	3.40	6.00	8.80	Giraud <i>et al.</i> , 1991
<i>L. amylovorus</i>	3.55	5.40	9.00	Messens & DeVuyst, 2002
<i>L. sanfranciscensis</i>	3.94	5.47	6.67	Gänzle <i>et al.</i> , 2007
<i>Sii-25124</i>	4.00	8.00	11.00	Este trabajo
<i>E. faecalis</i>	5.00	7.00-7.50	9.60	Flahaut <i>et al.</i> , 1997

El hecho de que *Sii-25124* muestre tolerancia a la alcalinidad comparado con bacterias del género *Lactobacillus*, que muestran tolerancia a la acidez, podría explicar en parte su predominio al inicio de la fermentación de la bola de masa de pozol y la diferencia con respecto a otros alimentos fermentados a base de maíz. Se ha observado que después de nixtamalizar el grano no siempre es lavado cuidadosamente [Cañas *et al.*, 1993a] y el nejayote tiene un pH de 11.7 [Cooper, comunicación personal], al efectuar la molienda la masa tendrá un pH tendiendo a la neutralidad o ligeramente alcalino (como los indicados en la Tabla 5), confiriéndole mayor ventaja a *Sii* (si éstos poseen el mismo comportamiento que *Sii-25124*) al estar más próximo a su pH_{óptimo} de crecimiento (Tabla 16). Esta presencia de *Sii* en nixtamal para pozol puede estar siendo consistente con un reporte en el cual se detectaron cepas de *S. bovis* como microbiota dominante en masas de maíz nixtamalizado [Adolphson *et al.*, 2013] pero debe considerarse que bien podría tratarse particularmente de *Sii*, ya que la identificación en dicho trabajo no se efectuó con herramientas que permitieran

dilucidar con mayor precisión la identidad de esta bacteria. De ser así, la nixtamalización tiene una contribución importante en la selectividad de la microbiota nativa del pozol pero faltaría evidenciar su presencia antes, durante y después de nixtamalizar.

Por otro lado, como los valores de pH mínimos reportados para el pozol son cercanos a 4.0 [Nuraida, 1995; Wachter, 1995; Cabra, 2000; Morales-Ferrero, 2001; Díaz-Ruiz *et al.*, 2003], el que *Sii*-25124 posea un $\text{pH}_{\text{mínimo}}$ de crecimiento igual a este valor sustenta el hecho de que aún esté presente al término de la fermentación pero al tener una menor velocidad específica de crecimiento (o estar cerca del estado de latencia, siendo un valor subletal de pH), es superado en número por otras bacterias ácido lácticas. Estos mismos valores cardinales de pH de la cepa *Sii*-25124 permiten entender en parte el porqué esta bacteria no ha sido aislada de otros alimentos fermentados a base de maíz (no nixtamalizado). Por ejemplo, en alimentos fermentados tradicionales africanos elaborados con este sustrato las fermentaciones son dominadas por bacterias como *L. fermentum* y *L. plantarum* [Hounhouigan *et al.*, 1993; Johansson *et al.*, 1995; Hayford *et al.*, 1996; Olasupo *et al.*, 1996; Agati *et al.*, 1998]. Algunos ejemplos de los valores de pH registrados para esta clase de alimentos fermentados se registran en la Tabla 17. Comparando éstos con los indicados para los valores cardinales de pH de la Tabla 16 resulta evidente que los lactobacilos se ven favorecidos por los valores iniciales de pH de fermentación que tienden a ser menores de 6.0 y pueden persistir hasta valores finales mínimos como 3.0.

Estos nichos no resultan adecuados para el desarrollo de *Sii* que sí ha sido aislado en fermentaciones de productos lácteos como *gariss*, *suusac*, *fenè*, *mala*, *roab*, de la India el *dahi* [Bouvet, *et al.* 1997; Tsakalidou *et al.*, 1998; Abdelgadir *et al.*, 2008; Hamza *et al.*, 2009; Rashid *et al.*, 2007; Wullschleger *et al.*, 2013; Jans *et al.*, 2012a, 2013b]. Estos últimos son ambientes con pH tendiendo a estar por arriba de 6.0 (leche de camella 6.2-6.5, leche de cabra 6.5-6.8, leche de vaca 6.6-6.7 [Jans *et al.*, 2012a, 2013b]), siendo por tanto favorables para *Sii* como en el pozol; en este último se han registrado valores de pH de 6.8-7.5 al inicio de la fermentación [Escamilla-Hurtado & Mozqueda-González, 1992; Cabra, 2000]. O como el *obutoko*, el *enturire* y *ekitiribita* bebidas fermentadas a base de cereales (conocidas como *obushera*) donde también se ha detectado *Sii* y que poseen pH 6.0 inicialmente y desciende a un rango de 4.0-3.5 al término de 2 días de fermentación [Mukisa *et al.*, 2012]. Igualmente, en estos valores de pH, superiores o iguales a 6.0, los lactobacilos como *L. bulgaricus* (pH

óptimo 5.8-6.0) disminuyen su crecimiento siendo por lo tanto condiciones menos favorables para ellos [Rault *et al.*, 2009]. Esto puede ser entonces el caso del pozol, con intervalos de pH que *Sii* puede tolerar mejor que otras BAL, superándolas y limitando su crecimiento por competencia por nutrientes.

Tabla 17. Valores de pH de diferentes productos fermentados tradicionales elaborados a base de maíz y leche de camella

Alimento	pH	Tiempo de fermentación	Referencia
MAÍZ			
África			
Kenkey	5.90-3.70	24-48 h	Halm <i>et al.</i> , 1993
Mahewu	6.40-5.00	Remojo 72 h	Omemu <i>et al.</i> , 2007
	5.00-3.80	Agriado 48 h	
Mawè	6.10-3.50	72 h	Hounhouigan <i>et al.</i> , 1993
Ogi	6.10-5.00	Remojo 48 h	Omemu <i>et al.</i> , 2007
	4.20-3.29	Agriado n.i,	
Togwa	5.24-3.10	n.i.	Mugula <i>et al.</i> , 2003
	5.52-3.34		
Uji	6.00-4.10	n. i.	Masha <i>et al.</i> , 1998
Otros países			
Boza (Balkanes)	5.10-3.40	n.i.	Gotcheva <i>et al.</i> , 2000
Rabdi (India)	6.70-6.40	n.i.	Khatarpaul & Chauhan, 1991
México			
Pozol (Tabasco)	7.50-4.10	3 d	Cabra, 2000
	7.40-4.40	3 d	Díaz-Ruiz <i>et al.</i> , 2003
	6.70-3.70	3 d	Giles, 2012
	6.80-3.90	4 d	Escamilla-Hurtado & Mozqueda-González, 1992
LECHE DE CAMELLA			
Gariss	final	2-3 d	Abdelgadir <i>et al.</i> , 2008
	4.33-3.79		
Suusac	final	n.i.	Lore <i>et al.</i> , 2005
	4.40-3.60		

n.i. no indicado

6.6.1.2.1 Efecto del pH ácido en la supervivencia (acid killing test) y en la inducción de respuesta de tolerancia a la acidez en *Sii*-25124

Si bien, la cepa muestra mayor tolerancia a la alcalinidad con mejor desarrollo en valores de pH ligeramente alcalinos, no pierde viabilidad ni en pH 4.0 ni en pH 11.0. Es por ello que células adaptadas tanto a condiciones ácidas no letales (pH 4.0 y 5.0), células crecidas en condiciones óptimas y ligeramente alcalinas (pH 8.0, 9.0 y 10.0) fueron sometidas a una prueba de supervivencia (prueba de reto) ante el pH letal (3.6), utilizando como control células no adaptadas (pH 6.6). Para llevar a cabo este experimento, células incubadas

durante 5 h a 30° C en estos medios con diferentes valores de pH se inocularon en caldo APT ajustado a pH 3.6 y se hizo un seguimiento de la supervivencia.

En la Figura 17A se observa que las células adaptadas en pH 4.0 tuvieron mejor supervivencia que células adaptadas en pH 5.0 o con valores ligeramente alcalinos como pH 8.0 y 9.0, así también respecto a células no adaptadas (pH 6.6). Igualmente, la pendiente que se aprecia en las cinéticas de muerte celular son más marcadas para pH 6.6, 8.0 y 9.0 (valores más cercanos al pH óptimo de crecimiento registrado para esta cepa) en contraste con las células adaptadas en pH ácido de 5.0 y 4.0 e incluso con la curva de células adaptadas en pH alcalino de 10.0 (Figura 17B).

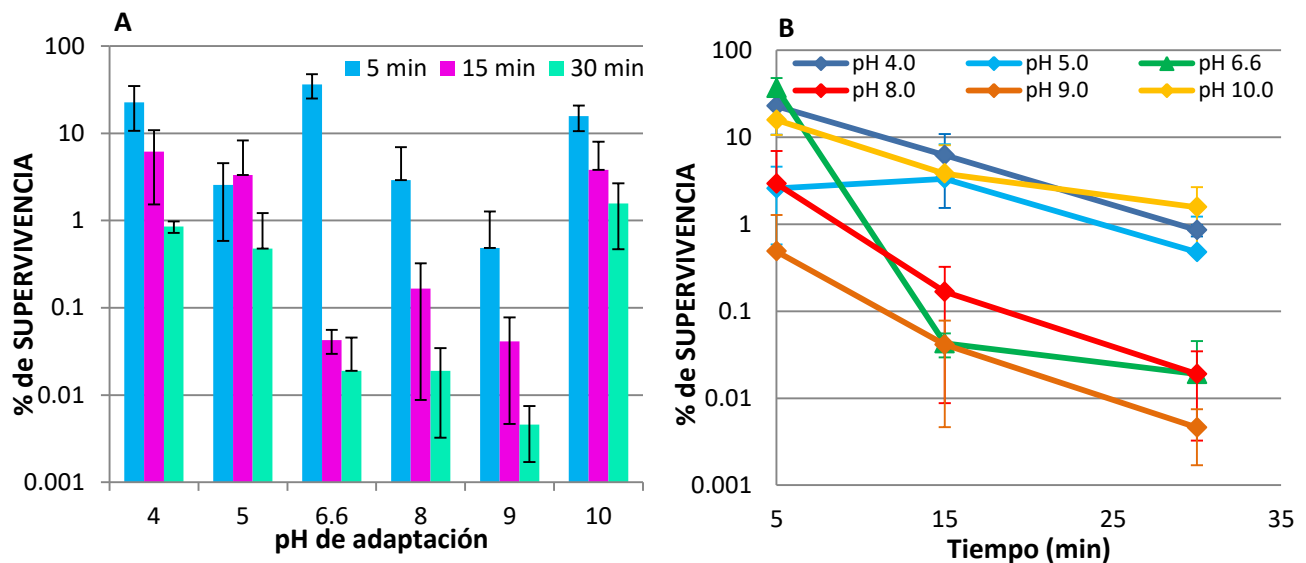


Figura 17. Supervivencia de la cepa *Sii-25124* ante prueba de reto A. Comparación del porcentaje de supervivencia ante prueba de reto en caldo APT ajustado a pH 3.6, pH letal para la cepa *Sii-25124*, con células adaptadas en pH ácido (5 h de crecimiento en caldo con pH 4.0, 5.0), adaptadas en pH alcalino (pH 8.0, 9.0, 10.0) y células no adaptadas (pH 6.6) B. Cinética de muerte expresada en porcentaje de supervivencia, de la cepa *Sii-25124* ante la prueba de reto con pH letal tras su adaptación en pH ácido (pH 4.0, 5.0), alcalino (pH 8.0, 9.0, 10.0) o células sin adaptar (pH 6.6). Las barras de error indican \pm DS resultado de 3 réplicas.

La inducción de tolerancia a pH ácido letal previa adaptación en pH ácido subletal ya ha sido descrita en bacterias como: *S. macedonicus*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *E. faecalis*, *Lactococcus lactis* y *Listeria monocytogenes* [Gahan *et al.*, 1996; Hartke *et al.*, 1996; Flahaut *et al.*, 1997; Nascimento *et al.*, 2004; Papadimitriou *et al.*, 2007; Welin-Neilands & Svensäter, 2007], todos ellos mostrando incremento en la supervivencia comparando con células no adaptadas. Esto es la respuesta adaptativa a la acidez (ATR por sus siglas en inglés). Así, ésta es una respuesta protectora generada por la exposición previa a condiciones ácidas que

permiten la supervivencia a una exposición drástica subsecuente a valores de pH inferiores a 4.0 [Ray & Bhunia, 2014]. Se puede decir, por lo tanto, que *Sii-25124* es capaz de montar esta ATR a pH 3.6 previa adaptación con pH ácido de 4.0 y 5.0 y aparentemente también bajo condiciones de pH alcalino de 10.0. La supervivencia de las células no adaptadas o en aquellas que se adaptaron en medios con pH cercanos al pH óptimo de crecimiento, al no estar sometidas a estrés, por tanto, parecen no inducir ATR, reflejado en menor supervivencia.

En la Tabla 18 se ilustran los valores de pH de adaptación y de reto para *Sii-25124* y otras bacterias, así como el porcentaje de supervivencia que registraron (Figura 17B); contrastando se aprecia que *Sii-25124* no es tan tolerante a la acidez como las demás bacterias pero aparentemente sí posee mecanismos de ATR que le permiten persistir bajo las condiciones de valores finales de pH de la fermentación de pozol.

Tabla 18. Porcentaje de supervivencia de diferentes bacterias ante prueba de reto con pH bajo previamente adaptadas y no adaptadas a condiciones menos drásticas de pH

Bacteria	pH adaptación	pH reto	Tiempo de reto	%supervivencia	Referencia
<i>Sii-25124</i>	4.0	3.6	30 min	0.900	Este trabajo
	6.6 (na)			0.004	
	10.0			1.600	
<i>E. faecalis</i>	4.8	3.2	30 min	90.00	Flahaut <i>et al.</i> , 1997
	7.2 (na)			0.006	
	10.5			0.004	
<i>S. mutans</i> XAB5	5.5	3.5	30 min	20.00	Welin-Neilands & Svensäter, 2007
	7.5 (na)			<5.0	
<i>S. mutans</i>	5.0	2.85	90 min	0.38	Nascimento <i>et al.</i> , 2004
	7.0 (na)			0.009	
<i>S. sobrinus</i>	5.0	2.85	90 min	0.49	Nascimento <i>et al.</i> , 2004
	7.0 (na)			0.0025	
<i>L. monocytogenes</i>	5.5	3.5	120 min	10.00	Gahan <i>et al.</i> , 1996
	7.0 (na)			0.015	
<i>L. monocytogenes</i>	5.5	3.76	7 d	11.5	Gahan <i>et al.</i> , 1996
	7.0 (na)	(jugo*)		0.15	
<i>L. monocytogenes</i>	5.5	4.71	15 d	4.0	Gahan <i>et al.</i> , 1996
	7.0 (na)	(queso**)		<0.1	

na. no adaptadas; jugo* Jugo de naranja; queso** Queso cottage

Algo que también llama la atención es que la adaptación con pH 10.0 haya tenido también impacto en la supervivencia a pH letal, similar a la adaptación con pH 4.0, posiblemente haya un efecto de protección cruzada. Este resultado contrasta con la sensibilización que la

adaptación previa en pH alcalino generó al exponer *E. faecalis* a pH ácido [Flahaut *et al.*, 1997] y a *E. coli* [Rowbury & Hussain, 1996].

6.6.1.2.2 Efecto del pH ácido en la supervivencia de *Sii-25124* (acid killing test) con células lavadas

Para corroborar el efecto de inducción de ATR previa adaptación en pH alcalino y descartar el efecto amortiguador que pudiera generarse por la transferencia de alícuota de cultivo en pH alcalino al medio con pH de reto (pH de 3.6), se realizó la prueba con un paso previo de cosecha y lavado celular. Así mismo, se evaluaron los valores de pH de adaptación considerados subletales (siendo condiciones subóptimas de crecimiento los valores más alejados del pH óptimo de crecimiento: pH 4.0, 10.0 y 11.0).

En este experimento el comportamiento de la cepa mostró la misma tendencia que en el experimento sin los lavados. Se observó la inducción de ATR en células que fueron adaptadas en pH 4.0 y bajo las condiciones alcalinas de pH 10.0 y 11.0. Esto se aprecia por medio de un mayor porcentaje de supervivencia de las células adaptadas en comparación con las células que permanecieron en caldo APT con el pH habitual de éste y que equivalen a las células no adaptadas (Figura 18).

Para saber si este efecto no es sólo aparente se efectuó el análisis estadístico por medio de ANOVA utilizando el programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS 22.0 para Windows, IBM Software). Se inició analizando la varianza para identificar si existían diferencias significativas entre los porcentajes de supervivencia de las células expuestas a pH 3.6, considerando la variable pH de adaptación (pH 4.0, 10.0 y 11.0) o sin adaptación (pH 6.6) y la variable tiempo (de exposición a pH 3.6). Como resultado se detectaron diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) en la supervivencia de las células adaptadas en pH 4.0 respecto a las células no adaptadas. Igualmente se observó la interacción entre las variables (pH de adaptación y tiempo de exposición a pH letal). De modo que se efectuaron las pruebas de rango múltiple (prueba de Duncan y prueba Student-Newman-Keuls) para determinar bajo qué condiciones de pH de adaptación la cepa *Sii-25124* toleró mejor la exposición a pH 3.6, así como el tiempo de exposición con menor efecto letal (un mayor

porcentaje de supervivencia). El resumen de esta última prueba se muestra en la Tabla 19 (para más detalles sobre el análisis estadístico, consultar la sección Anexo B).

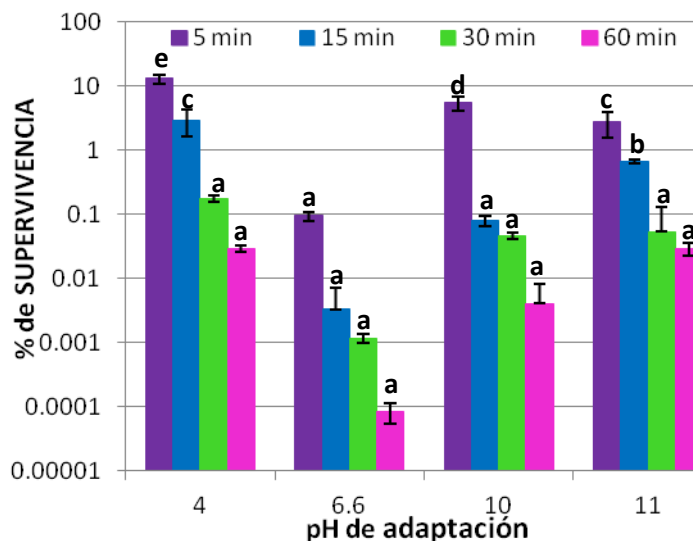


Figura 18. Inducción de ATR en *Sii-25124* tras su adaptación durante 5 h a 30° C en caldo APT ajustado a pH ácido de 4.0 y a valores alcalinos de pH 10.0 y 11.0. El valor de pH 6.6 corresponde a células no adaptadas. El porcentaje de supervivencia ante pH 3.6 corresponde al valor registrado en el tiempo de muestreo correspondiente (5, 15, 30 o 60 minutos) respecto al obtenido al tiempo cero, determinado inmediatamente después de inocular y homogenizar el medio de reto. ± DS resultado de 3 repeticiones independientes. ^{abc} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

Tabla 19. Comparación del efecto cruzado de las variables pH de adaptación y tiempo de exposición a pH 3.6 en la supervivencia de la cepa *Sii-25124*

pH de adaptación	Tiempo de exposición (min)	Porcentaje de supervivencia
6.6	60	0.0000837 ± 0.0000030 ^a
6.6	30	0.0011554 ± 0.0001705 ^a
6.6	15	0.0032555 ± 0.0003862 ^a
10.0	30	0.0046261 ± 0.0005431 ^a
11.0	60	0.0288598 ± 0.0061574 ^a
4.0	60	0.0293117 ± 0.0031599 ^a
10.0	60	0.0405027 ± 0.0421905 ^a
11.0	30	0.0536640 ± 0.0076958 ^a
6.6	5	0.0945038 ± 0.0150540 ^a
10.0	15	0.1019439 ± 0.0044720 ^a
4.0	30	0.1775685 ± 0.0221485 ^a
11.0	15	0.6591854 ± 0.0488635 ^b
11.0	5	2.7599295 ± 0.1169863 ^c
4.0	15	2.9375036 ± 0.1434383 ^c
10.0	5	5.4515899 ± 0.2548870 ^d
4.0	5	13.0064521 ± 0.2891041 ^e

^{bc} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) entre pH de adaptación*tiempo de exposición a pH 3.6. ± DS resultado de tres réplicas independientes.

Como resultado del análisis de las pruebas de rango múltiple se observó la formación de 5 grupos (Tabla 19, del a al e). Los porcentajes de supervivencia dentro de un grupo no muestran diferencia significativa (P>0.05) entre ellos pero sí respecto al resto de los grupos

($P < 0.05$). El grupo con mejor supervivencia corresponde al e, es decir, la mejor supervivencia registrada es de las células adaptadas en pH 4.0 que fueron expuestas 5 minutos a pH 3.6. Éstas van seguidas por las células adaptadas en pH 10.0 expuestas 5 minutos a pH 3.6. Así mismo, es destacable que en cierto grado la respuesta de las células adaptadas a pH 4.0 es similar a la registrada para la adaptación en pH 10.0 y 11.0 (grupos *bcd*, que muestran diferencia significativa respecto a las células no adaptadas, pH 6.6, grupo *a*). Particularmente, las células adaptadas en pH 4.0 expuestas 15 minutos a pH letal mostraron una respuesta estadísticamente similar a la registrada para las células adaptadas en pH 11.0 que fueron expuestas 5 minutos a pH 3.6.

De esta manera se comprueba que en *Sii-25124* la adaptación en pH ácido 4.0 y en valores de pH alcalino 10.0 y 11.0 induce una ATR que le permite tener una mejor supervivencia ante un pH ácido letal de 3.6, respecto a células sin adaptación. Siendo así el mejor valor pH 4.0 para adaptar las células y mejorar su supervivencia a estrés por pH ácido letal. Así mismo, en esta cepa existe un efecto de protección cruzada para tolerar la acidez inducido por exposición previa en pH alcalino que no se ha detectado en alguna otra especie análoga.

6.6.2 Comparación del desarrollo de cepas de *Streptococcus* spp. aisladas de pozol en los valores de pH umbral para *Sii-25124*: cinética de crecimiento en pH 3.6, 4.0 y 12.0

Para determinar si el comportamiento de las cepas es homogéneo o muestran variabilidad entre ellas o respecto a *Sii-25124*, se efectuó el seguimiento en los valores de pH mínimo y máximo de crecimiento registrados para *Sii-25124*, así como en pH 3.6 (identificado como pH ácido letal), utilizando para ello las cepas *Sii*: 1, 50.21, 50.31, 84.31, 92.1 y 107.1.

Del seguimiento de la DO_{600nm} de las cepas de *Sii* aisladas del pozol que fueron expuestas a pH 3.6 en caldo APT, al igual que la cepa *Sii-25124*, coinciden en la falta de crecimiento (entendida como la falta de incremento en la DO_{600nm}) y la pérdida de viabilidad tras 3 h de exposición, siendo por tanto un valor letal para *Sii*.

A diferencia del comportamiento homogéneo detectado en pH 3.6, la tolerancia a la acidez en pH 4.0 mostró variaciones. En la Figura 19A se muestra la cinética del seguimiento de

DO_{600nm} de las cepas en caldo APT con pH 4.0 en donde *Sii-25124* parece no mostrar crecimiento, sin embargo, muestra tolerancia y persiste a este valor de pH ya que tras 48 h de exposición se mantiene viable. Así mismo, respecto a *Sii-25124*, la mayor parte de las cepas son más tolerantes a la acidez, en orden decreciente de tolerancia a pH 4.0: *Sii-50.21* ≥ *Sii-84.31* ≥ *Sii-1* ≥ *Sii-92.1* ≥ *Sii-25124*, siendo menos tolerantes las cepas *Sii-50.31*, que pierde viabilidad tras 48 h de exposición y la cepa *Sii-107.1* que pierde viabilidad a las 24 h.

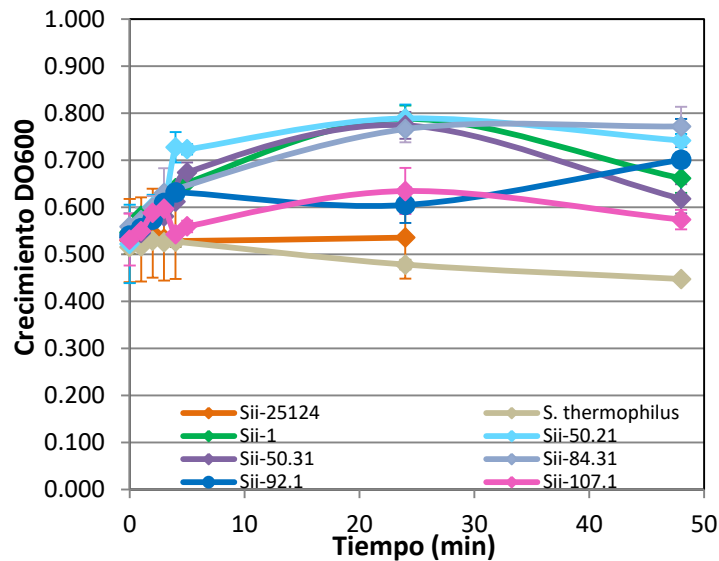


Figura 19. Modificación de la DO_{600nm} de cultivos de cepas de *Sii* aisladas de pozol en caldo APT ajustado a pH 4.0 con ácido láctico.. El crecimiento se refleja en el incremento de la DO_{600nm} confirmado con la viabilidad de la cepa. ± DS resultado de tres réplicas.

En cuanto a la tolerancia a la alcalinidad, la respuesta de *Sii-25124* respecto a las demás cepas de *Sii* es diferente; en tanto que ésta es tolerante a la alcalinidad persistiendo en caldo APT ajustado a pH 12.0 tras 24 h de exposición, manteniendo viabilidad, las demás cepas quedan inactivas tras 3 h de exposición. La tolerancia a la alcalinidad parece ser una particularidad de *Sii-25124*.

Al igual que las diferencias en tolerancia a la acidez y a la alcalinidad observadas entre las cepas de *Sii* aisladas de pozol, este tipo de variantes fenotípicas ya han sido reportadas en otras bacterias. Cepas de *S. mutans* mostraron diferencias en la tolerancia a la acidez y en la capacidad para formar biopelículas [Welin-Neilands & Svensäter, 2007], en *L. plantarum* con diferencias en la respuesta al estrés por temperatura y acidez [Ricciardi *et al.*, 2012], en *E. faecalis* y *E. faecium* se observaron diferencias en la tolerancia a la temperatura asociándose con el origen de las cepas (ambientales o clínicas) [Ahmad *et al.*, 2002] y en cepas de *S.*

thermophilus provenientes de diferentes productos lácteos éstas mostraron diferencias fenotípicas ante el consumo de diferentes carbohidratos [Giraffa *et al.*, 2001]. Se ha observado también que pese a que los cultivos sean adaptados o no antes de exponerse al reto, poseen subpoblaciones que pueden sobrevivir a éste [Jordan *et al.*, 1999].

Esta heterogeneidad de la población se ha considerado un fenómeno estocástico y ha sido atribuida a factores como la edad celular, diferencias en la progresión del ciclo celular (falta de sincronía), mutaciones, variaciones en microambientes, etc. [Muller *et al.*, 2010]. Igualmente, las diferencias fenotípicas que muestra una población (incluso si se trata de una población clonal) se han vinculado a diferencias en la expresión de genes. Esto se ha estudiado *in vivo* a nivel de relación con el hospedero, como en el caso de cepas de *S. gallolyticus* que muestra diferentes patrones de expresión de genes de pili [Danne *et al.*, 2011, 2014] o fracciones de población de *Salmonella* Typhimurium avirulentas que muestran el fenómeno de virulencia cooperativa al “distraer” al sistema inmune apoyando a las fracciones virulentas en la infección [Ackermann *et al.*, 2008; Diard *et al.*, 2013].

Así también, al exponer a la población por tiempo prolongado a condiciones de estrés, algunas sobrevivientes podrían desarrollar mutaciones importantes para adaptarse mejor al nicho o sólo mostrarse como variantes fisiológicas [Booth, 2002] que podrían bien representar la subpoblación persistente [Kint *et al.*, 2012]. La existencia de estas subpoblaciones contribuye en la supervivencia de la especie con modificaciones de la expresión genética para mejorar su adaptabilidad, de modo que una pequeña fracción de la población será capaz de sobrevivir las condiciones que eliminan a la mayor parte, es por tanto una estrategia transitoria de supervivencia [Booth, 2002; Kint *et al.*, 2002] pero tal vez aportando también mejoras genéticas a través de las mutaciones que surgiesen. Sería interesante profundizar en estas variaciones en los comportamientos de las cepas de *Sii* aisladas del pozol ante los diferentes valores de pH de interés, así como en las diferencias en la expresión de los genes evaluados en *Sii-25124* y considerar posibles aportaciones de la detección de quorum (*Quorum Sensing*), (que parece estar vinculado como activador de la diferenciación fenotípica para inducir el estado de persistencia de una fracción de la población [Balaban, 2011]).

6.6.3 Efecto de altas temperaturas sobre *Sii-25124*

6.6.3.1 Determinación del potencial de termotolerancia

Como parte de este estudio también se consideró evaluar el comportamiento de la cepa *Sii-25124* ante estrés térmico. Esto se debe, en parte, a que los efectos del estrés térmico han sido más estudiados respecto a otros tipos de estrés, así mismo, hay varios reportes que describen la protección cruzada generada por éste que inducen tolerancia al estrés ácido. Igualmente, dada la poca información sobre *Sii* en términos de termotolerancia, fue importante abordar este punto. Por ello se inició evaluando su desarrollo en caldo APT incubado a 50° C con un muestreo que se prolongó durante 1 h sin alcanzar a observar disminución en la población, aunque tampoco un aumento considerable en las UFC respecto al desarrollo a la temperatura control de 30° C (Figura 20). Además, la cepa mantiene su viabilidad pues al transferir a placas e incubar a 30° C, la cepa se recupera. De este modo se determinó que esta temperatura no resulta ser adecuada para generar choque térmico.

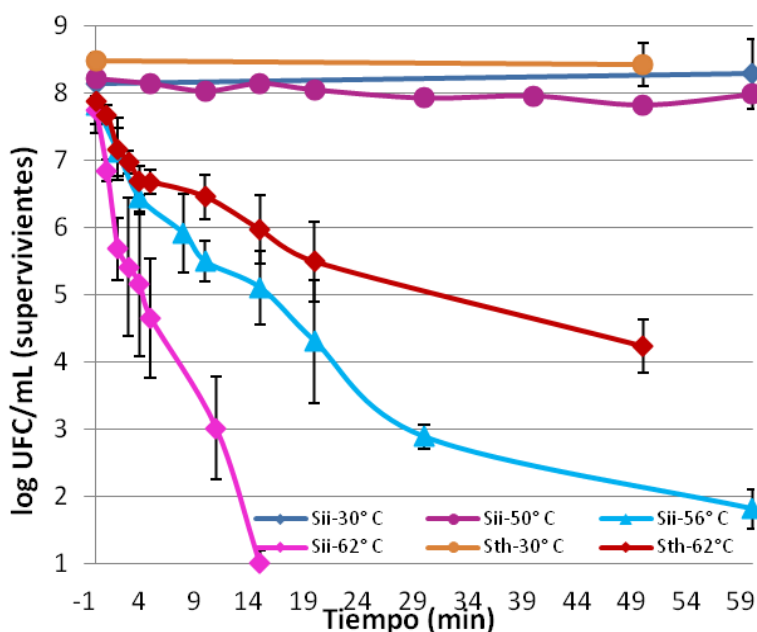


Figura 20. Cinética de supervivencia de la cepa *Sii-25124* incubada a 50, 56 y 62° C contrastando con la cepa *S. thermophilus* ATCC 19258, considerada termotolerante, incubada a 62° C; para ambas cepas la temperatura control 30° C. \pm DS resultado de tres réplicas independientes.

De este modo se optó por incrementar la temperatura utilizando 80° C como segunda aproximación, semejando la temperatura de una pasteurización rápida, sin embargo, la disminución de la población ocurrió en menos de 5 minutos (8 unidades logarítmicas de UFC/mL). Así que se optó por una temperatura intermedia entre ambas, siendo ésta 62° C. Ésta es una temperatura que ha sido utilizada también al evaluar la respuesta al estrés

térmico en otras bacterias, tanto para estudiar el efecto de protección cruzada así como para determinar los valores de reducción decimal [Flahaut *et al.*, 1997; Vasan *et al.*, 2013]. Así se determinó la cinética de supervivencia para *Sii-25124* a 62° C y también utilizando una temperatura intermedia entre ésta y 50° C, es decir, a 56° C. Adicionalmente se incluyó la cepa *S. thermophilus* ATCC 19258 como referencia ya que se trata de una bacteria termotolerante; sobrevive durante 30 minutos a 60° C e incluso la pasteurización a 72° C durante 15 segundos [Auffray *et al.*, 1995; Hutkins, 2000; Flint *et al.*, 2002].

El seguimiento de la cinética de termodestrucción para *Sii-25124* (*Sii*) y para *S. thermophilus* ATCC 19258 (*Sth*) se muestra en la Figura 20, junto con los controles incubados a 30° C. Se aprecia una disminución drástica de la población de *Sii-25124* a 62° C en 15 minutos (8 log₁₀ de UFC/mL), comparado con la cepa termotolerante *Sth-19258* que disminuye cerca de 2 unidades logarítmicas en el mismo lapso. Esta última cepa incluso muestra mejor supervivencia a 62° C respecto a *Sii-25124* a 56° C, temperatura donde *Sii* disminuyó 3 unidades logarítmicas en 15 minutos.

Contrastando ambas cepas, *Sii-25124* no muestra el potencial de termotolerancia que *S. thermophilus*, sin embargo, persiste tras 80 minutos de exposición a 56° C disminuyendo 7 log₁₀ pero aún recuperándose células viables. Además, la curva que representa la supervivencia a esta temperatura parece formar una cola. La formación de ésta es indicativo de que dentro de la población hay células sensibles y células persistentes (en menor porcentaje) quienes toleran mejor la modificación de la temperatura [Vasan *et al.*, 2013], siendo ejemplo de la heterogeneidad de la población clonal.

Ahora bien, un dato que posee mayor precisión para efectuar el contraste en la termotolerancia o en la falta de termotolerancia de *Sii-25124* es el valor de reducción decimal. Este valor se puede determinar a partir de la expresión de la ecuación de la recta que se obtiene con las curvas de termodestrucción, sin embargo, si no toda la curva se apega al modelo lineal, el valor de la dosis efectiva más probable es el que se determina con el segmento que muestra linealidad.

Ya que no se obtuvo un comportamiento netamente lineal (aparentemente se forman 2 pendientes en las 3 curvas), con los puntos indicados en la Figura 21 se obtuvo la

aproximación de la ecuación de la recta para proporcionar el valor de la dosis efectiva más probable para *Sii-25124* (a 56 y 62° C) y para *S. thermophilus* ATCC 19258 (a 62° C).

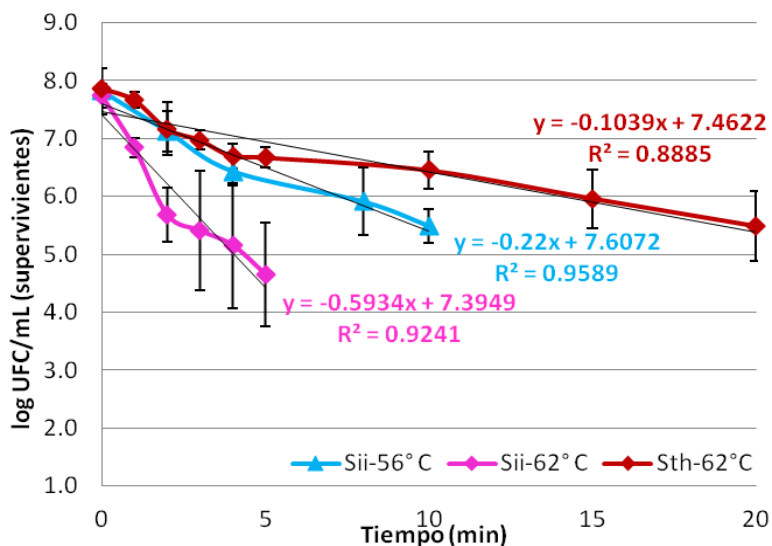


Figura 21. Determinación de la curva de termodestrucción para las cepas *Sii-25124* a 56 y 62°C y *Sth-19258* a 62° C. ± DS resultado de tres réplicas.

El cálculo se realizó considerando la siguiente ecuación:

$$\log N = \left(\frac{1}{D_{56}}\right)t + \log N_0 \rightarrow y = mx + b \dots\dots\text{ecuación 1}$$

Donde:

N_0 - UFC inicial

N - UFC al tiempo final de incubación

t - tiempo de incubación

Por lo tanto: $\frac{1}{D_{56^\circ C}} = 1/m \dots\dots\dots\text{ecuación 2}$

Sustituyendo en la ecuación 2 los valores de las pendientes indicadas en la gráfica de la Figura 21, los valores para la dosis efectiva más probable para *Sii-25124* a 56 y 62° C son 4.55 y 2.52 minutos, respectivamente. Y para *Sth-19258* la dosis efectiva más probable a 62°C es de 9.62 minutos. Con estos datos estimados, en la Tabla 20 se compara *Sii-25124* con valores de termodestrucción reportados para *S. thermophilus* junto con cepas de *E. coli* (termosensibles) y con *Leuconostoc mesenteroides*. Si bien *S. thermophilus* y *S. waius* a 62° C (en agua) muestran menor valor D respecto a *Sii-25124* (caldo APT) debe tomarse en cuenta que el medio de crecimiento afecta la susceptibilidad de las células ante el estrés, así, *S. thermophilus* en caldo APT a 62° C mostró un valor superior al valor D_{62} en agua.

Tabla 20. Contraste de la Dosis efectiva más probable de la cepa *Sii-25124* a 56 y 62° C, *Sth-19258* a 62° C y valores D para diferentes bacterias

Temperatura (°C)	Valor D (min)	Cepa	Medio	Referencia
56.0	4.55	<i>Sii-25124</i>	APT	Este trabajo [♣]
57.0	0.58	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Ringers solution	Franz & von Holy, 1996
60.0	2.00	<i>S. thermophilus</i> (H)	Agua	Flint <i>et al.</i> , 2002
	14.00		Leche	
62.0	2.52	<i>Sii-25124</i>	APT	Este trabajo [♣]
62.0	9.62	<i>S. thermophilus</i> [♦]	APT	Este trabajo [♣]
62.0	1.83	<i>S. thermophilus</i> [♦]	Agua	Flint <i>et al.</i> , 2002 [★]
	0.93	<i>S. waius</i>		
63.0	0.34	<i>L. mesenteroides</i>	Ringers solution	Franz & von Holy, 1996
63.6	0.19	<i>E. coli</i> O103:H2	BHI	Vasan <i>et al.</i> , 2013
	0.15	<i>E. coli</i> O157:H7		
	0.11	<i>E. coli</i> O121:H19		

♣El valor que se reporta en este trabajo corresponde a la Dosis efectiva más probable. ♦*S. thermophilus* ATCC 19258 ★Prueba con células adheridas a una superficie de acero inoxidable.

Poniendo de contraste la dosis efectiva más probable de *S. thermophilus* respecto a la de *Sii-25124* a 62° C se diría que esta última cepa no es termotolerante pero este valor es mayor que los registrados para cepas de *E. coli* (que no muestran resistencia particular a la temperatura [D'Aoust *et al.*, 1988; ICMSF, 1996]) y la bacteria ácido láctica *L. mesenteroides*. No se puede considerar que *Sii-25124* sea particularmente resistente al calor, aunque muestra cierta tolerancia, ciertamente no es termosensible y mantiene estabilidad y buen desarrollo a las temperaturas en las que pudiera darse una molienda caliente de los granos de maíz nixtamalizado.

Con estos datos se determinó utilizar 62° C durante 2 minutos para generar choque térmico en *Sii-25124* y así estudiar la inducción de protección cruzada.

6.6.4 Protección cruzada a pH ácido y a pH alcalino inducida por choque térmico

Los resultados de la supervivencia de *Sii-25124* sometido a choque térmico (2 minutos a 62° C) y sin choque térmico (control, 2 minutos a 30° C), que posteriormente fueron expuestas a condiciones de alcalinidad (pH 10.5) y acidez (pH 3.6) se muestran en la Figura 22. Considerando las escalas de ambas gráficas (Figura 22A, alcalino y 22B, ácido), nuevamente se hace patente la tolerancia a la alcalinidad de esta cepa; los porcentajes de supervivencia fueron drásticamente superiores en pH alcalino independientemente del tratamiento térmico.

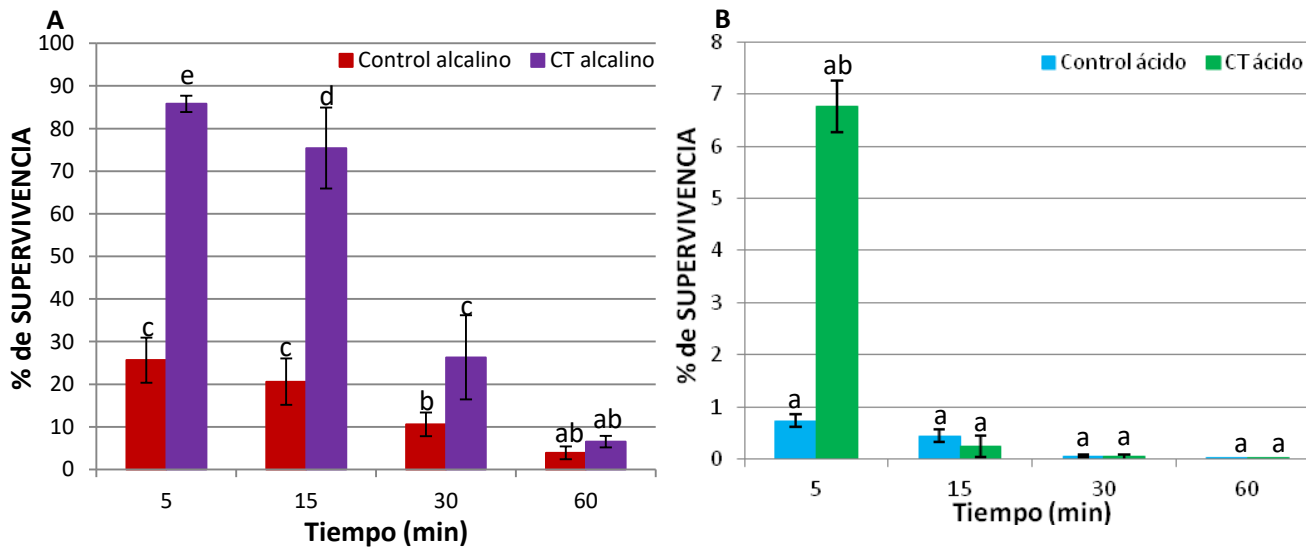


Figura 22. Supervivencia de cultivos de *Sii-25124* que fueron sometidos a choque térmico (CT) o sin choque (Control) y posteriormente fueron expuestos a medio con pH de reto: A. alcalino (pH 10.5) o a B. ácido letal (3.6). El porcentaje de supervivencia se determinó para cada tiempo de muestreo (5, 15, 30 y 60 minutos) respecto a las UFC/mL al tiempo cero, es decir, inmediatamente después de inocular y homogenizar el medio, que equivale al 100%. \pm DS resultado de 3 repeticiones independientes. ^{abc} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

El análisis de varianza, por medio de diseño factorial, permitió detectar la interacción de las 3 variables (temperatura equivalente a choque térmico y sin choque térmico, pH de reto, tiempo de exposición a pH modificado). Para apreciar bajo qué condiciones se obtiene una mejor supervivencia y si acaso el choque térmico generó protección cruzada para estrés por pH, se realizaron pruebas de rango múltiple (prueba de Duncan) con los resultados expresados en la Tabla 21 (para más detalles sobre el análisis estadístico, consultar la sección Anexo B).

Como resultado del análisis se generaron 5 grupos (del a al e), los porcentajes de supervivencia dentro de un grupo no muestran diferencia significativa ($P > 0.05$) entre ellos pero sí respecto al resto de los grupos ($P < 0.05$). El grupo con mejor supervivencia corresponde al e, es decir, la mejor supervivencia registrada fue para las células sometidas a choque térmico y posteriormente expuestas a estrés por pH alcalino durante 5 minutos, seguido por las células correspondientes al mismo cultivo pero tras 15 minutos de exposición al pH de reto (d) mostrando diferencia significativa respecto a las células que no recibieron choque térmico y que fueron expuestas al mismo valor de pH. Esto sugiere que el choque térmico genera protección cruzada para tolerar la alcalinidad, siendo similar al efecto de

protección cruzada descrito en *Salmonella enteritidis* y *E. faecalis* en los cuales las condiciones alcalinas indujeron termotolerancia [Humphrey *et al.*, 1991; Flahaut *et al.*, 1997].

Tabla 21. Comparación del efecto cruzado de las variables pH de reto (3.6, 10.5), tratamiento térmico (con choque térmico a 62° C, sin choque térmico a 30° C) y tiempo de exposición en pH modificado (tiempos 5, 15, 30 y 60 minutos)

pH de reto	Tratamiento térmico	Tiempo de exposición (min)	Porcentaje de supervivencia
3.6	c	60	0.00333 ± 0.002 ^a
3.6	CT	60	0.00600 ± 0.001 ^a
3.6	CT	30	0.04400 ± 0.046 ^a
3.6	c	30	0.05333 ± 0.026 ^a
3.6	CT	15	0.24100 ± 0.241 ^a
3.6	c	15	0.44200 ± 0.121 ^a
3.6	c	5	0.73100 ± 0.126 ^a
10.5	c	60	3.90367 ± 1.478 ^{ab}
10.5	CT	60	6.51833 ± 1.362 ^{ab}
3.6	CT	5	6.77333 ± 0.495 ^{ab}
10.5	c	30	10.58767 ± 2.742 ^b
10.5	c	15	20.60800 ± 5.461 ^c
10.5	c	5	25.67867 ± 5.293 ^c
10.5	CT	30	26.31433 ± 9.902 ^c
10.5	CT	15	75.40567 ± 9.503 ^d
10.5	CT	5	85.80967 ± 1-931 ^e

c. Control. CT. Choque térmico. ^{abc} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05). ± DS resultado de tres réplicas independientes.

Respecto a la exposición a pH ácido letal, aparentemente el choque térmico generó cierta ATR pero sólo durante los primeros 5 minutos de exposición a pH 3.6 (respuesta a choque ácido), sin embargo, quedando en el grupo *ab* el porcentaje de supervivencia registrado no muestra diferencia significativa respecto al cultivo sin choque térmico que fue expuesto a este pH. Por lo tanto, la evidencia indica que el choque térmico no genera protección cruzada que induzca una ATR en *Sii-25124*.

6.7 Estudio de la expresión diferenciada de genes ante la respuesta a estrés

6.7.1 Búsqueda de genes relacionados con estrés en el genoma de *Sii-25124*

A pesar de que se realizó la búsqueda y el análisis de secuencias ubicando exitosamente los genes *atpB*, *dnaK*, *groEL*, *groES*, *grpE*, *hrcA*, *ptsG* y *recA* en el genoma de *Sii-CJ18*, se decidió acotar la búsqueda y el diseño de oligos para *atpB*, *dnaK*, *groEL* y *ptsG*. Esto ya que en otros estudios se ha referenciado su expresión diferenciada bajo diferentes condiciones de estrés, incluyendo estrés ácido, alcalino y por choque térmico en otras BAL. Además, gracias a que se dispuso del *draft* del genoma de *Sii-25124* en la base datos del servidor RAST, se realizó la búsqueda de las secuencias de estos genes. Así, con el fin de corroborar

la identidad de las secuencias sugeridas por el análisis en este servidor, se realizó un blast contra la base de datos del NCBI. El resultado del megablast (*Highly similar sequences*) fue análogo al obtenido con el algoritmo blastn (*Somewhat similar*) y la síntesis de los datos obtenidos se reporta en la Tabla 22, indicando lo correspondiente a los primeros 10 a 13 microorganismos con las secuencias con mayor similitud a las sugeridas por el RAST. Para el gen *atpB* se puede observar que la mayor similitud (dada por los valores de *máximo score* mayores, menor valor de E, mayor % de identidad y mayor % de cobertura) es directamente con la secuencia de este gen en *Sii-CJ18*, seguido de los estreptococos filogenéticamente más relacionados (*S. lutetiensis*, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*). Esta misma tendencia se aprecia claramente en los resultados del blast para los demás genes, de manera que la identidad de las secuencias predichas para éstos en el *draft* del genoma de *Sii-25124* parecen ser muy acertadas.

En la Figura 23 se muestra el contexto genómico del gen *atpB* en *Sii-25124* y algunos estreptococos (fragmento de la visualización proporcionada por el servidor RAST). Interesante es destacar que la secuencia del cluster conformado por los genes que codifican para las 3 subunidades de F_0 y las 4 de F_1 mantienen el orden secuencial apreciado en otros estreptococos: *atpEBFHAGDC* [Cotter & Hill, 2003] (EBF corresponden a las subunidades *cab* de F_0 , HADGDC se corresponden con $\delta\alpha\gamma\beta\epsilon$ de F_1). Siendo, por tanto, consistente lo visto en el genoma de *Sii-CJ18* junto con lo observado en estos resultados para *Sii-25124*.

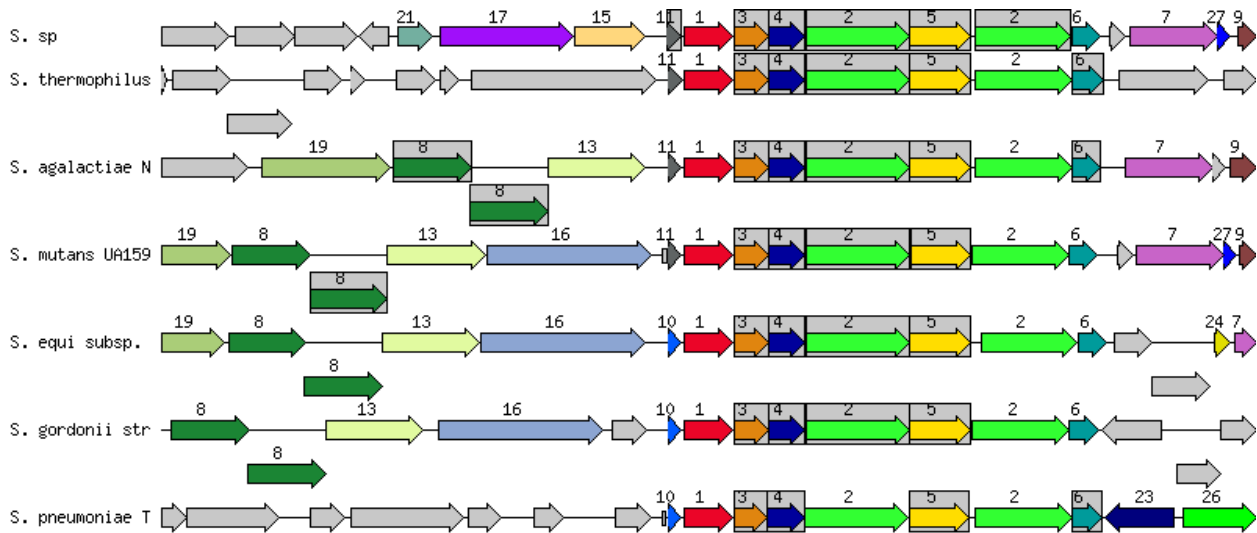


Figura 23. Visualización del contexto genómico del gen *atpB* obtenido por medio del servidor RAST. En la parte superior la representación del genoma de *Sii-25124* (indicado como *S. sp*), el cluster para la F_1F_0 -ATPasa en su secuencia está ordenado como: *atpEBFHAGDC*, en rojo y con el número 1 *atpB*. Dirección 5'→3' indicado de izquierda a derecha.

Tabla 22. Resultados del blast contra la base de datos del NCBI realizado para las secuencias predichas con el servidor RAST para los genes *atpB*, *dnaK*, *groEL* y *ptsG* en el *draft* del genoma de *Sij-25124*

Cepa	Max score	Total score	%ID	E-val	%Q cob
atpB					
<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> CJ18	1285	1285	99	0	100
<i>S. equinus</i>	1240	1240	98	0	100
<i>S. lutetiensis</i> 033	1236	1236	98	0	100
<i>S. macedonicus</i> ACA-DC 198	325	325	71	6e ⁻⁸⁵	98
<i>S. pasteurianus</i> ATCC 43144	289	289	72	4e ⁻⁷⁴	74
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> ATCC 43143	289	289	72	4e ⁻⁷⁴	74
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> ATCC BAA-2069	289	289	72	4e ⁻⁷⁴	74
<i>S. gallolyticus</i> UCN 34	289	289	72	4e ⁻⁷⁴	74
<i>S. salivarius</i> 57.1	210	210	68	3e ⁻⁵⁰	90
<i>S. salivarius</i> CCH 553	210	210	68	3e ⁻⁵⁰	90
<i>S. thermophilus</i> MN-BM-A01	208	208	68	1e ⁻⁴⁹	90
dnaK					
<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> CJ18	3292	3292	99	0	100
<i>S. lutetiensis</i> 033	3148	3148	98	0	100
<i>S. pasteurianus</i> ATCC 43144	2881	2881	95	0	100
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> ATCC 43143	2866	2866	95	0	100
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> ATCC BAA-2069	2866	2866	95	0	100
<i>S. gallolyticus</i> UCN 34	2866	2866	95	0	100
<i>S. macedonicus</i> ACA-DC 198	2866	2866	95	0	100
<i>S. agalactiae</i> SG-M1	2854	2854	88	0	100
<i>S. agalactiae</i> H002	2334	2334	88	0	100
<i>S. agalactiae</i> H003	2334	2334	88	0	100
groEL					
<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> CJ18	2879	2879	99	0	100
<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> ATCC BAA-102	2818	2818	99	0	97
<i>S. equinus</i> NCKUH32	2767	2767	99	0	97
<i>S. lutetiensis</i> 033	2668	2668	96	0	100
<i>S. lutetiensis</i> ATCC BAA-103	2626	2626	96	0	98
<i>S. lutetiensis</i> NCKUH11	2587	2587	96	0	96
<i>S. lutetiensis</i> NCKUH35	2583	2583	96	0	96
<i>S. lutetiensis</i> NCKUH27	2578	2578	96	0	96
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> ATCC 43143	2208	2208	90	0	100
<i>S. pasteurianus</i> ATCC 43144	2203	2203	90	0	100
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> ATCC BAA-2069	2203	2203	90	0	100
<i>S. gallolyticus</i> UCN 34	2201	2201	99	0	75
<i>S. infantarius</i> subsp. <i>Infantarius</i> P2VC1	2170	2170	90	0	98
ptsG					
<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> CJ18	3889	3889	99	0	100
<i>S. lutetiensis</i> 033	3649	3649	97	0	100
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> ATCC BAA-2069	2874	2974	89	0	100
<i>S. gallolyticus</i> UCN 34	2874	2874	89	0	100
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> ATCC 43143	2868	2913	89	0	100
<i>S. macedonicus</i> ACA-DC 198	2832	2832	89	0	100
<i>S. pasteurianus</i> ATCC 43144	2778	2778	88	0	100
<i>S. mutans</i> LG23	1353	1429	74	0	98
<i>S. mutans</i> UA159-FR	1335	1411	74	0	98
<i>S. mutans</i> UA159	1335	1411	74	0	98
<i>S. mutans</i> GS-5	1333	1409	74	0	98
<i>S. mutans</i> NN2025	1328	1403	74	0	98

%ID, porcentaje de identidad. %Q cobv, *porcentaje de cobertura* (se puede traducir como consulta de cobertura y que indica el máximo de similitud). El score (o puntaje) está dado en bits donde 2 bits equivalen a 1 nucleótido.

Para dar soporte adicional a la identificación de los genes *atpB*, *dnaK*, *groEL* y *ptsG* en *Sii-25124* y reiterar su posición como tal, se realizó la comparación de las secuencias predichas por el RAST con secuencias análogas de los genes correspondientes de estreptococos filogenéticamente relacionados y especies no relacionadas. Se efectuó un alineamiento múltiple (ClustalW) con el software BioEdit del cual, en la Figura 24, se muestra como ejemplo un fragmento de 230 a 310 bp para *atpB*. En la Figura 25 se aprecia el dendrograma por NJ elaborado con este alineamiento, reiterando la posición actual de la cepa como *S. infantarius* subsp. *infantarius* cepa 25124, su relación con *Sii-CJ18* y corroborando la identidad de la secuencia predicha para *atpB*. Los resultados para las demás secuencias son análogos (contextos genómicos y dendrogramas correspondientes en la sección Anexo B) y mantienen una gran similitud con sus homólogos en *Sii-CJ18*, manteniendo la relación filogenética con éste y *S. lutetiensis* 033 (los clusters formados son consistentes), lo que igualmente se observó con la secuenciación y comparación del gen *sodA*. Por ejemplo, de las 720 bp de *atpB*, *Sii-25124* difiere 3 respecto a *Sii-CJ18* y 14 bp respecto a *S. lutetiensis*, para *dnaK* la diferencia es de 4 bp de 1833 respecto a *Sii-CJ18* y 35 respecto a *S. lutetiensis*.

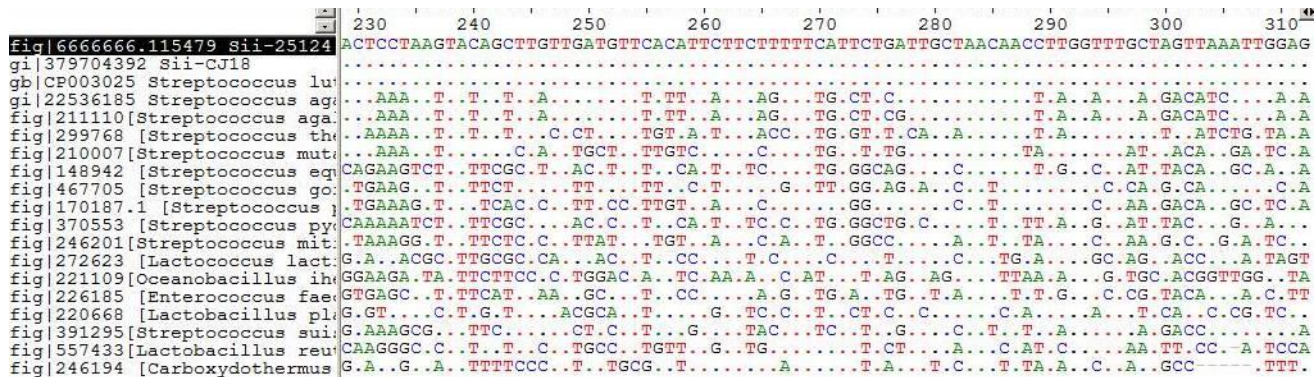


Figura 24. Alineamiento múltiple de secuencias del gen *aptB* que codifica para la subunidad α del sector F_0 de la F_1F_0 - ATPasa realizado utilizando la opción ClustalW del software BioEdit. Se muestra el segmento de ~230 a ~310 bp; en verde Adenina (A), rojo Timina (T), azul Citocina (C), negro Guanina (G); el punto del respectivo color representa la coincidencia de dicha base respecto a *Sii-25124* usada como referencia, cuyo nombre esta resaltado en letras blancas sobre fondo negro como: fig|66666666.115479 Sii-25124. En orden descendente las demás cepas son: *Sii-CJ18*, *S. lutetiensis* 033, *S. agalactiae* 2603 V/R, *S. agalactiae* NEM316, *S. thermophilus* CNRZ1066, *S. mutans* UA159, *S. equi* subsp. *equi*, *S. gordonii*, *S. pneumoniae* TIGR4, *S. pyogenes* MGAS2096, *S. mitis* NCTC12261, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I11403, *Oceanobacillus iheyensis* HTE831, *E. faecalis* V583, *L. plantarum* WCFS1, *S. suis* OSZYH33, *L. reuteri* JCM1112, *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* Z-2901. gi| y gb| indican la referencia de las secuencias obtenidas del NCBI y fig| las obtenidas directamente del servidor RAST.

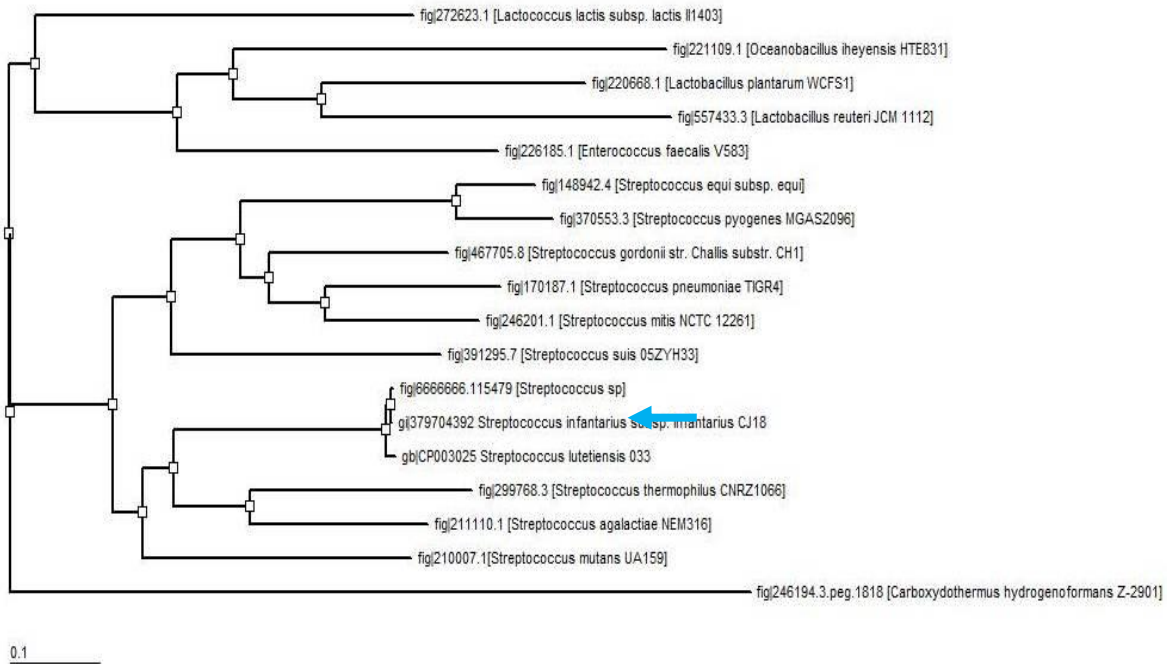


Figura 25. Dendrograma generado por NJ basado en datos obtenidos del *draft* del genoma de *Sii-25124* (identificado como fig|6666666.115479 [*Streptococcus* sp]) para el gen *atpB*; gi| y gb| indican la referencia de las secuencias obtenidas del NCBI y fig| las obtenidas directamente del servidor RAST. *Carboxydothemus hydrogenoformans* fue utilizado como grupo externo. La barra horizontal en la base del dendrograma indica las unidades del número de sustituciones por sitio entre pares de secuencias (distancia entre ellas). Bootstrap=1000.

6.7.2 Efecto del estrés por pH sobre la expresión de genes

6.7.2.1 Diseño de oligonucleótidos especie-específicos para genes de respuesta general y respuesta específica a estrés

Habiendo predicho las secuencias de los genes *atpB*, *dnaK*, *groEL* y *ptsG* en *Sii-25124* de forma consistente respecto a las secuencias de *Sii-CJ18* y *S. lutetiensis* 033, se procedió al diseño de los oligonucleótidos a utilizar para el estudio de la expresión de éstos bajo diferentes condiciones de estrés por medio de RT-PCR (PCR por transcriptasa reversa) y RT-qPCR (PCR cuantitativa). Las secuencias predichas fueron evaluadas en el servidor IDT (*PrimerQuest Tool*) teniendo como resultados varios juegos de oligos, seleccionando aquellos con el mínimo de horquillas posibles o que la T_m de éstos estuviera fuera del rango de las temperaturas comunes de una PCR. Adicionalmente, se buscó que la secuencia de los oligos no tuviera tándems de 5 o más nucleótidos GC o AT continuos pero tuvieran 1 o 2 nucleótidos para formar GC en 3' (haciendo más eficiente la unión con la *Taq polimerasa*). Los oligos que se definieron para este trabajo corresponden a los indicados en la Tabla 23, también se incluyen los dirigidos a la amplificación del gen de referencia para la RT-qPCR (16S rRNA). Datos adicionales de éstos se describen en la sección Anexo C.

Tabla 23. Oligonucleotidos diseñados para la evaluación de la expresión diferenciada de genes de *S. infantarius* subsp. *infantarius* cepa 25124 en condiciones ácidas (pH 3.6, 4.0) y alcalinas (pH 10.0)

Proteína	Gen	Primer	Secuencia 5'-3'	nt	Amplicón (bp)
Subunidad a de F ₁ F ₀ -ATPasa (EC 3.6.3.14)	<i>atpB</i>	atpB1	GCTGGTGAAGTTGTTACTGC	20	95
		atpB2	GCAACCCAAGCCAAGTTAAG	20	
Chaperona DnaK (EC 3.6.4.10)	<i>dnaK</i>	dnaK1	CCAGTTCGTCAAGCTCTTTC	20	128
		dnaK2	GGTTCTTTGCCAGTTTCAGC	20	
Chaperona GroEL (EC 3.6.4.9)	<i>groEL</i>	groEL1	CAATTGGTATCCGTCGTGG	19	105
		groEL2	CGACTTGGGCAATAGGTTTC	19	
Componente IIABC glucosa-específico (EII ^{Glc} , PTS glucosa permeasa, PEP-glucosa fosfotransferasa, PtsG, EC 2.7.1.69)	<i>ptsG</i>	ptsG1	TCTTCCCAGACTAAACATGCC	20	105
		ptsG2	CAGAGAATGGCACACCGTTA	20	
Gen 16S rRNA región V3 (gen de referencia)	16S rRNA	338V3For*	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	20	180
		158V3Rev**	ATTACCGCGCTGCTGG	17	

nt. Nucleótidos. bp. Pares de bases. * Lane, 1991. **Muyzer *et al.*, 1993.

6.7.2.2 Validación *in vitro* de oligonucleótidos, PCR en punto final

Para las muestras de DNA genómico de las cepas utilizadas (*Sii*-25124, 70.9 ng/μL, *Sii*-92, 10.2 ng/μL y *S. thermophilus* ATCC 19258, 120.0 ng/μL) bajo condiciones de una PCR estándar, los pares de oligos dirigidos a los genes *atpB*, *dnaK* y *ptsG* amplificaron positivamente un fragmento del peso previsto de acuerdo con la evaluación *in silico* (Figura 26).

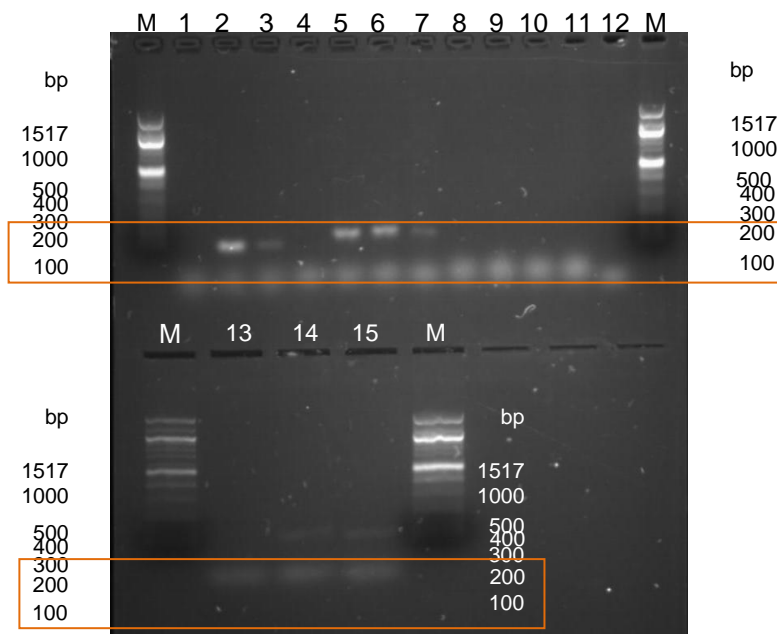


Figura 26. Amplificados obtenidos utilizando los oligos diseñados dirigidos a los genes *atpB* (fragmento de 95 bp), *dnaK* (fragmento de 128 pb), *groEL* (fragmento de 105 bp) y *ptsG* (fragmento de 105 bp). (M) Marcador de peso molecular. Carriles 1 a 3, *atpB*: control negativo, *Sii*-25124, *S. thermophilus*; Carriles 4 a 7, *dnaK*: control negativo, *Sii*-25124, *Sii*-92, *S. thermophilus*; Carriles 8 a 11, *groEL*: control negativo, *Sii*-25124, *Sii*-92, *S. thermophilus* (ausencia de banda para todas las muestras de DNA genómico); Carriles 12 a 15, *ptsG*: control negativo, *Sii*-25124, *Sii*-92, *S. thermophilus*. Gel de agarosa al 2%, electroforesis con 80V, 40 min.

6.7.2.3 Evaluación de la expresión diferenciada de genes por RT-qPCR

6.7.2.3.1 Extracción de RNA total y determinación de la concentración

La obtención de RNA total se confirmó exitosa determinándose la concentración y calidad del mismo por medio de medición espectrofotométrica (NanoDrop) con los resultados indicados en la Tabla 24. Los valores de $A_{260/280}$ entre 1.8 a 2.1, medida de la pureza, se consideran adecuados. Sólo dos muestras se encuentran ligeramente por debajo de este valor (duplicado pH 4.0, 1 hora y el duplicado en pH 3.6, 5 horas).

Tabla 24. Concentración y pureza del RNA total extraído de células de *S. infantarius* subsp. *infantarius* cepa 25124 expuestas a estrés por pH ácido (pH 3.6, 4.0) y alcalino (pH 10.0), utilizando pH 6.6 como control, tras 1 h de incubación y tras 5 h de incubación a 30° C

Tiempo 1h			Tiempo 5h		
Muestra	ng/μL	$A_{260/280}$	Muestra	ng/μL	$A_{260/280}$
1 pH 6.6	1 904.7	2.05	1 pH 6.6	2 796.5	2.01
2 pH 6.6	1 597.8	2.01	2 pH 6.6	1 255.7	1.93
1 pH 3.6	1 570.6	1.95	1 pH 3.6	887.5	1.83
2 pH 3.6	1 539.0	1.96	2 pH 3.6	547.1	1.70
1 pH 4.0	1 140.3	1.90	1 pH 4.0	311.2	1.92
2 pH 4.0	679.6	1.77	2 pH 4.0	303.4	1.96
1 pH10.0	533.9	1.86	1 pH10.0	71.8	1.83
2 pH10.0	504.5	1.94	2 pH10.0	336.0	1.94

6.7.2.3.2 Obtención de cDNA por retrotranscripción

La concentración y pureza del cDNA se determinó por espectrofotometría obteniendo los datos indicados en la Tabla 25. Este cDNA fue empleado para la PCR cuantitativa, considerando para ello una buena concentración aquella entre 1 000 a 3 000 ng/μL.

Tabla 25. Concentración y pureza del cDNA obtenido a partir del RNA total extraído de células de *S. infantarius* subsp. *infantarius* cepa 25124 expuestas a estrés por pH ácido (pH 3.6, 4.0) y alcalino (pH 10.0), utilizando pH 6.6 como control, tras 1 h de incubación y tras 5 h de incubación a 30° C

Tiempo 1h			Tiempo 5h		
Muestra	ng/μL	$A_{260/280}$	Muestra	ng/μL	$A_{260/280}$
1 pH 6.6	1 215.5	1.58	1 pH 6.6	1 237.3	1.55
2 pH 6.6	1 243.0	1.57	2 pH 6.6	1 141.8	1.57
1 pH 3.6	1 563.5	1.55	1 pH 3.6	1 248.6	1.68
2 pH 3.6	1 203.9	1.54	2 pH 3.6	1 309.3	1.70
1 pH 4.0	1 257.0	1.56	1 pH 4.0	1 267.0	1.58
2 pH 4.0	1 117.5	1.54	2 pH 4.0	1 154.1	1.56
1 pH10.0	1 171.4	1.51	1 pH10.0	1 313.3	1.67
2 pH10.0	1 130.7	1.55	2 pH10.0	1 175.5	1.53

El experimento se llevó a cabo por duplicado por lo que cada pH posee muestra por duplicado.

Al igual que para RNA, los valores de $A_{260/280}$ entre 1.8 a 2.1 se consideran recomendables en términos de buena pureza, sin embargo, en el caso del cDNA obtenido, estos valores se encuentran un par de décimas por debajo de esto, sin afectar los resultados obtenidos de la qPCR.

6.7.2.3.3 PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (RT-qPCR)

El método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001) permite obtener una cuantificación relativa para estimar cambios en la expresión de los genes de interés. Este método fue empleado para determinar si bajo condiciones de estrés letal por pH ácido (pH 3.6) y/o bajo condiciones subletales de pH (ácido de 4.0; alcalino de 10.0) se modifica la expresión de los genes relacionados con la respuesta general al estrés (*dnaK*, *groEL*) y genes particulares como *atpB* (para determinar la sobreexpresión de una subunidad de la F_1F_0 -ATPasa como medida de la expresión aumentada de ésta) y *ptsG* (glucosa permeasa del PEP-PTS y medida de la tasa metabólica celular).

Los resultados obtenidos para la determinación tras 1 hora y 5 horas de exposición a las condiciones de estrés por pH, utilizando los resultados de las células en pH 6.6 como normalizadores, se presentan en la Figura 27.

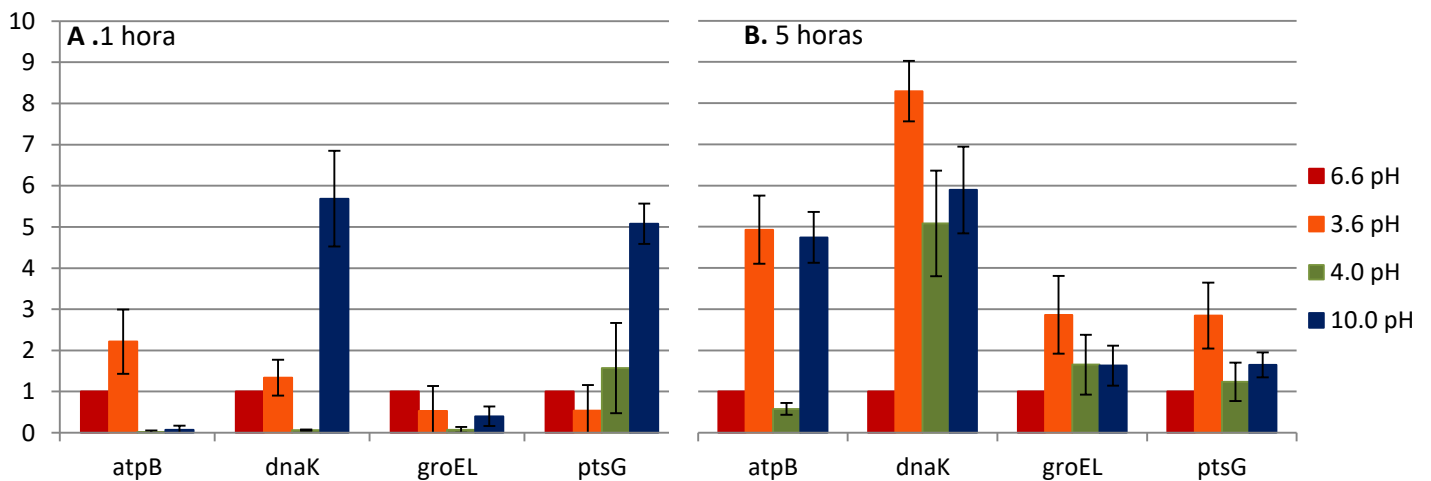


Figura 27. Expresión diferenciada de: *atpB* (F_1F_0 -ATPasa), *dnaK* (proteína de choque térmico), *groEL* (proteína de choque térmico) y *ptsG* (glucosa permeasa del PEP-PTS) en células de *Sii-25124* tras exponer a condiciones de estrés letal en pH 3.6, y subletal en pH 4.0 y en condiciones alcalinas en pH 10.0. A. cambios en la expresión tras 1 hora, B. cambios tras 5 horas de exposición. La expresión de genes fue normalizada respecto a las células en pH 6.6 (control), usando como gen housekeeping el 16S rRNA.

Considerando que pH 3.6 equivale a un choque ácido, se puede apreciar que tras una hora de exposición a esta condición (Figura 27A) se indujo la expresión del gen *atpB* 2 veces comparando respecto a células crecidas en pH 6.6. Los demás genes evaluados parecen no estar modificando su expresión, al menos durante este periodo de tiempo, sin embargo, el estar expuesto durante 5 horas a este pH ácido (Figura 27B) no solamente se detectó la expresión incrementada de *atpB*, 5 veces mayor que en las células en pH 6.6, *dnaK* también parece estar siendo inducido al permanecer un tiempo prolongado en estas condiciones alcanzando un incremento 8 veces mayor de lo que mostraron células en pH 6.6. En menor medida *groEL* y *ptsG* también se indujeron.

Siendo descrita la función de la F₁F₀-ATPasa como el principal mecanismo en la homeostasis celular ante choque ácido y por condiciones de estrés por pH bajo, el aumento en su actividad y/o expresión ocurre bajo estas condiciones, aumentando con ello la supervivencia celular. Esto se ha observado en estreptococos y enterococos como *S. macedonicus* ACA-DC 198, *S. mutans* UA159, *S. mutans* GS-5, *S. pneumoniae* R6, y *E. hirae* ATCC 9790 [Belli & Marquis, 1991; Hamilton & Buckley, 1991; Martín-Galiano *et al.*, 2001; Lemos *et al.*, 2007; Papadimitriou *et al.*, 2007], así como otras BAL [Kobayashi *et al.*, 1986; Nannen & Hutkins, 1990; Belli & Marquis, 1991; Hartke *et al.*, 1996]. Entonces, el incremento en la expresión de *atpB* en *Sii-25124* implica que la F₁F₀-ATPasa está siendo sobreexpresada desde la primera hora de exposición a pH ácido, de manera que también es un mecanismo importante para sobrevivir a choque ácido.

Por otro lado, es posible que la cooperación del PEP-PTS no sea relevante para *Sii-25124* o que no sea tan evidente por medio de la sobreexpresión de *ptsG*. Entre algunos estreptococos estos resultados no son homogéneos, p. ej., este sistema se ve inhibido en *S. mutans* en condiciones ácidas [Vadeboncoeur *et al.*, 1987; Nascimento *et al.*, 2004] en tanto que en *S. sobrinus* se incrementa [Nascimento *et al.*, 2004]. Si bien la expresión de *ptsG* aumenta en *Sii-25124* al estar 5 horas bajo condiciones de choque ácido, su contribución fisiológica no está clara y no necesariamente ésta está ligada a la sobreexpresión sino que bien podría estar incrementando su actividad. Se ha observado que metabolitos como la glucosa (presente en el caldo APT) y la sacarosa mejoran la supervivencia celular de diferentes BAL ante pH ácido letal, siendo que la glucólisis puede llevarse a cabo aunque el crecimiento se detenga, siempre y cuando la integridad de las enzimas glucolíticas no se vea

seriamente comprometida [Corcoran *et al.*, 2005; Sheng & Marquis, 2006]. De esta manera, si la actividad del PEP-PTS se ve incrementada en *Sii-25124*, la glucólisis estaría proporcionando el ATP necesario como sustrato para que la F_1F_0 -ATPasa mantenga el gradiente de protones.

Así mismo, el hecho de que tras 5 horas en pH 3.6 la chaperona DnaK se esté sobreexpresando, al igual que GroEL aunque en menor medida, implica que la célula está censando condiciones de estrés ambientales. Ambas proteínas son proteínas de choque térmico, chaperonas tipo 1 (con actividad de ATPasa) que corresponden a las chaperonas que se encargan del correcto plegamiento de polipéptidos y proteínas. Se ha observado que éstas son inducidas en condiciones de estrés como pH ligeramente ácido, así como en choque ácido en *Lactococcus lactis*, *S. mutans* y *S. sobrinus* [Hartke *et al.*, 1996; Jayarama *et al.*, 1997; Lemos *et al.*, 2001; Nascimento *et al.*, 2004]. De esta manera bien, en su papel de chaperonas, podrían también estar contribuyendo en mantener la integridad de las proteínas del PEP-PTS e incluso en la biogénesis o estabilización de la F_1F_0 -ATPasa como han sugerido Lemos *et al.* (2001, 2007). De acuerdo a estos autores, la DnaK particularmente, al valorar el daño a las proteínas en condiciones de pH bajo puede contribuir a estabilizar la F_1F_0 -ATPasa para preservar su integridad y funcionalidad, además de que también parece tener un papel para estabilizar un activador transcripcional del operón *atp* requerido para una inducción efectiva en pH bajo.

En lo que respecta a la exposición a pH 4.0 (considerado el pH mínimo de crecimiento para *Sii-25124*) una hora de exposición parece no despertar una respuesta de estrés en la célula (Figura 27A) ya que ninguno de los genes se vio inducido de forma relevante. Aunque se ha reportado que la adaptación prolongada en un medio moderadamente ácido mejora la capacidad para sobrevivir un subsecuente choque ácido [Belli & Marquis, 1991], no resulta tan evidente la inducción de la expresión de estas proteínas en pH 4.0 y ya que en las pruebas de reto se observó una mejor supervivencia de *Sii-25124* adaptado en este valor de pH respecto a células no adaptadas, es posible que entonces otros mecanismos estén implicados en ello, tal vez de manera constitutiva sin requerir síntesis *de novo*.

En tanto que tras 5 h de exposición, equivalente al tiempo de adaptación utilizado en las pruebas de reto, sólo hubo un incremento destacado en la expresión de *dnaK* que aumento 5

veces (Figura 27B). En menor medida *groEL* y *ptsG*, siendo aparentemente una menor contribución de estas dos proteínas en la homeostasis aunque también se encontrarían disponibles para actuar ante el cambio drástico al confrontar estas células a pH ácido letal, amortiguando el choque ácido y contribuyendo en cierta medida a una mejor supervivencia como lo observado en las pruebas de reto.

En cuanto a *ptsG*, su expresión no parece modificarse tras 1 hora o 5 horas de exposición a pH 4.0, aunque es ligeramente superior a lo que mostraron células en pH 6.6; su inducción se da aparentemente de forma tardía cuando las células son expuestas a choque ácido como se vio tras 5 horas en pH 3.6. Aunque el PEP-PTS no se vio inhibido como es el caso de *S. mutans* [Nascimento *et al.*, 2004], su posible contribución a la ATR o a la respuesta a choque ácido parece estar relegada a una actividad sostenida o bien incrementada en pH ácido (por debajo de las condiciones normales para la célula como en *S. sobrinus* [Nascimento *et al.*, 2004]) más que a una inducción de su expresión.

Ahora bien, la respuesta ante estrés por pH alcalino ha sido en menor medida estudiada en las BAL. El que *Sii-25124* muestre una tendencia a ser tolerante a condiciones alcalinas ha resultado muy interesante. Dentro de los lactobacilos se han reportado algunos que son tolerantes a la alcalinidad (sobreviviendo valores de pH entre 8.5-8.9) como *L. casei*, *L. paracasei* subsp. *tolerans*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. curvatus*, *L. pentosus* y *L. plantarum*, éstos procedentes de material vegetal; los hay moderadamente tolerantes a la alcalinidad (valores de pH de 8.1 a 8.5) y corresponden a aislados obtenidos del tracto gastrointestinal, y también los hay que no toleran la alcalinidad (6.7 a 7.1), tendencia que mostraron los lactobacilos aislados de productos lácteos [Sawatari & Yokota, 2007]. A pesar de ello poco se sabe de los mecanismos implicados en esta tolerancia. Así, ante la perspectiva de similitudes entre la respuesta a estrés por pH ácido y por pH alcalino observada por la protección cruzada que indujo tolerancia a choque ácido al adaptar las células en pH 10.0 y en pH 11.0, se evaluaron los mismos genes implicados en la respuesta a estrés ácido.

En las células expuestas a pH 10.0 durante 1 hora se observó la inducción de *dnaK* casi 6 veces más que lo expresado en células en pH 6.6 (Figura 27A). Aunque *groEL* no se está induciendo, la expresión de *dnaK* es consistente con lo reportado para *E. faecalis* en donde la adaptación en pH 10.5 generó la sobreexpresión de DnaK y GroEL y mostró generar

termotolerancia (protección cruzada) [Flahaut *et al.*, 1997]. Ciertamente esto puede ser indicativo de que *Sii-25124* percibe el estrés en el medio alcalino y requiere la contribución de DnaK y también del PEP-PTS. Este último se ve reflejado en la inducción de *ptsG*, tal vez estando involucrado en aumentar el transporte de glucosa al citoplasma para proporcionar suficiente ATP a partir de glucólisis y así contribuir a los pools de ATP para la función de DnaK, estimulando también el aumento de la fermentación de la glucosa y con ello acidificar el medio por la subsecuente producción de ácido. De forma análoga, los estreptococos responden a la acidificación aumentando el catabolismo de aminoácidos para alcalinizar localmente el medio circundante con los grupos amino liberados [Sanders *et al.*, 1999; Burne & Marquis, 2000; Coter & Hill, 2003; Griswold *et al.*, 2006].

En el caso de estar expuesto a este valor alcalino de pH durante 5 horas, *Sii-25124* parece no modificar los niveles de expresión de *dnaK* respecto a los determinados durante 1 hora de exposición a la alcalinidad (Figura 27A). En cambio, *ptsG* disminuyó y *atpB* fue inducido, siendo incluso equiparable su expresión a la determinada para células sometidas a choque ácido en pH 3.6 durante 5 horas (Figura 27B). Un efecto similar fue observado en *Listeria monocytogenes*, bacteria Gram-positiva que aunque no es BAL está relacionada con éstas. En ella se reportó la inducción de *atpG* (subunidad gamma del dominio F₁) y de *atpD* (subunidad beta del dominio F₁) en condiciones alcalinas, participando en la internalización de protones con función de ATPsintasa [Giotis *et al.*, 2010].

La F₁F₀-ATPasa tiene una función reversible como ATPasa-ATPsintasa que depende de la demanda de transporte de protones, el catabolismo de sustratos (aerobio, anaerobio) y el ATP disponible [Papadimitriou *et al.*, 2016]; su función principal es mantener el gradiente electroquímico (ΔpH y $\Delta\psi$), siendo sensible a cambios en éste. De esta manera, en *Sii-25124* durante la exposición prolongada en pH alcalino, esta enzima puede revertir su función internalizando protones como ATPsintasa para mantener el ΔpH . Con ello se puede acidificar el citoplasma como ocurre en otras bacterias [Padan *et al.*, 2005] o en alcalófilos como *Bacillus* sp. TA2A.1 que incluso posee adaptaciones específicas en las subunidades a y c del dominio F₀ que permiten incrementar la captura de protones de forma eficiente en condiciones alcalinas y no en condiciones de pH neutro [McMillan *et al.*, 2007]. Así también, de ser el caso de que las enzimas glucolíticas estén comprometidas, consistente con la

disminución en la expresión de *ptsG*, por medio de la actividad de F₁F₀-ATP sintasa se generaría el ATP necesario para mantener la función celular. Análogo a *S. mutans*, cuando la glucólisis no puede llevarse a cabo en condiciones ácidas y en carencia de carbohidratos fermentables, la F₁F₀-ATPasa adquiere la función de ATP sintasa manteniendo los pools de ATP [Sheng & Marquis, 2006].

Es interesante resaltar la relación potencial entre la sobreexpresión de la F₁F₀-ATPasa en *Sii-25124* durante la exposición prolongada a pH 10.0 y el efecto de protección cruzada observado por inducción en pH alcalino para tolerar la prueba de reto en pH ácido letal. Considerando el tiempo de exposición en pH 10.0 equivalente al periodo de adaptación previo a la prueba de reto, habiéndose sobreexpresado esta enzima y siendo sensible al cambio en el Δ pH sólo le sería necesario revertir su función de ATP sintasa a ATPasa para evitar daños por el choque ácido, incluso teniendo suficiente ATP para cubrir la demanda, incrementando la supervivencia celular ante pH 3.6, previa adaptación en pH alcalino. Siendo así también novedoso el apreciar su doble función ante la respuesta a pH ácido y ante pH alcalino.

Ciertamente también es notable el hecho de que en el periodo de adaptación en pH 10.0 (evaluado en las pruebas de reto) *atpB* sea inducido en *Sii-25124* en la misma medida que en choque ácido y que los niveles de expresión de *dnaK*, *groEL* y *ptsG* sean similares a los inducidos en la adaptación en pH 4.0 (Figura 27B). Esto es consistente con los resultados de las pruebas de reto donde la adaptación en pH 4.0, 10.0 y 11.0 generaron mejor supervivencia ante pH letal en comparación con células no adaptadas. De manera que ambos tipos de adaptación, en medio ácido subletal y medio alcalino subletal, están generando una expresión similar de genes involucrados en la ATR.

7. CONCLUSIONES

Se determinó que 26 de 28 cepas que conformaban la colección de aislados de *Streptococcus* spp. obtenidos de pozol de Villahermosa, Tabasco, corresponden a *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*. Las dos cepas adicionales fueron identificadas como *Staphylococcus pasteurii* y *Staphylococcus epidermidis*.

De éstas, las correspondientes a *Sii* tienden a ser fisiológicamente homogéneas: son amilolíticas y xilanolíticas, al igual que *Sii-25124*, mantienen un crecimiento homogéneo en caldo APT y tienen velocidades específicas de crecimiento análogas. Así mismo, pH 3.6 resulta letal para todos ellos. Sin embargo, se observa heterogeneidad en la población en cuanto a: la fermentación de la lactosa, la respuesta de tolerancia a pH 4.0, aunque mayormente resultaron tolerantes a la acidez, y mostraron diferencia respecto a *Sii-25124*, que es más tolerante a la alcalinidad y que parece ser característico sólo de ésta. Por estas particularidades, la respuesta obtenida de la evaluación de *Sii-25124* ante los diferentes tipos de estrés representaría sólo el comportamiento de una de las fracciones de la población. Particularmente, el pH_{mínimo} de crecimiento para esta cepa es de 4.0, el pH_{máximo} de crecimiento 11.0 y el pH_{óptimo} 8.0.

Sii-25124 es capaz de inducir una ATR por adaptación en pH ácido subletal y por efecto de protección cruzada generado por la adaptación en pH alcalino. Ambas condiciones incrementaron la supervivencia ante pH 3.6 con una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre la supervivencia registrada para las células adaptadas respecto a células no adaptadas (pH 6.6).

También se apreció que la inducción de los genes *atpB*, *dnaK*, *groEL* y *ptsG*, aparentemente implicada en el traslape entre la respuesta a estrés por pH alcalino (10.0) y por choque ácido (3.6). Observándose que la función de F_1F_0 -ATPasa posee gran valor para esta bacteria en condiciones de pH ácido letal, con función reversible de ATPasa-bomba de protones en condiciones ácida y como ATPsintasa-internalizando protones en condiciones alcalinas. De tal manera que esta ATR puede ser montada durante las primeras etapas de la fermentación (equivalentes a la adaptación).

Sii-25124 no es termotolerante como *S. thermophilus* pero tampoco sensible, persiste hasta 80 minutos a 56° C. Incluso si el choque térmico no generó protección cruzada para inducir ATR ante el pH letal, éste indujo protección cruzada para tolerar la alcalinidad con una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en el porcentaje de supervivencia. Con ello se observa un vínculo entre las respuestas a ambos tipos de estrés, si bien, los mecanismos implicados se desconocen.

De esta manera, las características de *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* observadas como resultado de este trabajo (capacidad amilolítica y xilanolítica, heterogeneidad de la población en su respuesta al pH, amplio rango de pH de crecimiento, tolerancia a la acidez, tolerancia a la alcalinidad, inducción de ATR por adaptación en pH subletal ácido o alcalino, protección cruzada para tolerar la alcalinidad inducida por temperatura), contribuyen a la plasticidad de esta cepa para adaptarse. Esto constituye una ventaja de *Sii* para colonizar el nicho, dominar en etapas tempranas de la fermentación y persistir en etapas tardías en el pozol, pese a los cambios de pH.

8. REFERENCIAS

- Abdelgadir, W., Nielsen, D.S., Hamad, S. & Jakobsen, M. (2008) A traditional Sudanese fermented camel's milk product, *Gariss*, as a habitat of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*. *J Food Microbiol.* **127**:215-219.
- Ackermann, M., Stecher, B., Freed, N.E., Songhet, P., Hardt, W.-D. & Doebeli, M. (2008) Self-destructive cooperation mediated by phenotypic noise. *Nature (Letters)* **454**:987-990.
- Adolphson, S.J., Dunn, M.L., Jefferies, L.K. & Steele, F.M. (2013) Isolation and characterization of the microflora of nixtamalized corn masa. *J Food Microbiol.* **165**:209-213.
- Agati, V., Guyot, J.P., Morlon-Guyot, J., Talamond, P. & Hounhouigan, D.J. (1998) Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawè and ogi) from Benin. *J Appl Microbiol.* **85**:512-520.
- Ahmad, M., Smith, D.G. & Mahboob, S. (2002) Effecto of heat treatment on stationary phase cells of *Enterococcus faecium* and *E. faecalis*. *J Food Agri Biol.* **4**:234-236.
- Ampe, F., ben Omar, N. & Guyot, J.P. (1999a) Culture-independent quantification of physiologically-active microbial groups in fermented foods using rRNA-targeted oligonucleotid probes: application to pozol, a Mexican lactic acid fermented maize dough. *J Appl Microbiol.* **60**:91-97.
- Ampe F., ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C. & Guyot, J.P. (1999b) Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl Environ Microbiol.* **65**:5464-5473.
- Anónimo (2007) *Streptococcus thermophilus* (TH-4®). 13/10/2020, de Chr. Hansen Sitio web <http://www.chr-hansen.com/probiotic-supplements-and-infant-formula/cards/product-cards/streptococcus-thermophilus-th-4>
- Auffray, Y., Lecesne, E., Hartke, A. & Boutibonnes, P. (1995) Basic features of the *Streptococcus thermophilus* heat shock response. *Curr Microbiol.* **30**:87-91.
- Balaban, N.Q. (2011) Persistence: mechanisms for triggering and enhancing phenotypic variability. *Curr Opin Genet Develop.* **21**:728-775.
- Becerril-Sánchez, L.A. (2012) Tipificación fenotípica y molecular de cepas de *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp. aisladas de pozol de Villahermosa Tabasco México. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México.
- Beck, M., Frodl, R. & Frunke, G. (2008) Comprehensive study of strains previously designated *Streptococcus bovis* consecutively isolated from human blood cultures and emended description of *Streptococcus gallolyticus* and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli*. *J Clin Microbiol.* **46**:2966-2972.
- Belli, W.A. & Marquis, R.E. (1991) Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continous culture. *Appl Environ Microbiol.* **57**:1134-1138.
- Ben Omar N. & Ampe, F. (2000) Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough Pozol. *Appl Env Microbiol.* **66**:3664-3673.

- Bender, G.R., Sutton, S.V. & Marquis, R.E. (1986) Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infect Immun.* **53**:331–338.
- Biarç, J., Nguyen, I.S., Pini, A., Gossé, F., Richert, S., Thiersé, D., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., Raul, F., Klein, J.P. & Schöller-Guinard, M. (2004) Carcinogenic properties of proteins with pro-inflammatory activity from *Streptococcus infantarius* (formerly *S. bovis*). *Carcinogenesis.* **25**:1477–1484.
- Bolaños, S. (2004) Variabilidad en la microbiota de diferentes muestras de pozol, determinada mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México.
- Boleij, A., Schaeps, R.M.J. & Tjalsma, H. (2009) Association between *Streptococcus bovis* and colon cancer. *J Clin Microbiol.* **47**:516.
- Boleij, A., Muytjens, C.M.J., Bukhari, S.I., Cayet, N., Glaser, P., Hermans, P.W.M., Swinkels, D.W., Bolhuis, A. & Tjalsma, H. (2011) Novel clues on the specific association of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* with colorectal cancer. *J Infect Dis.* **203**:1101-1109.
- Booth, I.R. (2002) Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *I J Food Microbiol.* **78**:19-30.
- Boutibonnes, P., Gillot, B., Auffray, Y. & Thammavongs, B. (1991) Heat shock induces thermotolerance and inhibition of lysis in a lysogenic strain of *Lactococcus lactis*. *I J Food Microbiol.* **14**:1-10.
- Boutibonnes, P., Tranchard, C., Hartke, A., Thammavongs, B. & Auffray, Y. (1992) Is thermotolerance correlated to heat-shock protein synthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*? *I J Food Microbiol.* **16**:227-236.
- Bouvet, A., Grimont, F., Collins, M.D., Benaoudia, F., Devine, C., Regnault, B. & Grimont, P.A. (1997) *Streptococcus infantarius* sp. nov. related to *Streptococcus bovis* and *Streptococcus equinus*. *Adv Exp Med Biol.* **418**:393-395.
- Brauman, A., Keleke, S., Malonga, M., Miambi, E. & Ampe, F. (1996) Microbiological and biochemical characterization of cassava retting, a traditional lactic acid fermentation for foo-foo (cassava flour) production. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2854-2858.
- Bridge, P.D. & Sneath, P.H.A. (1983) Numerical taxonomy of *Streptococcus*. *J Gen Microbiol.* **129**:565-597.
- Broadbent, J.R., Oberg, C.J., Wang, H. & Wei, L. (1997) Attributes of the heat shock response in three species of dairy *Lactobacillus*. *System Appl Microbiol.* **20**:12-19.
- Burne, R.A. & Marquis, R.E. (2000) Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol Lett.* **193**:1-6.
- Cabra, V.C. (2000) Estudio cinético comparativo de la fermentación de masa de pozol elaborada en dos condiciones higiénicas distintas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México.
- Cano-Estrada, A. & González-Halphen, D. (2011) F₁F₀-ATP Sintasa y sus diferencias estructurales. *Revista de Educación Bioquímica.* **30**:98-108.

Cañas, A., Barzana, E., Owens, J. & Wachter, C. (1993a) La elaboración de pozol en Los Altos de Chiapas. *Ciencias*. **44**:219-229.

Cañas, A., Barzana, E., Owens, J. & Wachter, C. (1993b) Estudio de la variabilidad en los métodos de producción de pozol en los Altos de Chiapas. In: Alimentos fermentados indígenas de México. UNAM. Pp. 69-74.

Chan, P.F., Foster, S.J., Ingham, E. & Clements, M.O. (1998) The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor σ^B controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. *J Bacteriol*. **180**: 6082-6089.

Cooper-Bribiesca, B., Navarro-Ocaña, A., Díaz-Ruiz, G., Aguilar-Osorio, G., Rodríguez-Sanoja, R. & Wachter, C. (2018) Lactic acid fermentation of arabinoxylan from *nejayote* by *Streptococcus infantarius* 25124 isolated from pozol. *Front Microbiol*. **9**:3061

Corcoran, B.M., Stanton, C., Fitzgerald, G.F. & Ross, R.P. (2005) Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Appl Environ Microbiol*. **71**:3060-3067.

Cortés, G.A., San Martín, E., Martínez-Bustos, F. & Vázquez, C.M.G. (2005) Tortillas of blue maize (*Zea mays L.*) prepared by a fractionated process of nixtamalization: Analysis using Response Surface Methodology. *Food Engineering*. **66**:273-281.

Correidora, J. C., Alonso, M. P., García, J. F., Casariego, E., Coira, A., Rodríguez, A., Pita, J., Louzao, C., Pombo, B., López, M. J. & Varela, J. (2005) Clinical characteristics and significance of *Streptococcus salivarius* bacteremia and *Streptococcus bovis* bacteremia: a prospective 16-year study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **24**:250-255.

Corredoira, J., Alonso, M.P., Coira, A. & Varela, J. (2008) Association between *Streptococcus infantarius* (formerly *S. bovis* II/1) bacteremia and noncolonic cancer. *J Clin Microbiol*. **46**:1570.

Correidora, J., Alonso, M.P., García-Garrote, F., García-Pais, M.J., Coira, A., Rabuñal, R., Gonzalez-Ramirez, A., Pita, J., Matesanz, M., Velasco, D., López-Álvarez, M.J. & Varela, J. (2014) *Streptococcus bovis* group and biliary tract infections: an analysis of 51 cases. *Clin Microbiol Infect*. **20**:405-409.

Cotter, P.D. & Hill, C. (2003) Surviving the acid test responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol Biol Rev*. **67**:429-453.

Coykendall, A. L. & Gustafson, K. B. (1985) Deoxyribonucleic acid hybridization among strains of *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus bovis*. *Int J Syst Bacteriol*. **35**:274-280.

Cueto, M.C. (2001) Estudio de la Resistencia a valores bajos de pH de cepas patógenas de *Escherichia coli* aisladas de pozol. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México.

Daeschel, M.A. (1989) Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Biotechnol*. **43**:164-167.

Danne, C., Enteza, J.M., Mallet, A., Briadet, R., Debarbouille, M., Nato, F., Glaser, P., Jouvion, G., Moreillon, P., Trieu-Cuot, P. & Dramsi, S. (2011) Molecular characterization of a *Streptococcus gallolyticus* genomic island encoding a pilus involved in endocarditis. *J Infect Dis*. **204**:1960-1970.

- Danne, C., Dubrac, S., Trieu-Cuot, P. & Dramsi, S. (2014) Single cell stochastic regulation of pilus phase variation by an attenuation-like mechanism. *PLoS Pathog.* **10**: e1003860.
- D'Aoust, J.Y., Park, C.E., Szabo, R.A. & Todd, E.C.D. (1988) Thermal inactivation of *Campylobacter* species, *Yersinia enterocolitica*, and hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in fluid milk. *J Dairy Sci.* **71**: 3226–3230.
- DeAngelis, M. & Gobetti, M. (2004) Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics.* **4**:106-122.
- de la Maza, L.M., Shigei, J.T., Peterson, E.M., Pezzlo, M.T., Tan, G.L. (2013) Color Atlas of Medical Bacteriology, 2nd edition. ASM Press, USA. pp. 11-23.
- DeVuyst, L. & Tsakalidou, E. (2008) *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. *J Dairy J.* **18**:476–485.
- Diard, M., Garcia, V., Maier, L., Remus-Emsermann, M.N., Regoes, R.R., Ackermann, M. & Hardt, W.D. (2013) Stabilization of cooperative virulence by the expression of an avirulent phenotype. *Nature.* **494**:353-356.
- Díaz-Ruiz, G., Guyot, J.P., Ruiz-Teran, F., Morlon-Guyot, J. & Wachter, C. (2003) Microbial and physiological characterization of weak amylolytic but fast growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in Pozol. *Appl Environ Microbol.* **69**:4367-4374.
- Domínguez-Ramírez, L.L. (2013) Efecto de tratamientos de presión hidrostática ultra alta sobre la microbiota de carne fresca. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México.
- Domínguez-Ramírez, L.L., Rodríguez-Sanoja, R., Tecante, A., García-Garibay, M., Sainz, T. & Wachter, C. (2020) Tolerance to acid and alkali by *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* strain 25124 isolated from fermented nixtamal dough: pozol. Studies in APT broth. *Food Microbiol.* **90**:103458
- Erbse, A., Mayer, M.P. & Bukau, B. (2004) Heat shock proteins and modulation of cellular function. *Biochem Soc Transact.* **32**:617-621.
- Escamilla-Hurtado, M.L. & Mozqueda-González, E. (1992) Fermentación láctica en pozol, una bebida mexicana de maíz. *Tecnología de los Alimentos (México).* **27**:37-41.
- Facklam, R. (2002) What happened to the Streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev.* **15**:613-630.
- Farrow, J.A.E., Kruze, J., Phillips, B.A., Bramley, A.J. & Collins, M.D. (1984) Taxonomic studies on *Streptococcus bovis* and *Streptococcus equines*: description of *Streptococcus alactolyticus* sp. nov. and *Streptococcus saccharolyticus* sp. nov. *Syst Appl Microbiol.* **5**:467-482.
- Fernández-Ruiz, M., Villar-Silva, J., Llenas-García, J., Caurel-Díaz, L., Vila-Santos, J., Sanz-Sanz, F., et al. (2010) *Streptococcus bovis* bacteremia revisited: clinical and microbiological correlates in a contemporary series of 59 patients. *J Infect.* **61**:307-13
- Flahaut, S., Hartke, A., Giard, J.C. & Auffray, Y. (1997) Alkaline stress response in *Enterococcus faecalis*: adaptation, cross-protection, and changes in protein synthesis. *Appl Environ Microbiol.* **63**:812-814.

Flint, S., Brooks, J., Bremer, P., Walker, K. & Hausman, E. (2002) The resistance to heat of thermo-resistant streptococci attached to stainless steel in the presence of milk. *J Ind Microbiol Biotech.* **28**:134-136.

Food and Drug Administration (2002) GRAS Noticed Inventory: GRN 000049, *S. thermophilus* Th4. 28/03/2017, de Food and Drug Administration Sitio web: <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm153759.htm>

Fozo, E.M. & Quivey, R.G., Jr. (2004) The fabM gene product of *Streptococcus mutans* is responsible for the synthesis of monounsaturated fatty acids and is necessary for survival at low pH. *J Bacteriol.* **186**:4152–4158.

Franz, C.M. & von Holy, A. (1996) Thermotolerance of meat spoilage lactic acid bacteria and their inactivation in vacuum-packaged vienna sausages. *I J Food Microbiol.* **29**:59-73.

Freney, J., Bland, S., Etienne, J., Desmonceaux, M. & Boeufgras, J.M. (1992) Description and evaluation of the semiautomated 4-hour rapid ID 32 strep method for identification of streptococci and members of related genera. *J Clin Microbiol.* **30**:2657-2661.

Gahan, C.G., O' Driscoll, B. & Hill, C. (1996) Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Appl Environ Microbiol.* **62**:3128-3132.

Gänzle, M.G., Vermeulen, N. & Vogel, R.F. (2007) Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiol.* **24**:128–138.

Giles, M. (2012) Estudio de la sobrevivencia de enterobacterias aisladas del pozol durante la fermentación láctica de masas y suspensiones de harina de maíz nixtamalizado. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México.

Giotis, E.S., Muthaiyan, A., Blair, I.S., Wilkinson, B.J. & McDowell, D.A. (2008) Genomic and proteomic analysis of the Alkali-Tolerance Response (AITR) in *Listeria monocytogenes* 10403S. *BMC Microbiol.* **8**:102-113.

Giotis, E.S., Muthaiyan, A., Natesan, S., Wilkinson, B.J., Blair, I.S. & McDowell, D.A. (2010) Transcriptional analysis of alkali shock and alkali adaptation in *Listeria monocytogenes* 10403S. *Foodborne Pathogen Dis.* **7**:1147-1157.

Giraffa, G., Paris, A., Valcavi, L., Gatti, M. & Neviani, E. (2001) Genotypic and phenotypic heterogeneity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *J Appl Microbiol.* **91**:937-943.

Giraffa, G. (2003) Functionality of enterococci in dairy products. *I J Food Microbiol.* **88**:215-222.

Giraud, E., Brauman, A., Keleke, S., Lelong, B. & Raimbault, M. (1991) Isolation and physiological study of an amyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **36**:379–383.

Goodson, M. & Rowbury, R.J. (1990) Habituation to alkali and increased UV-resistance in DNA repair-proficient and –deficient strains of *Escherichia coli* grown at pH 9.0. *Lett Appl Microbiol.* **11**:123-125.

Görke B. & Stülke, J. (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol.* **6**:613-624.

- Gotcheva, V., Pandiella, S.S., Angelov, A., Roshkova, Z.G. & Webb, C. (2000) Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage boza. *Process Biochem.* **36**:127-130.
- Griswold, A.R., Jameson-Lee, M. & Burne, R.A. (2006) Regulation and physiologic significance of the agmatine deiminase system of *Streptococcus mutans* UA159. *J Bacteriol.* **188**:834-841.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* **41**:95-98.
- Halm, M., Lillie, A., Sorensen, A.K. & Jakobsen, M. (1993) Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize dough for kenkey production in Ghana. *I J Food Microbiol.* **19**:135-143.
- Hamilton, I.R. & Buckley, N.D. (1991) Adaptation by *Streptococcus mutans* to acid tolerance. *Oral Microbiol Immunol.* **6**:65-71.
- Hamza, A.A., El Gaali, E.I. & Mahdi, A.A. (2009) Use of the RAPD-PCR fingerprinting and API system for clustering lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese sour milk (roab). *Afr J Biotechnol.* **8**:3399–3404.
- Hartke, A., Bouché, S., Giard, J.-C., Benachour, A., Boutibonnes, P. & Auffray, Y. (1996) The lactic acid stress of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr Microbiol.* **33**:194-199.
- Hayford, A.E., Petersen, A., Vogensen, F.K. & Jakobsen, M. (1999) Use of conserved randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fragments and RAPD pattern for characterization of *Lactobacillus fermentum* in Ghanaian fermented maize dough. *Appl Environ Microbiol.* **65**:3213-3221.
- Head, I.M. (2004) Recovery and analysis of ribosomal RNA sequences from the environment. *Ecology Manual*. 2^{ed}. Kluwer Academic Publisher, USA. Pp. 139-142.
- Hinse, D., Vollmer, T., Erhard, M., Welker, M., Moore, E.R.B., Kleesiek, K. & Dreier, J. (2011) Differentiation of species of the *Streptococcus bovis/equinus*-complex by MALDI-TOF Mass Spectrometry in comparison to *sodA* sequence analyses. *Syst Appl Microbiol.* **34**:52-57.
- Hoen, B. (2002) Special issues in the management of infective endocarditis caused by gram-positive cocci. *Infec Dis Clin North Am.* **16**:437-452.
- Hoen, B., Chirouze, C., Cabell, C. H., Selton-Suty, C., Duchene, F., Olaison, L., Miro, J. M., Habib, G., Abrutyn, E., Eyky, S., Bernard, Y., Marco, F., Corey, G. R. & International Collaboration on Endocarditis Study Group. (2005) Emergence of endocarditis due to group D streptococci findings derived from the merged database of the International Collaboration on Endocarditis. *Eur Clin Microbiol Infect Dis.* **24**:12-16.
- Hols, P., Hancy, F. & Fontaine, L. (2005) New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev.* **29**:435-463.
- Horcasitas, C.M., López, J.O. & Plaza, I.M. (1998) Xylanases from *Cellulomonas flavigena*: purification and characterization. *Biotechnol Techniques.* **12**:663-666.
- Hounhouigan, D.J., Nout, M.J.R., Nago, C.M., Houben, J.H. & Rombouts, F.M. (1993) Characterization and frequency distribution of species of lactic acid bacteria involved in the processing of mawè, a fermented maize dough from Benin. *I J Food Sci Technol.* **18**:279-287.

Humphrey, T.J., Richardson, N.O., Gawler, A.H.L. & Allen, M.J. (1991) Heat resistance of *Salmonella enteritidis* PT4: the influence of prior exposure to alkaline conditions. *Lett Appl Microbiol.* **12**:258-260.

Hutkins, R. (2000) *Streptococcus thermophilus*. In: *Enciclopedia of food microbiology*. Robinson, R. K., Batt. C. A., Pateo, P. D. (eds.) Academic Press, USA. Pp. 2127-2133.

Illesca, R. (1943) La teoría química de la formación del Nixtamal. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural.* **4**(3-4):129-136.

ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (1996) Microorganisms in foods 5: Characteristics of microbial pathogens. Blackie Academic & Professional, London; New York.

ICSB, International Committee on Systematic Bacteriology. (2000) Subcommittee on the taxonomy of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related organism. *I J Syst Evol Microbiol.* **50**:1391-1392.

Instituto Nacional de los Pueblos Indígenas de México (2020) Atlas de los Pueblos Indígenas de México. 24/10/2020, de INPI Sitio web http://atlas.inpi.gob.mx/?page_id=247

Jans, C., Bugnard, J., Njage, P.M.K., Lacroix, C. & Meile, L. (2012a) Lactic acid bacteria diversity of African raw and fermented camel milk products reveals a highly competitive, potentially health-threatening predominant microflora. *Food Sci Technol.* **47**:371-379.

Jans, C., Follador, R., Lacroix, C., Meile, L. & Stevens, M.J.A. (2012b) Complete genome sequence of the African dairy isolate *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* Strain CJ18. *J Bacteriol.* **194**:2105-2106.

Jans, C., Gerber, A., Bugnard, J., Njage, P.M.K., Lacroix, C. & Meile, L. (2012c) Novel *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* variants harboring lactose metabolism genes homologous to *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiol.* **31**:33-42.

Jans, C., Follador, R., Hochstrasser, M., Lacroix, C., Meile, L. & Stevens, M.J.A. (2013a) Comparative genome analysis of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* CJ18, an African fermented camel milk isolate with adaptations to dairy environment. *BMC Genomics.* **14**:200.

Jans, C., Kaindi, D.W.M., Böck, D., Njage, P.M.K., Kouamé-Sina, S.M., Bonfoh, B., Lacroix, C. & Meile, L. (2013b) Prevalence and comparison of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* and *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* in raw and fermented dairy products from East and West Africa. *I J Food Microbiol.* **167**:186-195.

Jans, C., Meile, L., Kaindi, D.W.M., Kogi-Makau, W., Lamuka, P., Renault, P., Kreikemeyer, B., Lacroix, C., Hattendorf, J., Zinsstag, J., Schelling, E., Fokou, G. & Bonfoh, B. (2017) African fermented dairy products – Overview of predominant technologically important microorganisms focusing on African *Streptococcus infantarius* variants and potential future applications for enhanced food safety and security. *I J Food Microbiol.* **250**:27-36.

Jayaraman, G.C., Penders, J.E. & Burne, R.A. (1997) Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans* *hrcA*, *grpE* and *dnaK* genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification. *Mol Microbiol.* **25**:329–341.

Jensen, P.R. & Mafnas, C. (2006) Biogeography of the marine actinomycete *Salinispora*. *Environ Microbiol.* **6**:1881-1888.

- Johansson, M.-L., Sanni, A., Lonner, C. & Molin, G. (1995) Phenotypically based taxonomy using API 50CH of lactobacilli from Nigerian ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. *Food Microbiol.* **25**:159-168.
- Jordan, K.N., Oxford, L. & O'Byrne, C.P. (1999) Survival of Low-pH stress by *Escherichia coli* O157:H7: correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. *Appl Environ Microbiol.* **65**:3048-3055.
- Kaindi, D.W.M., Kogi-Makau, W., Lule, G.N., Kreikemeyer, B., Renault, P., Bonfoh, B., Otaru, N., Schmid, T., Meile, L., Hattendorf, J. & Jans, C. (2018) Colorectal cancer-associated *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* differ from a major dairy lineage providing evidence for pathogenic, pathobiont and food-grade lineages. *Sci. Rep.* **8**:9181
- Kakinuma, Y. & Igarashi, K. (1989) Sodium-translocating adenosine triphosphatase in *Streptococcus faecalis*. *J Bionerg Biomembr.* **21**:679-692.
- Kakinuma, Y. & Igarashi, K. (1999) Isolation and properties of *Enterococcus hirae* mutants defectives in the potassium/proton antiporter system. *J Bacteriol.* **181**:4103-4105.
- Kerrigan, D. (2011) The Hsp90 Complex in Microbes and Man. *J Cancer Res.*
- Khatarpaul, N. & Chauhan, B.M., (1991) Sequential fermentation of pearl millet by yeasts and lactobacilli effect on the antinutrients and *in vitro* digestibility. *Plant Foods for Human Nutrition.* **41**:321-327.
- Kilpper-Bälz, R. & Schleifer, K. H. (1987) *Streptococcus suis* sp. nov. nom. rev. *J Syst Bacteriol.* **37**:160–162.
- Kinoshita, N., Unemoto, T. & Kobayashi, H. (1984) Sodium-stimulated ATPase in *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol.* **158**:844-848.
- Kint, C.I., Verstraeten, N., Fauvart, M. & Michiels, J. (2012) New-found fundamentals of bacterial persistence. *Trends Microbiol.* **20**:577-585.
- Kobayashi, H., Susuki, T. & Unemoto, T. (1986) Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase. *J Biol Chem.* **261**:627-630.
- Koolman, J. & Röhm, K.-H. (2004) Bioquímica. Texto y Atlas.3º ed. Editorial Médica Panamericana, España. Pp. 258, 262, 264.
- Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., Takami, H., Morita, H., Sharma, V.K., Srivastava, T.P., Taylor, T.D., Noguchi, H., Mori, H., Ogura, Y., Ehrlich, D.S., Itoh, K., Takagi, T., Sakaki, Y., Hayashi, T. & Hattori, M. (2007) Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.* **14**:169-181.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E. & Goodfellow, M.D. (eds.) Wiley, Chichester, England. Pp. 115-175.
- Lazarovitch, T., Shango, M., Levine, M., Brusivansky, R., Akins, R., Hayakawa, K., Lephart, P.R., Sobel, J.D., Kaye, K.S & Marchaim, D. (2013) The relationship between the new taxonomy of *Streptococcus bovis* and its clonality to colon cancer, endocarditis, and biliary disease. *Infection.* **41**:329-337.

- Le Blanc, J.G., Garro, M.S. & de Giori, G.S. (2004) Effect of pH on *Lactobacillus fermentum* growth, raffinose removal, α -galactosidase activity and fermentation products. *Appl Microbiol Biotechnol.* **65**:119-123.
- Lemos, J.A.C., Chen, Y.-Y.M. & Burne, A.R. (2001) Genetic and physiologic analysis of the *groE* operon and role of the HrcA repressor in stress gene regulation and acid tolerance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* **183**:6074-6084.
- Lemos, J.A., Luzardo, Y. & Burne, R.A. (2007) Physiologic effects of forced down-regulation of *dnaK* and *groEL* expression in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* **189**:1582-1588.
- Lemos, J.A. & Burne, R.A. (2008) A model of efficiency: Stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiol.* **154**:3247-2355.
- Len, A.C.L., Harty, D.W.S. & Jacques, N.A. (2004) Stress-response protein are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance. *Microbiology.* **150**:1339-1351.
- Lenz, C.A., Ferstl, C.M. & Vogel, R.F. (2010) Sub-lethal stress effect on virulence gene expression in *Enterococcus faecalis*. *Food Microbiol.* **27**:317-326.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$. *Methods.* **25**:402-408.
- López, G. (2006) Estudio de la variabilidad microbiológica del pozol mediante PCR-DGGE con el gen *rpoB*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México.
- Lore, A.T., Mbugua, K.S. & Wango H.J. (2005) Enumeration and identification of microflora in suusac, a Kenyan traditional fermented camel milk product. *LWT.* **38**:125-130.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. (2004) Brock. Biología de los Microorganismos. 10° ed. Editorial Prentice Hall. Madrid, España. Pp. 122, 352, 400-402.
- Manachini, P. L., Flint, S. H., Ward L. J. H., Kelly, W., Fortina, M. G., Parini, C. & Mora, D. (2002) Comparison between *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus waius* strains and reclassification of *Streptococcus waius* (Flint *et al.*, 1999) as *Streptococcus macedonicus* (Tsakalidou *et al.*, 1998). *I J Syst Evol Microbiol.* **52**:945-951.
- Martín-Galiano, A.J., Ferrandiz, M.J. & de la Campa, A.G. (2001) The promoter of the operon encoding the F₀F₁ ATPase of *Streptococcus pneumonia* is inducible by pH. *Mol Microbiol.* **41**:1327-1338.
- Marshal, V.M. (1987) Fermented milks and their future trends. I. Microbiological aspects. *J Dairy Res.* **54**:559-574.
- Masha, G.G.K., Ipsen, R., Petersen, M.A. & Jakobsen, M. (1998) Microbiological, rheological and aromatic characteristics of fermented *uji* (an East Africa sour porridge). *W J Microbiol Biotechnol.* **14**:451-456.
- McMillan, D.G.G., Keis, S., Dimroth, R. & Cook, G.M. (2007) A specific adaptation in the a subunit of thermoalkaliphilic F₁F₀-ATP synthase enables ATP synthesis at high pH but not at neutral pH values. *The J Biolog Chem.* **282**:17395-17404.

- Messens, W. & DeVuyst, L. (2002) Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs. *I J Food Microbiol.* **72**:31-43.
- Mishra, V. & Prasad, D.N. (2005) Application of *in vitro* methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potencial probiotics. *I J Food Microbiol.* **103**:109-115.
- Morales-Ferrero, E.de C. (2011) Estudio de la presencia y sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* en el pozol. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México.
- Morlon-Guyot, J., Guyot, J.P., Pot, B., Jacobe de Haut, I. & Raimbault, M. (1998) *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolysing lactic acid bacterium isolated during cassava sour starch fermentation. *I J System Bacteriol.* **48**:1101-1109.
- Morrison, D.A., Guedon, E. & Renault, P. (2013) Competence for natural genetic transformation in the *S. bovis* group streptococci, *S. infantarius* and *S. macedonicus*. *J Bacteriol.* **195**:2612-2620.
- Mugula, J.K., Nnko, S.A.M., Narvhus, J.A. & Sørhaug, T. (2003) Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. *I J Food Microbiol.* **80**:187-199.
- Mukisa, I.M., Porcellato, D., Byaruhanga, Y.B., Muyanja, C.M.B.K., Rudi, K., Langsrud, T. & Naryhus, J.A. (2012) The dominant microbial community associated with fermentation of Obushera (sorghum and millet beverages) determined by culture-dependent and culture-independent methods. *I J Food Microbiol.* **160**:1-10.
- Muller, S., Harms, H. & Bley, T. (2010) Origin and analysis of microbial population heterogeneity in bioprocesses. *Curr Opin Biotechnol.* **21**:100-113.
- Muyzer, G., De Wall, E.C. & Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling complex microbial populations by denaturing gradient electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microbiol.* **59**:695-700.
- Nascimento, M.M, Lemos, J.A.C., Abranches, J., Gonçalves, R.B. & Burne, R.A. (2004) Adaptative cid Tolerance Response of *Streptococcus sobrinus*. *J Bacteriol.* **186**:6383-6390.
- Nannen, N.L. & Hutkins, R.W. (1990) Proton-translocating adenosine triphosphatase activity in lactic acid bacteria. *J Dairy Sci.* **74**:747-751.
- Ngaba, P.R. & Lee, J.S. (1979) Fermentation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J Food Sci.* **44**:1570-1571.
- Nuraida, L. (1988) Studies on microorganisms isolated from pozol, a Mexican corn fermented maize dough. MSc Thesis, Faculty of Agriculture and Food, Department of Food Science and Technology. University of Reading, UK.
- Nuraida, L., Wachter, C. & Owens, J.D. (1995) Microbiology of pozol, a mexican fermented maize dough. *W J Microbiol Biotechnol.* **11**:567-571.
- Nwankwo, D., Anadu, E. & Usoro, R. (1989) Cassava-fermenting organisms. *MIRCEN J.* **5**:169-179.
- Oguntoyinbo, F.A., Toulomousis, P., Gasson, M.J. & Narbad, A. (2011) Analysis of bacterial communities of traditional fermented West African cereal foods using culture independent methods. *I J Food Microbiol.* **145**:205-210.

Olasupo, N.A., Olukoya, D.K. & Odufa, S.A. (1996) Studies on local strains of amylolytic *Lactobacillus* from Nigerian fermented food. *Nahrung*. **40**:44-46.

Olympia, M., Fukuda, H., Ono, H., Kaneko, Y. & Takan, M. (1995) Characterization of starch-hydrolyzing lactic acid bacteria from a fermented fish and rice food, 'burong isda', and its amylolytic enzyme. *J Ferment Bioeng*. **80**:124-130.

Omemu, A.M., Oyewole, O.B. & Bankole, M.O. (2007) Significance of yeasts in the fermentation of maize for *ogi* production. *Food Microbiol*. **24**:571-576.

Osawa, R., Fujisawa, T. & Sly, L. I. (1995) *Streptococcus gallolyticus* sp. nov.; gallate degrading organisms formerly assigned to *Streptococcus bovis*. *Syst App Microbiol*. **18**:74-78.

Pacini, F., Cariolato, D., Andrighetto, C. & Lombardi, A. (2006) Occurrence of *Streptococcus macedonicus* in Italian cheeses. *FEMS Microbiol Lett*. **261**:69-73.

Padan, E., Bibi, E., Ito, M. & Krulwich, T.A. (2005) Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *Biochem Biophys Acta* **1717**:67-88.

Papadimitriou, K., Pratsinis, H., Nebe-von-Caron, G., Kletsas, D. & Tsakalidou, E. (2007) Acid tolerance of *Streptococcus macedonicus* as assessed by flow cytometry and single-cell sorting. *Appl Environ Microbiol*. **73**:465-476.

Papadimitriou, K., Alegría, A., Bron, P.A., de Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J.A., Linares, D.M., Ross, P., Stanton, C., Turrone, F., van Sinderen, D., Varmanen, P., N₁Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E. & Kok, J. (2016) Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. **30**:837-890.

Pérez-Avalos, O., Ponce-Noyola, T., Magaña-Plaza, I. & de la Torre, M. (1996) Induction of xylanase and β -xylosidase in *Cellulomonas flavigena* growing on different carbon sources. *Appl Microbiol Biotechnol*. **46**:405-409.

Petrova, P., Emanuilova, M. & Petrov, K. (2010) Amylolytic *Lactobacillus* strains from Bulgarian fermented beverage boza. *Z Naturforsch C J Biosci*. **65**:218-224.

Pieterse, R., Todorov, S.D. & Dicks, L.M. (2008) Bacteriocin ST91KM, produced by *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* ST91KM, is a narrow-spectrum peptide active against bacteria associated with mastitis in dairy cattle. *Canadian J Microbiol*. **54**:525-531.

Poyart, C., Berche, P. & Trieu-Cuot, P. (1995) Characterization of superoxide dismutase genes from gram-positive bacteria by polymerase chain reaction using degenerate primers. *FEMS Microbiol Lett*. **15**:41-45.

Poyart, C., Quesne, G., Coulon, S., Berche, P. & Trieu-Cuot, P. (1998) Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J Clin Microbiol*. **36**:41-47.

Poyart, C., Quesnes, G. & Trieu-Cuot, P. (2000) Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *J Clin Microbiol*. **38**:415-418.

Poyart, C., Quesne, G. & Trieu-Cuot, P. (2002) Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences:

reclassification of '*Streptococcus infantairus* subsp. *coli*' as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and *Streptococcus bovis* biotype II.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp.nov. *J System Evol Microbiol.* **52**:1247-1255.

Puerto Alonso, J.L., Asencio Méndez, C. and Gómez Rodríguez, F. (2007) *Streptococcus bovis*: un patógeno emergente. *Med Clin (Barc).* **129**:349-351.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., *et al.* (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* **464**:59-65.

Quivey, R.G. Jr., Faustoferri, R., Monahan, K. & Marquis, R. (2000) Shifts in membrane fatty acid profiles associated with acid adaptation of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett.* **189**:89–92.

Ramírez-Chavarin, N.L., Salazar-Jiménez, P., Flores-Campusano, L., Wachter-Rodarte, C., Díaz-Ruiz, G., Hernández-Chiñas, U., Xicohtencatl-Cortes, J. & Eslava-Campos, C.A. (2014) Adherence capability to different cultured cell lines of *Streptococcus* sp. strains isolated from pozol a prehispanic mexican fermented beverage. *J Prob Health.* **3**:124.

Rangel-Meza, E., Muñoz-Orozco, A., Vázquez-Carrillo, G., Cuevas-Sánchez, J., Merino-Castillo, J. & Miranda-Coli, S. (2004) Nixtamalización, elaboración y calidad de tortilla de maíz de Ecatlán, Puebla, México. *Agrociencia.* **38**:53-61.

Rashid, M.H., Togo, K., Ueda, M. & Miyamoto, T. (2007) Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented milk 'Dahi' in Bangladesh. *W J Microbiol Biotechnol.* **23**:125-133.

Rashid, M.H.U., Togo, K., Ueda, M. & Miyamoto, T. (2009) Characterization of bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* J2 40-2 isolated from traditional fermented milk "Dahi". *Anim Sci J.* **80**:70-78.

Rault, A., Bouix, M. & Béal, C. (2009) Fermentation pH influences the physiological –stated dynamics of *Lactobacillus bulgaricus* CFL1 during pH-controlled culture. *Appl Environ Microbiol.* **75**:4374-4381.

Ray, B. & Bhunia, A.L. (2014) *Fundamental Food Microbiology.* 5^{ed}. CRR Press. Taylor & Francis Group. Florifa, USA. Pp. 99-112, 193, 194, 449, 475-482.

Remolina, T., Rubinstein, B. & Suárez, I. (2015) Hanincol, la comida ceremonial. In: *Leyendas de todo México.* Ed. Selector. México. Pp. 24-26.

Renye, J.A. Jr., Somkuti, G.A., Van Hekken, D.L. & Guerrero-Prieto, V.M. (2011) Short communication: characterization of microflora in Mexican Chihuahua cheese. *J Dairy Sci.* **94**:3311-3315.

Ricciardi, A., Parente, E., Guidone, A., Ianniello, R.G., Zotta, T., Abu Sayem, S.M. & Varcamonti, M. (2012) Genotypic diversity of stress response in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* and *Lactobacillus pentosus*. *J Food Microbiol.* **157**:278-285.

Robinson, I. M., Stromley, J. M., Varel, V. H. & Cato, E. P. (1988) *Streptococcus intestinalis*, a new species from the colons and feces of pigs. *J Syst Bacteriol.* **38**:245-248.

Rodríguez-Navarro, A. & Villalva-Fuentes, B. (2010) Estudio del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México.

- Rowbury, R.J., & Hussain, N.H. (1996) Exposure of *Escherichia coli* to acid habituation conditions sensitize it to alkaline stress. *Lett Appl Microbiol.* **22**:57-61.
- Saibil, H. (2013) Chaperone machines for protein, unfolding and disaggregation. *Nature Rev Mol Cell Biol.* **14**:630-642.
- Sainz, T. (1998) Estudio de la presencia y sobrevivencia de enterobacterias patógenas en el pozol. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México.
- Sainz, T., Wachter, C., Espinoza, J., Centurión, D., Navarro, A., Molina, A., Inzunza, A., Cravioto, A. & Eslava, C. (2001) Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food. *I J Food Microbiol.* **71**:169-176.
- Saito, H. & Kobayashi, H. (2003) Bacterial response to alkaline stress. *Sci Progress.* **86**:271-282.
- Sánchez-Tovar, S. (2007) Variación de las propiedades físicoquímicas de polímeros naturales extruidos en condiciones alcalinas. Tesis Doctoral, Facultad de Química, UNAM, México.
- Sanders, J.W., Venema, G. & Kok, J. (1999) Environmental stress response in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Rev.* **23**:483-501.
- Sanni, A.I., Morlon-Guyot, J. & Guyot, J.P. (2002) New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *I J Food Microbiol.* **72**:53-62.
- Sawatari, Y. & Yokota, A. (2007) Diversity and mechanism of alkali tolerance in Lactobacilli. *Appl Environ Microbiol.* **73**:3909-3915.
- Scheyhing, C.H., Hörmann, S., Ehrmann M.A. & Vogel, R.F. (2004) Barotolerance is inducible by preincubation under hydrostatic pressure, cold-, osmotic- and acid-stress conditions in *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451^T. *Lett Appl Microbiol.* **39**:284-289.
- Schlegel, L., Grimont, F., Collins, M.D., Régnault, B., Grimont, P.A.D. & Bouvet, A. (2000) *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. *I J System Evol Microbiol.* **50**:1425-1434.
- Schlegel, L., Grimont, F., Ageron, E., Grimont, P.A.D. & Bouvet, A. (2003) Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. *I J System Evol Microbiol.* **53**:631-645.
- Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M.D. & Fischer, W. (1985) Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst Appl Microbiol.* **6**:183-195.
- Schleifer, K.H. & Kilpper-Bälz, R. (1987) Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst Appl Microbiol.* **10**:1-19.
- Sheng, J. & Marquis, R.E. (2006) Enhanced acid resistance of oral streptococci at lethal pH values associated with acid-tolerance catabolism and with ATP synthase activity. *FEMS Microbiol Lett.* **262**:93-98.

- Skandamis, P.N., Yoon, Y., Stopforth, J.D., Kendall, P.A. & Sofos, J.N. (2008) Heat acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiol.* **25**:294-303.
- Stach, J.E.M., Maldonado, L.A., Ward, A.C., Goodfellow, M. & Bull, A.T. (2003) New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environ Microbiol.* **5**:828-841.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B.M. (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in Bacteriology. *J Syst Bacteriol.* **44**:846-849.
- Stearns, J.C., Lynch, M.D.J., Senadheera, D.B., Tenenbaum, H.C., Goldberg, M.B., Cvitkivitch, D.G., Croitoru, K., Moreno-Hagelsieb, G. & Neufeld, J.D. (2011) Bacterial biogeography of the human digestive tract. *Sci Rep.* **1**:170
- Steinkraus, K.H. (1983) Lactic acid fermentation in the production of food from vegetables, cereals and legumes. *Antonie van Leeuwenhoek.* **49**:337-348.
- Steinkraus, K.H., Ayres, R., Olek, A. & Farr, D. (1993) Biochemistry of *Saccharomyces*. In: K.H. Steinkraus (ed.), Handbook of indigenous fermented foods. Marcel Dekker, New York, pp. 517-519.
- Taglicht, D., Padan, E., Oppenheim, A.B. & Schuldiner, S. (1987) An alkaline shift induce the heat shock response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **169**:885-887.
- Tong, Z., Tao, R., Jiang, W., Li, J., Zhou, L., Tian, Y. & Ni, L. (2011) *In vitro* study of the properties of *Streptococcus mutans* in starvation conditions. *Arch Oral Biol.* **56**:1306-1311.
- Tsakalidou, E., Zoidou, E., Pot, B., Wassill, L., Ludwig, W., Devriese, L.A., Kalantzopoulos, G., Schleifer, K.H. & Kersters, K. (1998) Identification of streptococci from Greek Kasserli cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov. *J Syst Bacteriol.* **48**:519-527.
- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M. L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A. C., Knight, R. & Gordon, J.I. (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* **457**:480–484.
- Ulloa, M, Herrera, T. & Taboada, J. (1983) Mexican pozol. In: Handbook of indigenous fermented foods. Steinkraus (ed.). Marcel Dekker, USA. Pp. 226-233.
- Ulloa, M., Herrera, T. & Lappe, P. (1987) Pozol. In: Fermentaciones tradicionales indígenas de México. Instituto Nacional Indigenista. **16**:13-20.
- Vadeboncoeur, C., Thibault, L., Neron, S., Halvorson, H. & Hamilton, I.R. (1987) Effect of growth conditions on levels of components of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* grown in continuous culture. *J Bacteriol.* **169**:5686–5691.
- Valderrama, A. (2012) Diversidad de Bacterias Lácticas del Atole Agrio de Villahermosa Tabasco. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México.
- Vandamme, P., Devriese, L. A., Haesebrouck, F. & Kersters, K. (1999) *Streptococcus intestinalis* Robinson *et al.* 1988 and *Streptococcus alactolyticus* Farrow *et al.*, 1984 are phenotypically indistinguishable. *J Syst Bacteriol.* **49**:737-741.

- van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D. & Maguin, E. (2002) Stress response in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. **82**:187-216.
- Vasan, A., Leong, W.M., Ingham, S.C. & Ingham, B.H. (2013) Thermal tolerance characteristics of non-O157 Shiga toxinogenic strains of *Escherichia coli* (STEC) in a beef broth model system are similar to those O157:H7 STEC. *J Food Prot*. **76**:1120-1128.
- Wacher, C., Cañas, A., Cook, E., Barzana, E. & Owen, J. (1993) Sources of microorganisms in pozol a traditional Mexican fermented maize dough. *World J Microbiol Biotechnol*. **9**:269-274.
- Wacher, C. (1995) Estudios sobre la microbiota del pozol. Tesis Doctoral, Facultad de Química, UNAM, México.
- Wacher, C., Cañas, A., Barzana, E., Lappe, P., Ulloa, M. & Owens, J.D. (2000) Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiol*. **17**:251-256.
- Welin-Neilands, J. & Svensäter, G. (2007) Acid Tolerance of Biofilm Cells of *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol*. **73**:5633-5638.
- Winn Jr., W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. & Woods, G. (2008) Koneman, Diagnóstico microbiológico. 6° ed. Editorial Médica Panamericana. Argentina. P. 642.
- Wood, B.J.B. & Holzappel, W.H. (1995) Phylogenetic relationship of lactic acid bacteria. In: The genera of Lactic Acid Bacteria. 1er ed. Blackie Academic & Professional. Pp. 7-18.
- Wullschleger, S., Lacroix, C., Bonfoh, B., Sissoko-Thiam, A., Hugenschmidt, S., Romanensm, E., Baumgartner, S., Traoré, I., Yaffee, M., Jansm, C. & Meile, L. (2013). Analysis of lactic acid bacteria communities and their sensorial variations in a spontaneously fermented dairy product (Malian fènè) by applying a cultivation/ genotype-based binary model. *Int Dairy J*. **29**: 28–35.
- Yatsunenko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., Heath, A.C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J.G., Lozupone, C.A., Lauber, C., Knight, J.C.R. & Gordon, J.I. (2012) Human gut microbiome viewed across age and geography, *Nature*. **486**:222-228.
- Yañez, Y. (2005) Nixtamalización por extrusión de las fracciones del grano de maíz para la obtención de harinas instantáneas. Tesis de Maestría, IPN, México.
- Zilberstein, D., Agmon, V., Schuldiner, S. & Padan, E. (1984) *Escherichia coli* intracellular pH, membrane potential, and cell growth. *J Bacteriol*. **158**:246-252.

ANEXO A

PREPARACIÓN DE MEDIO MRS ALMIDÓN (MRSA)

El medio MRS (Man, Rogose y Sharpe) es un medio muy adecuado para el cultivo de bacterias ácido lácticas y es ampliamente utilizado para el estudio de las mismas. Muchas de las cepas aisladas por Becerril-Sánchez (2012) fueron obtenidas por aislamiento en este medio utilizando almidón como carbohidrato fermentable. Por ello, en etapas iniciales del trabajo se utilizó éste, preparado por componentes con las proporciones indicadas en la Tabla A.1. En este medio de cultivo el citrato diamoniaco inhibe el crecimiento de bacterias Gram-negativas y el acetato de sodio, el magnesio (Mg^{2+}) y el manganeso (Mn^{2+}) aportan cofactores y pueden inhibir también el desarrollo de otros microorganismos, es por ello que se considera medio semiselectivo.

Tabla A.1. Composición del medio MRSA

Componente	g/L
Peptona pancreática de caseína	10.00
Extracto de carne	10.00
Extracto de levadura	5.00
Almidón	20.00
Citrato diamoniaco	2.17
Acetato de sodio	5.00
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.21
Sulfato de manganeso	0.06
Fosfato dipotásico	2.62
Agar	15.00
pH 6.4 ± 0.4	

ANEXO B

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA

B.1 Influencia de la adaptación en medio ácido o alcalino en la supervivencia de Sii-25124 a pH 3.6.

Tabla B.1.1. Análisis de varianza para identificar diferencia significativa en el porcentaje de supervivencia de Sii-25124 adaptada a diferentes valores de pH y expuestas a pH 3.6 considerando las variables: pH (de adaptación: 4.0, 6.6, 10.0, 11.0) y tiempo (exposición a pH 3.6: 5, 15, 30 y 60 minutos)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F calculada	F tablas		Interpretación
					0.05	0.01	
pH	107.856	3	35.952	3062.665	2.608	3.788	**
Tiempo	230.501	3	76.834	6545.245	2.608	3.788	**
pH*Tiempos	188.026	9	20.892	1779.717	1.885	2.417	**
Error	0.376	32	0.012				
Total	647.252	48					

** Diferencia altamente significativa ($P < 0.01$)

Como resultado del análisis de varianza efectuado, la evidencia sugiere que hay diferencia altamente significativa respecto al efecto de la variable pH y la variable tiempo en el porcentaje de supervivencia de Sii-25124, así mismo, hay interacción entre ambos factores (pH*Tiempo). Se efectuaron las pruebas de rango múltiple (prueba de Duncan y prueba Student-Newman-Keuls) para determinar bajo qué condiciones de pH de adaptación la cepa Sii-25124 toleró mejor la exposición a pH 3.6, así como el tiempo de exposición con menor efecto letal. Ambas pruebas proporcionaron los mismos resultados, indicados en la tabla B.1.2.

Tabla B.1.2. Resultado de las pruebas de rango múltiple para la cepa *Sii-25124* en caldo APT ajustado a diferentes valores de pH y el tiempo de exposición a pH 3.6 tras la adaptación, para la comparación del efecto cruzado de las variables

Clasificación con el paquete SPSS						Interpretación
pH*Tiempo ¹	Grupo					
	1	2	3	4	5	
pH 6.6, 60 min	0.0000837					0.0000837 ± 0.0000030 ^a
pH 6.6, 30 min	0.0011554					0.0011554 ± 0.0001705 ^a
pH 6.6, 15 min	0.0032555					0.0032555 ± 0.0003862 ^a
pH 10, 30 min	0.0046261					0.0046261 ± 0.0005431 ^a
pH 11, 60 min	0.0288598					0.0288598 ± 0.0061574 ^a
pH 4, 60 min	0.0293117					0.0293117 ± 0.0031599 ^a
pH 10, 60 min	0.0405027					0.0405027 ± 0.0421905 ^a
pH 11, 30 min	0.0536640					0.0536640 ± 0.0076958 ^a
pH 6.6, 5 min	0.0945038					0.0945038 ± 0.0150540 ^a
pH 10, 15 min	0.1019439					0.1019439 ± 0.0044720 ^a
pH 4, 30 min	0.1775685					0.1775685 ± 0.0221485 ^a
pH 11, 15 min		0.6591854				0.6591854 ± 0.0488635 ^b
pH 11, 5 min			2.7599295			2.7599295 ± 0.1169863 ^c
pH 4, 15 min			2.9375036			2.9375036 ± 0.1434383 ^c
pH 10, 5 min				5.4515899		5.4515899 ± 0.2548870 ^d
pH 4, 5 min					13.0064521	13.0064521 ± 0.2891041 ^e

¹pH*Tiempo, pH de adaptación interacción con tiempo de exposición a pH 3.6
± DS resultado de tres réplicas independientes

Se obtuvieron 5 grupos, asignándole una letra diferente a cada uno. Para identificar el pH de adaptación que resultó en un mayor porcentaje de supervivencia al ser expuesto a pH letal y el tiempo de menor letalidad bajo estas condiciones, se consideró el pH*Tiempo donde termina el último grupo, que corresponde a la letra e. De esta manera, se concluye que el menor efecto letal en la supervivencia de la cepa *Sii-25124* fue la exposición a caldo APT ajustado a pH letal de 3.6 durante 5 minutos, previa adaptación en caldo APT ajustado a pH 4.0. Cabe destacar que los valores que quedan dentro de un mismo grupo no muestran diferencia significativa entre ellos ($P > 0.05$). Así que también se puede apreciar que la adaptación en caldo APT ajustado a pH 10.0 y a pH 11.0 igualmente genera cierta tolerancia al pH letal (grupos b, c y e) comparados con el pH 6.6, sin adaptación ya que es el pH normal del caldo APT (queda en el grupo a). Incluso, la respuesta registrada para la exposición de 15 minutos a pH letal tras la adaptación a pH 4.0 es similar a la registrada tras la exposición de 5 minutos a pH letal previa adaptación a pH 11.0, ambos datos quedan en el mismo grupo, designado por la letra b.

Esto brinda evidencia sobre el potencial que tiene la cepa *Sii-25124* para montar una ATR al adaptar las células en pH ácido 4.0 y en pH alcalino de 10.0 y 11.0, comparando con células sin adaptación. Esta respuesta es significativamente diferente al porcentaje de supervivencia registrado para las células sin adaptación al menos durante los primeros 15 minutos de exposición a pH letal. Posteriormente, tanto para las células adaptadas en pH ácido y en pH alcalino, 30 y 60 minutos, no hay diferencia significativa respecto a la supervivencia de las células no adaptadas expuestas a pH

letal durante 5, 15, 30 o 60 minutos. Por lo que puede considerarse que esta ATR permite hacer frente al estrés en pH 3.6 al menos durante 15 minutos.

B.2 Influencia de choque térmico en la sensibilidad de Sii-25124 a pH 3.6 y pH 10.5 (inducción de protección cruzada)

En la B.2.1 se detallan los resultados del análisis de varianza que por medio de diseño factorial permitió detectar la interacción de las 3 variables: temperatura (con o sin choque térmico), pH (ácido o alcalino), tiempo (de exposición a pH subletal). Para apreciar bajo qué condiciones se obtiene una mejor supervivencia y si acaso el choque térmico generó protección cruzada para tolerar el estrés por pH.

El análisis de varianza mostró que hay interacción entre las tres variables, para detectar el impacto de esto se realizaron las pruebas de rango múltiple detectando la formación de 5 grupos por medio de la prueba de Duncan (Tabla B.2.2). A cada grupo le fue asignada una letra para identificar aquel grupo con el mayor porcentaje de supervivencia, con diferencia significativa ($P < 0.05$), por efecto de las 3 variables y sus entrecruzamientos, siendo éste el que posee la letra e. Este representa las células sometidas a choque térmico y posteriormente fueron expuestas a pH 10.5 durante 5 minutos. Porcentajes dentro de un mismo grupo no muestran diferencia significativa ($P > 0.05$).

Tabla B.2.1. Análisis de varianza para identificar diferencia significativa en el porcentaje de supervivencia de Sii-25124 tras choque térmico y posteriormente expuesta a pH 3.6 y pH 10.5 considerando las variables: pH (3.6, 10.5), temperatura (62°C choque térmico, 30° C sin choque) y tiempo (exposición a pH modificado: 5, 15, 30 y 60 minutos)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F calculada	F tablas		Interpretación
					0.05	0.01	
pH	11395.880	1	11395.880	696.512	3.844	6.643	**
Temperatura	3628.145	1	3628.145	221.751	3.844	6.643	**
Tiempo	5759.422	3	1919.807	117.338	2.607	3.785	**
pH * Temperatura	3044.956	1	3044.956	186.107	3.844	6.643	**
pH * Tiempo	4626.831	3	1542.277	94.263	2.607	3.785	**
Temperatura * Tiempo	2082.048	3	694.016	42.418	2.607	3.785	**
pH * Temperatura * Tiempo	1608.705	3	536.235	32.775	2.607	3.785	**
Error	523.563	32	16.361				
Total	45650.577	48					

** Diferencia altamente significativa ($P < 0.01$)

La evidencia sugiere que el choque térmico generó protección cruzada para tolerar estrés por pH 10.5 siendo una diferencia significativa entre el porcentaje de supervivencia de las células expuestas durante 5 y 15 minutos a este valor alcalino ($P > 0.05$). Posteriormente, no se muestra diferencia respecto a las células sin choque térmico. En tanto si el choque térmico induce protección cruzada para tolerar la acidez, las células con y sin choque quedaron en el mismo grupo ab de modo que la evidencia muestra que esta inducción de ATR no existe en Sii-25124.

Tabla B.2.2. Resultado de las pruebas de rango múltiple para determinar la inducción de ATR (en pH 3.6) o AITR (en pH 10.5) por choque térmico, comparando con células sin choque térmico, por medio de la supervivencia de *Sii-25124* durante diferentes tiempos de exposición a las condiciones de pH modificado

Clasificación con el paquete SPSS						Interpretación
pH*Temperatura*tiempo ^a	Grupo					
	1	2	3	4	5	
pH 3,6, Temperatura 30, Tiempo 60 minutos	0.00333					0.00333 ± 0.002 ^a
pH 3,6, Temperatura 62, Tiempo 60 minutos	0.00600					0.00600 ± 0.001 ^a
pH 3,6, Temperatura 62, Tiempo 30 minutos	0.04400					0.04400 ± 0.046 ^a
pH 3,6, Temperatura 30, Tiempo 30 minutos	0.05333					0.05333 ± 0.026 ^a
pH 3,6, Temperatura 62, Tiempo 15 minutos	0.24100					0.24100 ± 0.203 ^a
pH 3,6, Temperatura 30, Tiempo 15 minutos	0.44200					0.44200 ± 0.121 ^a
pH 3,6, Temperatura 30, Tiempo 5 minutos	0.73100					0.73100 ± 0.126 ^a
pH 10.5, Temperatura 30, Tiempo 60 minutos	3.90367	3.90367				3.90367 ± 1.478 ^{ab}
pH 10.5, Temperatura 62, Tiempo 60 minutos	6.51833	6.51833				6.51833 ± 1.362 ^{ab}
pH 3,6, Temperatura 62, Tiempo 5 minutos	6.77333	6.77333				6.77333 ± 0.495 ^{ab}
pH 10.5, Temperatura 30, Tiempo 30 minutos		10.58767				10.58767 ± 2.742 ^b
pH 10.5, Temperatura 30, Tiempo 15 minutos			20.60800			20.60800 ± 5.461 ^c
pH 10.5, Temperatura 30, Tiempo 5 minutos			25.67867			25.67867 ± 5.293 ^c
pH 10.5, Temperatura 62, Tiempo 30 minutos			26.31433			26.31433 ± 9.902 ^c
pH 10.5, Temperatura 62, Tiempo 15 minutos				75.40567		75.40567 ± 9.503 ^d
pH 10.5, Temperatura 62, Tiempo 5 minutos					85.80967	85.80967 ± 1-931 ^e

^apH*Temperatura*tiempo. Efecto cruzado de las tres variables, pH de estrés, Temperatura de choque o sin choque térmico y tiempo de exposición a pH de estrés. ± DS resultado de tres réplicas independientes

ANEXO C

DISEÑO DE OLIGOS

C.1 Streptococcus infantarius subsp. *infantarius* 25124

Adicionalmente a la búsqueda predictiva realizada en el servidor RAST para detectar los genes *atpB*, *dnaK*, *groEL* y *ptsG* y sus contextos genómicos en el *draft* del genoma de *Sii-25124*, el corroborar su identidad por medio de su comparación a través de un blast contra la base de datos del NCBI (Blast Tool) y los alineamiento múltiples utilizando el software BioEdit, también se efectuó la construcción de dendrogramas comparando con secuencias homólogas para así dar mayor sustento a su identidad en aras de un diseño eficiente de oligos.

C.1.1 Contexto genómico asociado a los genes predichos en el draft del genoma de *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* 25124

El contexto genómico de *atpB* (Figura 23) fue utilizado en la sección “6.10.1 Búsqueda de genes relacionados con estrés en el genoma de *Sii-25124*” como ejemplo, en las figuras C.1.1.1, C.1.1.2, C.1.1.3 se representan los contextos genómicos de *dnaK*, *groEL* y *ptsG* respectivamente.

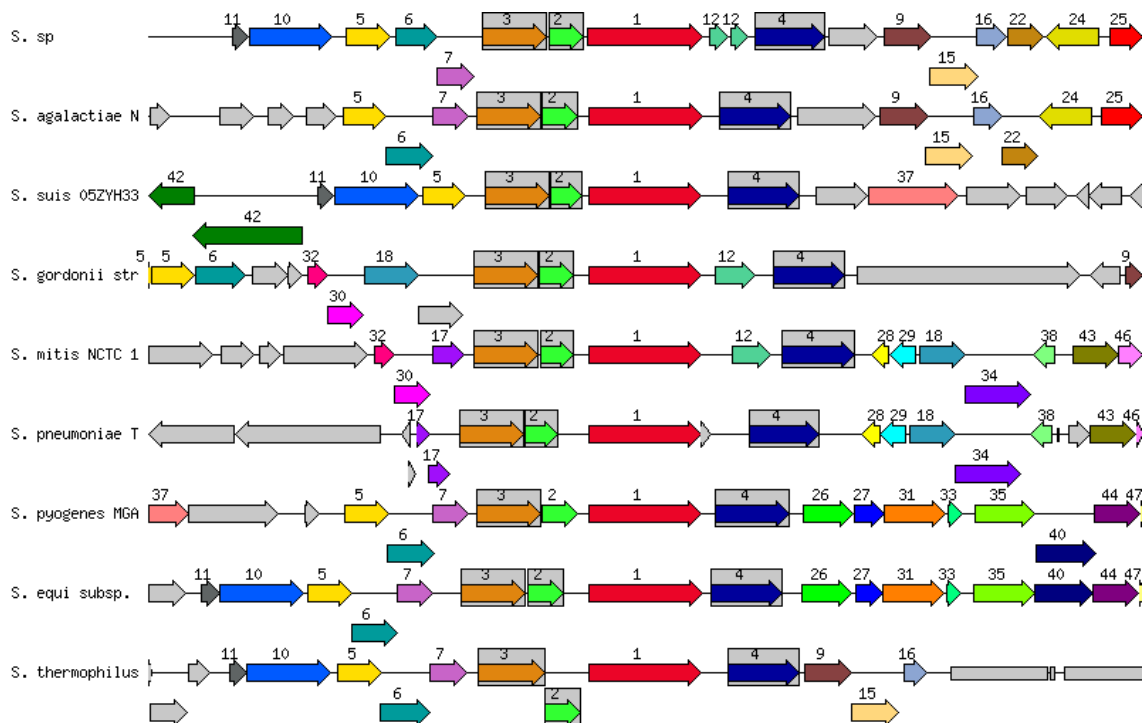


Figura C.1.1.1. Visualización del contexto genómico del gen *dnaK* obtenido por medio del servidor RAST. En la parte superior la representación del genoma de *Sii-25124* (identificado como *S. sp*), en rojo y con el número 1 *dnaK* precedido por *grpE* y *hrcA*, en verde brillante con el número 2 y naranja con el número 3, respectivamente. Con el número 12, *dnaJ*. Dirección 5'→3' indicado de izquierda a derecha.

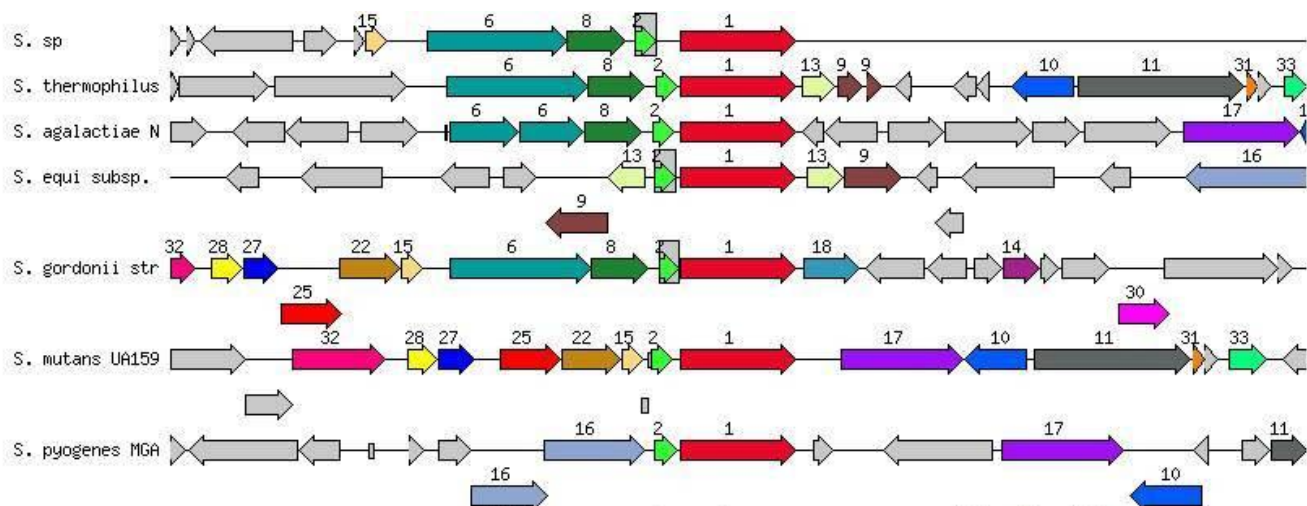


Figura C.1.1.2. Visualización del contexto genómico del gen *groEL* obtenido por medio del servidor RAST. En la parte superior la representación del genoma de *Sii-25124* (identificado como *S. sp*), en rojo y con el número 1 *groEL*, precedido por *groES* indicado con la flecha verde brillante con el número 2. Dirección 5'→3' indicado de izquierda a derecha.

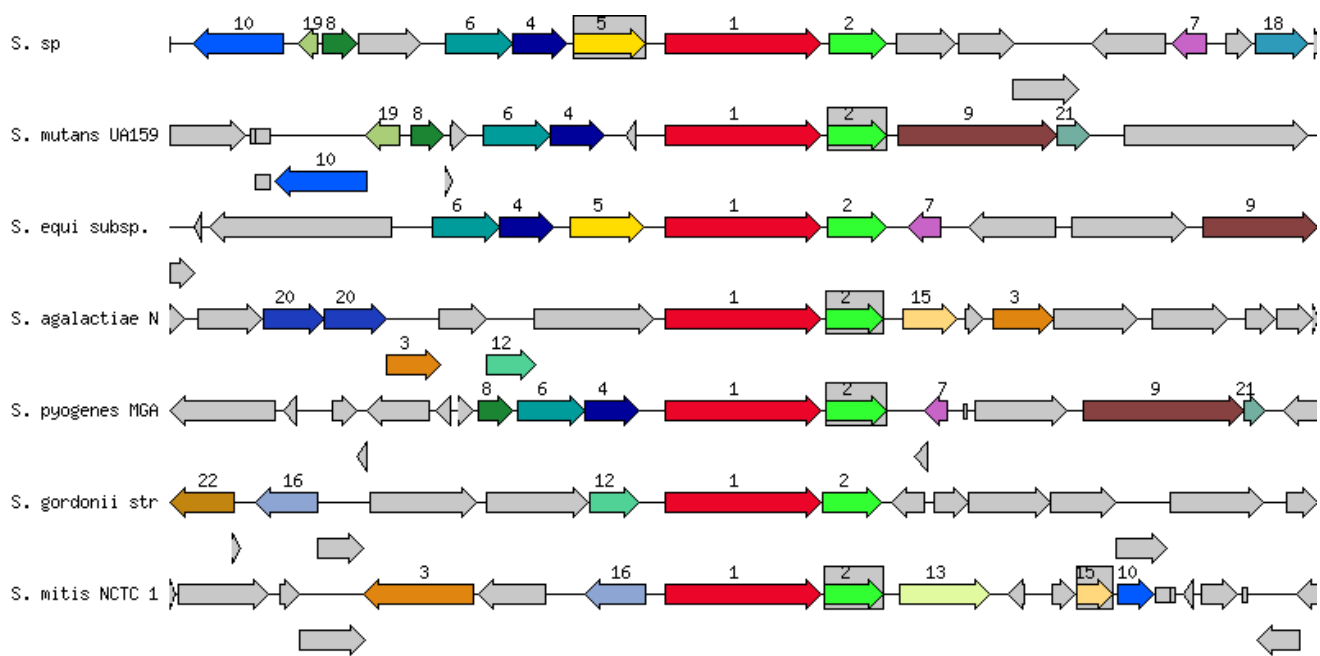
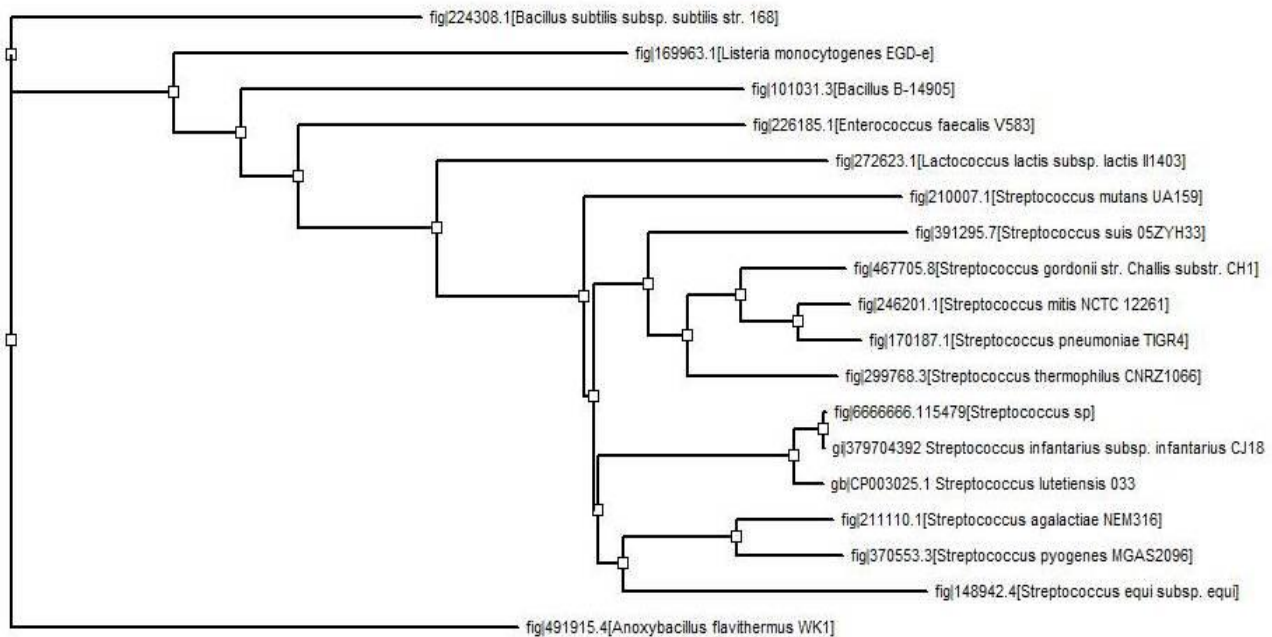


Figura C.1.1.3. Visualización del contexto genómico del gen *ptsG* obtenido por medio del servidor RAST. En la parte superior la representación del genoma de *Sii-25124* (*S. sp*), en rojo y con el número 1 *ptsG*. Dirección 5'→3' indicado de izquierda a derecha.

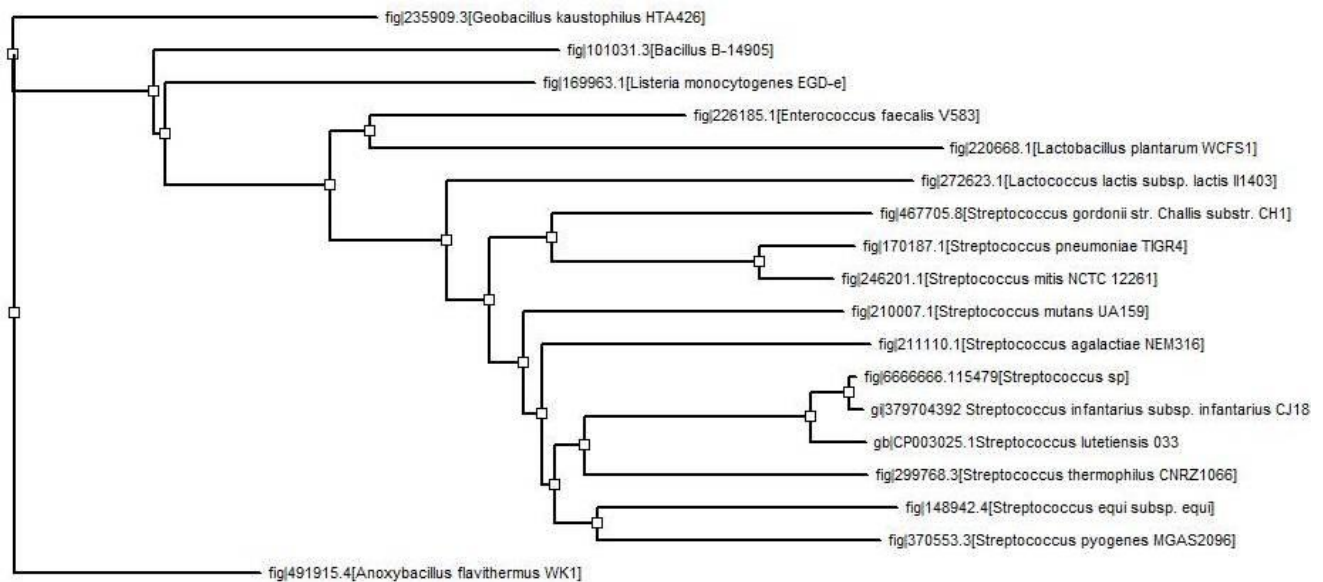
C.1.2 Predicción de dendrogramas

Con los alineamientos múltiples realizados con el software BioEdit se procedió a la construcción de los dendrogramas correspondientes para los genes predichos como *atpB*, *dnaK*, *groEL* y *ptsG* en el *draft* del genoma de *Sii-25124*. El correspondiente a *atpB* (Figura 25) fue utilizado como ejemplo en la sección “6.10.1 Búsqueda de genes relacionados con estrés en el genoma de *Sii-25124*” en Resultados y Discusión. Aquí se representan los correspondientes a *dnaK*, *groEL* y *ptsG* en las figuras C.1.2.1, C.1.2.2 y C.1.2.3, respectivamente. En conjunto, estos resultados corroboran tanto la identidad de los genes predichos, así como la relación filogenética que la cepa guarda respecto a *Sii-CJ18* y *S. lutetiensis* 033.



0.01

Figura C.1.2.1. Dendrograma generado por NJ basado en datos obtenidos del *draft* del genoma de *Sii-25124* (fig|666666.115479 [(identificado como *Streptococcus* sp)]) para el gen *dnaK*, secuencias proporcionadas por el servidor RAST y secuencias obtenidas del GenBank. Para calcular la matriz de distancias se usa un modelo que conjunta los de Jukes & Cantor [1969], Kimura [1980] y Felsenstein [1993]. *Anoxybacillus flavithermus* WK1 como grupo externo. La barra horizontal en la base del dendrograma indica las unidades del número de sustituciones por sitio entre pares de secuencias (distancia entre ellas). Bootstrap= 1000.



0.1

Figura C.1.2.2. Dendrograma generado por NJ basado en datos obtenidos del *draft* del genoma de *Sii-25124* (fig|666666.115479 [(identificado como *Streptococcus* sp)]) para el gen *groEL*, secuencias proporcionadas por el servidor RAST y secuencias obtenidas del GenBank. Para calcular la matriz de distancias se usa un modelo que conjunta los de Jukes & Cantor [1969], Kimura [1980] y Felsenstein [1993]. *Anoxybacillus flavithermus* WK1 como grupo externo. La barra horizontal en la base del dendrograma indica las unidades del número de sustituciones por sitio entre pares de secuencias (distancia entre ellas). Bootstrap= 1000.

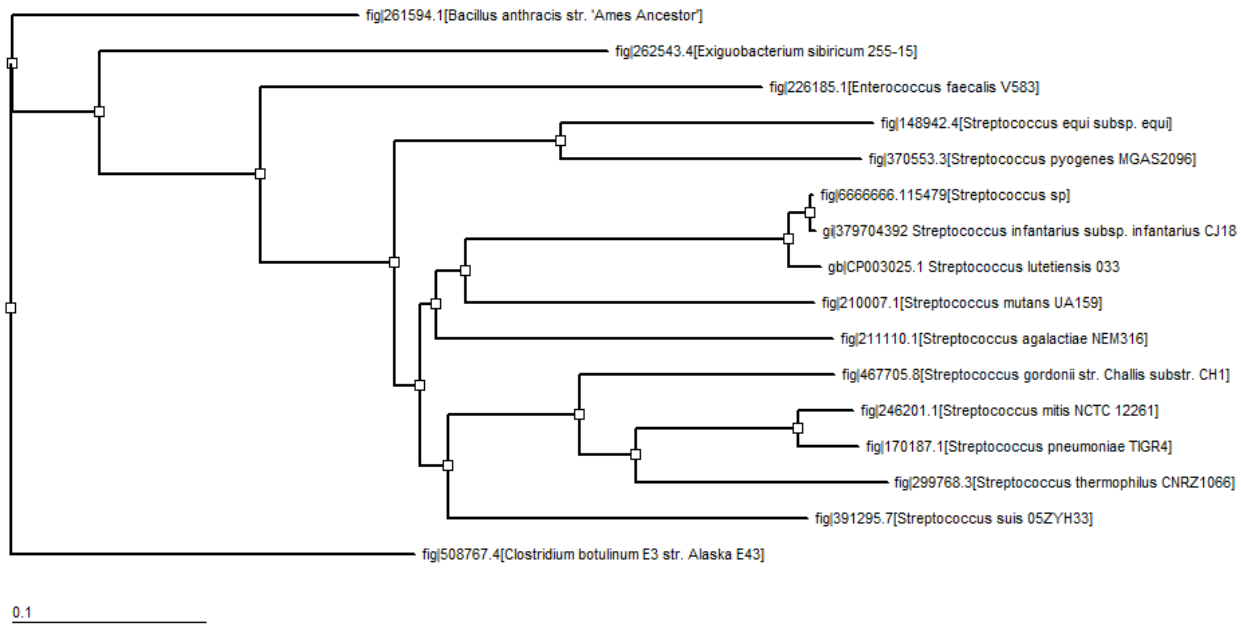


Figura C.1.2.3. Dendrograma generado por NJ basado en datos obtenidos del *draft* del genoma de *Sii-25124* (fig|6666666.115479 [(identificado como *Streptococcus* sp)]) para el gen *ptsG*, secuencias proporcionadas por el servidor RAST y secuencias obtenidas del GenBank. Para calcular la matriz de distancias se usa un modelo que conjunta los de Jukes & Cantor [1969], Kimura [1980] y Felsenstein [1993]. *Clostridium botulinum* E3 como grupo externo. La barra horizontal en la base del dendrograma indica las unidades del número de sustituciones por sitio entre pares de secuencias (distancia entre ellas). Bootstrap= 1000.

C.2 Diseño de oligos especie-específicos para qPCR

La información adicional de los oligos diseñados para *Sii-25124* se describe en la tabla C.2.

Table C.2. Información adicional sobre los oligos dirigidos a los genes *atpB*, *dnaK*, *groEL* y basados en el *draft* del genoma de *Sii-25124*









Gen	Oligo	Inicio*	Término*	%Qcov	Eval	%ID	Hairpins	Tm (°C)	Posición en <i>Sii-CJ18</i>
<i>atpB</i>	<i>atpB1</i>	526	546	100	0.19	100	2	27.7, 21.2	640714
	<i>atpB2</i>	601	621	100	0.19	100	2	15.5, 13.2	640808
<i>dnaK</i>	<i>dnaK1</i>	865	885	100	0.19	100	7	De -0.5 a -29.6	275676
	<i>dnaK2</i>	973	993	100	0.19	100	3	25.5, 17.3, 13.0	275803
<i>groEL</i>	<i>groEL1</i>	335	354	100	0.73	100	1	29	125952
	<i>groEL2</i>	420	439	100	0.74	100	1	39	126056
<i>ptsG</i>	<i>ptsG1</i>	1883	1903	100	0.19	100	1	29	161528
	<i>ptsG2</i>	1968	1988	100	0.19	100	2	38.0, 33.9	161632



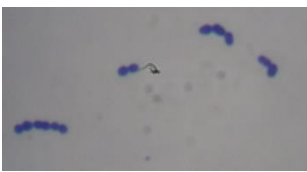







*Inicio y término de la secuencia del oligo en el *draft* del genoma de *Sii-25124*.


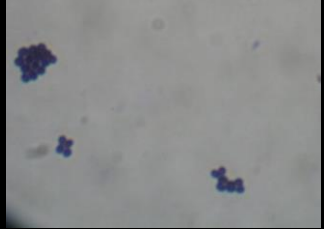
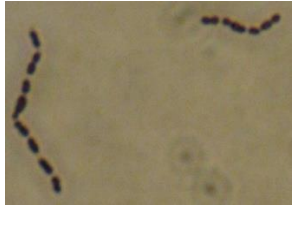





%Qcov. Query coverage resultante de la comparación por medio de blast directamente de la secuencia con el genoma completo de *Sii-CJ18*; Eval. E-value; %ID, porcentaje de identidad de la secuencia del oligo respecto a la secuencia de *Sii-CJ18*. Genoma completo de *Sii-CJ18* con número de acceso: CP003295.1.

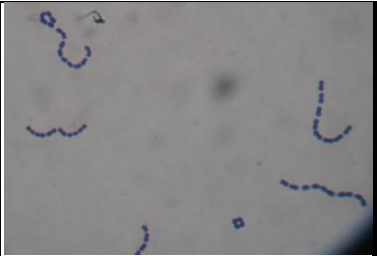
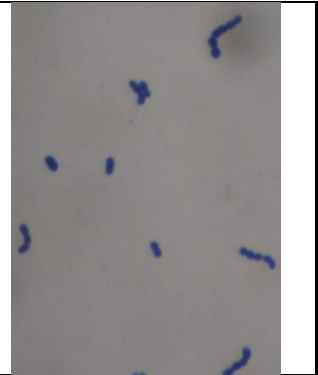
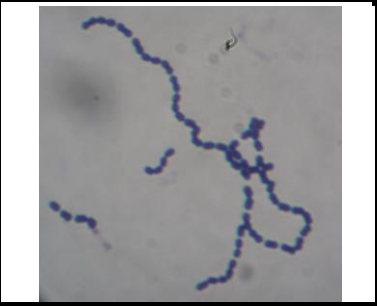
ANEXO D

Tabla D.1. Características generales de las cepas de trabajo identificadas previamente como *Streptococcus* spp.

Cepa	Aislados	Morfología y Gram (APT)	Cat	Microscopía	Cepa	Aislados	Morfología y Gram (APT)	Cat	Microscopía
<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> 25124	✓	Cocos G+, cadenas	-		68.2	✓	Cocos G+, cadena larga/colonias blancas traslúcidas	-	
11	✓	Cocos G+	-		84.1	✓	Cocos G+, cadena larga/colonias blancas	-	
49	✓	Cocos G+	-		84.3	84.31	Cocos G+, cadenas/colonias blancas	-	
56	✓	Cocos G+, cadenas cortas	-			84.32	Cocos G+, cadenas/colonias crema traslúcidas	-	

1	✓	Cocos G+, cadenas /colonias circulares blancas	-		92.1	✓	Cocos G+, cadena larga/colonias blancas	-	
50.1	50.11	Cocos G+, cadena /colonias traslúcidas	-		93.1	✓	Cocos G+, cadena larga/colonias blancas	-	
	50.12	Cocos G+, cadena larga/colonias blancas	-		107.1	✓	Cocobacilos G+, cadena larga/ colonias blancas	-	
	50.13	Cocos G+, cadena larga/colonias traslúcidas	-		107.2	✓	Cocobacilos G+ /colonias blancas	-	
50.2	50.2	Cocos G+, cadena larga/colonias blancas	-		115.2	115.21	Cocos G+, racimos/colonias grandes crema	+	

	50.21	Cocobacilos cadena larga/colonias traslúcidas	G+, -			115.22	Cocos G+, racimos/colonias blancas	+	
	50.23	Cocobacilos cadenas/colonias blancas	G+, -		130.1	✓	Cocos G+, cadenas largas/colonias blancas traslúcidas	-	
50.3	50.31	Cocobacilos G+/colonias blancas	-		130.2	130.21	Cocos G+, cadenas/colonia s blancas al centro y de borde traslúcido	-	
	50.32	Cocos G+, cadena larga/colonias blancas	-			130.22	Cocos G+, cadenas/colonias blancas puntiformes	-	

68.1	68.11	Cocos pequeños G+, cadenas/colonia crema	-			154.2	Cocos G+/colonias blancas	-	
	68.12	Cocos pequeños G+, cadenas/colonias blancas-traslúcidas	-						

Los frotis para la tinción de Gram se obtuvieron de caldo APT para favorecer la formación de la agrupación característica en cadena de los estreptococos.
G+. Gram-positivo.
Cat. Prueba de catalasa. Bacterias ácido lácticas como los estreptococos dan prueba negativa a la actividad de esta enzima.



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

Certificate of Poster Presentation

This is to certify that

Lila Lubianka Domínguez-Ramírez, Mariano García-Garibay,
Romina Rodríguez Sanoja, Gloria Díaz-Ruiz, Carmen Wachter Rodarte

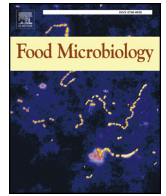
Presented a poster at the 115th General Meeting on May 30-June 2, 2015 in New Orleans, Louisiana

Arturo Casadevall, Chair
General Meeting Program Committee



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

Nicole Dubilier, Vice Chair
General Meeting Program Committee



Tolerance to acid and alkali by *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* strain 25124 isolated from fermented nixtamal dough: Pozol. Studies in APT broth

Lila Lubianka Domínguez-Ramírez^a, Romina Rodríguez-Sanoja^{a,b}, Alberto Tecante^a, Mariano García-Garibay^{a,c}, Teresita Sainz^{a,d}, Carmen Wachter^{a,*}

^a Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Coyoacán, C.P., 04510, Mexico City, Mexico

^b Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Coyoacán, C.P., 04510, Mexico City, Mexico

^c Departamento de Biotecnología/Departamento de Ciencias de La Alimentación, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa/Lerma. Av. San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina, Iztapalapa, C.P., 09340, Mexico City, Mexico

^d Departamento de Sistemas Biológicos de La División de CBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada Del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Coyoacán, C.P., 04969, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Streptococcus infantarius subsp. *infantarius*

Fermented maize dough

Pozol

APT broth

Acid tolerance response (ATR)

Alkali tolerance response (ATR)

ABSTRACT

Pozol is a beverage prepared with maize dough made after boiling the kernels in limewater. This pretreatment could act as a selective force that shapes the starter microbiota, with microorganisms able to survive the fermentation. Since *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* (*Sii*) dominates in *pozol*, we evaluated the effect of acid and alkali stresses on strain *Sii*-25124 in commercial APT broth as a first attempt to assess its adaptation capacity. Results suggest that *Sii*-25124 has adaptative advantages to pH changes that possibly contribute to its persistence even after the acidification of the dough. Its cardinal pH values were 4.0 and 11.0, with an optimum between 6.6 and 8.0. It showed alkali tolerance unlike other *pozol Sii* strains. Adaptation at pH 4.0, 10.0 and 11.0, compared with non-adapted cells, induced acid tolerance enhancing survival at pH 3.6 ($P < 0.05$); a 2 min heat shock at 62 °C induced alkali tolerance response enhancing survival at pH 10.5 ($P < 0.05$). The up-regulation of *dnaK*, *groEL*, *ptsG* and *atpB* was observed during 5 h of exposition at pH 3.6, 4.0 and 10.0, showing similar expression rates after induction by acid shock or alkaline stress. Changes of *atpB* were more evident having almost five-fold induction during long-term stress.

1. Introduction

Streptococcus species are well known for their contribution to food fermentations. *Streptococcus thermophilus*, *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*, and *S. infantarius* subsp. *infantarius* (*Sii*) are present in traditional fermented foods (Abdelgadir et al., 2008; Díaz-Ruiz et al., 2003; Jans et al., 2013b; Pacini et al., 2006; Rashid et al., 2007; Renye et al., 2011; Tsakalidou et al., 1998; Wullschleger et al., 2013).

In contrast to *S. thermophilus*, which has been extensively studied and used as a starter culture, *Sii* is relatively unknown. It is particularly associated with mammals as a commensal microorganism, but rarely isolated from clinical human samples from diseased patients (Correidora et al., 2008, 2014; Lazarovitch et al., 2013). However, it is considered as a possible opportunistic bacterium and its safety should

be assured before considering it as a starter culture (Jans et al., 2015; Kaindi et al., 2018). Presently, *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* (*Sii*) status, as *Enterococcus* species', as part of QPS bacteria, is controversial because their role as pathogens is not well known.

Sii belongs to the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* Complex (SBSEC). This group is from animal, human or food origin. Bacteria of SBSEC group can live in the gastrointestinal tract as a small part of the population, but can also grow as opportunistic pathogens (Jans and Boleij, 2018). According to the same authors, a number of pathogenicity factors are important, but especially those related to their adhesion capacity, bacterial surface structures, as lipoteichoic acids, capsular polysaccharides and especially pilus structures. These pili are always present in *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, a highly pathogenic member of SBSEC isolated from human blood clinical samples

* Corresponding author.

E-mail addresses: lila.lubianka@yahoo.com.mx (L.L. Domínguez-Ramírez), romina@biomedicas.unam.mx (R. Rodríguez-Sanoja), mgarcia@correo.ler.uam.mx (M. García-Garibay), trsainz@correo.xoc.uam.mx (T. Sainz), wachter@unam.mx (C. Wachter).

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103458>

Received 16 July 2019; Received in revised form 10 December 2019; Accepted 10 February 2020

Available online 12 February 2020

0740-0020/ © 2020 Published by Elsevier Ltd.

(Bolej et al., 2009, 2011; Corredora et al., 2008; Lazarovitch et al., 2013). Nevertheless, data of other members of the group, including *Sii*, is scanty and clinical isolations of *Sii* are rare (Corredora et al., 2008, 2014; Lazarovitch et al., 2013). Therefore, the knowledge of its epidemiology and the effects in human health by consumption of food products is relevant.

On the other hand, *Sii* is important as part of the fermentative microbiota of many traditional fermented foods and in some cases even as predominant among lactic acid bacteria. It has been found in traditional fermented dairy products from Africa such as *gariss* and *suusac* (camel milk), *fènè*, *mala* and *roab* (cow milk) and in Indian *dahi* (cow and/or buffalo milk) (Abdelgadir et al., 2008; Bouvet et al., 1997; Hamza et al., 2009; Jans et al., 2013b; Rashid et al., 2007; Tsakalidou et al., 1998; Wullschleger et al., 2013); occurring also in African *obushera*, a fermented cereal-based food (Mukisa et al., 2012) and as part of the dominant microbiota of *pozol* (Díaz-Ruiz et al., 2003; López, 2006). Then, the need to observe the evolution of different lineages and their specific adaptations to the niche seem relevant (Kaindi et al., 2018). It has been reported that African variants are different from human isolated *Sii* strains and that they are well adapted to dairy products harboring a dairy adaptation marker genes *lacS/lacZ* and a *gal-lac* operon absent in clinical strain *S. infantarius* subsp. *infantarius* ATCC-BAA-102T (Jans et al., 2012; 2013a), but almost nothing is known about isolates from cereal fermentations.

Pozol is prepared from maize kernels, which are boiled for approximately 90 min in limewater (1% w/v lime), reaching pH values from 11 to 13. After this process, known as *nixtamalization*, kernels are washed with fresh water and hand-rubbed to remove the husks, hot-wet-milled into dough (named *nixtamal*), shaped as balls and wrapped in banana plant leaves letting them to ferment naturally. Afterwards, the fermented dough is suspended in water and consumed as a traditional refreshing beverage. *Nixtamalization* could act as a selective force that shapes the starter microbiota, with microorganisms well adapted to initial conditions, able to survive the pH changes during fermentation and prevail after the acidification.

The present study evaluated the effect of acid and alkali stresses on the tolerance of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* strain 25124 (*Sii*-25124) isolated from *pozol* dough, in commercial APT broth as a first attempt to assess its adaptation to changes in the niche conditions. To grow and persist in this dough, *Sii* should be able to withstand the environmental changes in pH that this traditional food undergoes during fermentation. Induction of acid tolerance response (ATR) and alkali tolerance response (AITR) were explored.

The alkali tolerance response (AITR) is not as well documented as the ATR, but it has been studied in *Listeria monocytogenes* (Gahan et al., 1996; Giotis et al., 2008) and in *E. faecalis* (Flahaut et al., 1997); it also has a cross-protective effect against other stressors. This cross-protection is related to changes in the expression of general stress genes like those that code for the heat-shock proteins (Hsps), which are modified not only under thermal stress but also by other stress conditions (Flahaut et al., 1997; Nascimento et al., 2004). Then, expression rates of genes *dnaK*, *groEL*, *ptsG* and *atpB* were measured to explore their contribution to pH homeostasis during acid or alkali stress.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

Twenty six presumptive *Streptococcus* strains isolated from the same white maize *pozol* dough from Villahermosa, Tabasco (Mexico, 2007), 3 strains (11, 49 and 56) obtained from the same producer (in 2009), and the tentatively identified as *Streptococcus bovis*/*S. infantarius* subsp. *coli* 25124 (Díaz-Ruiz et al., 2003) were used, all of them identified at species level by sequencing and comparison of partial *sodA* sequences as part of this work (section 2.2). The strains were preserved at -72°C in APT broth (BD-Difco, USA) added with 20% (v/v) of glycerol as

Table 1

NCBI accession numbers of the *sodA* sequences of species related to *Streptococcus* spp. strains used for the analysis and comparisons for the identification.

Strain	NCBI Accession
<i>Clostridium botulinum</i> ATCC19397	gb CP000726.1
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM7000	gb JN180473.1
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	gb U17388.1
<i>S. bovis</i> ATCC33317	gb AY344537.1
<i>S. galloyticus</i> TDGB446	gb JF820327.1
<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> CIP106106	emb AJ306979.1
<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> CJ18	gb CP003295.1
<i>S. luteciae</i> NEM760	emb AJ297188.1
<i>S. lutetiensis</i> CCUG41793	gb GU991777.1
<i>S. macedonicus</i> CCUG39970	gb GU991782.1
<i>S. oralis</i> SK565	gb EU798267.1
<i>S. salivarius</i> VMC49	gb JN181304.1
<i>S. thermophilus</i> ATCC19258	emb Z95921.1
<i>Staphylococcus aureus</i> 8325-4	gb AF121672.3

cryoprotectant, reactivating in APT broth at 30°C for 24 h. These strains were routinely cultured in APT broth at 30°C .

2.2. Identification by partial *sodA* gene sequence comparison

DNA was extracted using the Fast ID/DNA extraction kit (Genetic ID NA, Inc., USA) according to the manufacturer's instructions. Partial *sodA* gene sequence was amplified with *d1* and *d2* primers as described by Poyart et al. (2002). PCR was performed into a Thermocycler T-Personal Combi (Biometra, Germany). Amplicons were purified using the PCR CleanUp columns (Millipore, Mexico) according with manufacturer's instructions. Sequencing was made by MacroGen Inc. (Korea; <http://macrogen.com/eng/>) using the *d1* forward primer. The sequences were analyzed in NCBI (National Center of Biotechnology Information) using the online *Blastn* program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Multiple alignment was done by ClustalW (similarity matrix BLOSUM 62) using BioEdit software (version 7.2.0) to identify the strains comparing their sequences against other streptococci and non-streptococci species sequences available in GenBank (Table 1).

2.3. Cardinal pH values for the growth of *Sii*-25124

Physiological experiments, which were repeated independently at least 3 times, were done mainly with strain *Streptococcus bovis*/*S. infantarius* subsp. *coli* 25124. A 24-h culture was used for inoculation of fresh APT broth, followed by incubation at 30°C for 5 h to achieve cells in the early stationary phase. Cells were harvested by centrifugation for 15 min at $15,366 \times g$, at 4°C (Hermle Z160M Microcentrifuge, Barnstead International, USA), washed twice and resuspended in 1.2 mL of ISS adjusting to count 1×10^6 CFU/mL. Tubes containing APT broth at each of the modified pH values were inoculated with the strain (10% v/v). APT broths were previously adjusted to pH values of 3.6, 4.0 and 5.0 with lactic acid (87.9% purity, J. T. Baker, USA), and to pH values of 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 and 12.0 with sodium hydroxide (1M NaOH; Mallinckrodt AR, USA). For pH 6.0, non-modified APT broth (pH 6.6) was used. To estimate growth, absorbance (OD₆₀₀) values (Genesys 10S UV-Vis, ThermoScientific, USA) were measured at 0, 1, 2, 3, 4 and 24 h after inoculation. Broth samples were taken at 5 and 24 h, after dilution in isotonic saline (ISS, NaCl, 0.85% w/v; J. T. Baker, USA) a plate count on APT agar (APT broth supplemented with 1.5% w/v Agar; BD-Bacto, USA) was performed; CFU were determined after incubation for 24 and 48 h at 30°C . The medium at pH 3.6 was sampled at 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min.

2.4. Growth kinetics variability of *Streptococcus* spp. strains in APT broth

Strains identified as: *Sii-1*, *Sii-50.21*, *Sii-50.31*, *Sii-84.31*, *Sii-92.1* and *Sii-107.1*, and also strain *Sii-25124*, were used to study variability in growth kinetics in APT broth. Overnight cultures of each strain were used to inoculate fresh APT broth (10% v/v), incubating 24 h at 30 °C. Afterwards, cultures were inoculated into 100 mL Erlenmeyer flasks, containing a final volume of 30 mL of inoculated APT broth (to get initial counts of 1×10^6 CFU/mL). They were incubated statically at 30 °C; these can be considered microaerophilic conditions, which are adequate for this microorganism that is aerotolerant. All experiments were done under the same conditions, with the purpose of obtaining comparable results. Samples were taken at times (h): 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 30 and 48 to read OD₆₀₀. Samples at 0, 5 and 24 h were used to do plate count on APT agar. Each point represents the average of 2 plate counts from three independent experiments. To estimate the maximum growth rate (h^{-1}) of the strains, three-parameter Gompertz model was applied (SigmaPlot, v14.0, 2017; Systat Software Inc, USA). The plot $\ln(N/N_0)$ vs time was used to estimate the regression parameters A (asymptotic values), μ_m (maximum growth rate) and λ (lag phase) (Eq. (1)).

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = A \cdot e^{-\frac{\mu_m e}{A}(\lambda - t) + 1} \quad (1)$$

2.5. Growth threshold pH for *Streptococcus* spp. strains

Sii-1, *Sii-50.21*, *Sii-50.31*, *Sii-84.31*, *Sii-92.1* and *Sii-107.1* were studied and *Sii-25124* as control. Early stationary phase (5 h incubating at 30 °C on APT broth) cultures were used; cells were harvested by centrifugation for 15 min at $15,366 \times g$, at 4 °C, washed twice and resuspended in ISS. APT broth tubes adjusted at pH 4.0 and 12.0 were inoculated to count 1×10^8 CFU/mL; incubated at 30 °C, samples were taken at times (h): 0, 1, 2, 3, 4, 5, 24 and 48, to assess OD₆₀₀. At times: 3, 24 and 48 h, plates with APT agar were inoculated by simple streak to know if each culture was still viable. APT broth tubes adjusted to pH 3.6 were also inoculated, samples were collected at: 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min to measure OD₆₀₀ and at 30 min and 3 h to assess viability.

2.6. ATR induction by acid or alkaline adaptation in strain *Sii-25124*

A 24-h culture was used to inoculate APT broth tubes at pH 4.0, pH 10.0 or 11.0 (5% v/v) which were incubated 5 h at 30 °C as an adaptive step. Non-adapted cells, used as control, were grown in non-modified APT broth. After incubation, cells were harvested, washed twice and resuspended in ISS as described above. For the lethal acid challenge, tubes containing 10 mL of APT broth at pH 3.6 were inoculated with the bacterial suspension to get 1×10^6 CFU/mL. Samples were taken at 0, 5, 15, 30 and 60 min, serially diluted in ISS, plated on APT agar and incubated at 30 °C for CFU counting after 48 h. The percentage of surviving cells was calculated by subtraction of CFU/mL at time zero from CFU/mL at the indicated time point, considering the count at time zero as 100%.

2.7. ATR or AITR induction by heat shock, cross-protective effect

Sii-25124 was grown to the early stationary phase and harvested as previously described. Cells were washed and resuspended in ISS, followed by inoculation of 1×10^9 CFU/mL into preheated tubes with APT broth. Heat shock conditions were 62 °C for 2 min; control (non-heat shocked) cells were maintained at 30 °C. Heat- and non-heat shocked samples were transferred to separate APT-broth tubes with pH adjusted to 3.6 and 10.5, both ice-chilled for 1 min prior to the pH test to stop the heat shock. Samples were taken at 0, 5, 15, 30 and 60 min, serially diluted in ISS and plated on APT agar, then incubated at 30 °C

to count CFU/mL after 48 h. Percent survival was calculated as referred in section 2.6.

2.8. Modification of gene expression in *Sii-25124* associated with acid or alkali stress

A two-step RT-qPCR was performed to assess changes in the expression of genes *atpB*, *dnaK*, *groEL* and *ptsG* under stressful pH conditions. Cells adapted to sublethal pH levels of 4.0 and 10.0, and to a lethal acid pH of 3.6, were obtained. Cells grown at pH 6.6 were used as controls.

A 24-h culture was harvested by centrifugation $10,000 \times g$, 4 °C for 10 min (Beckman Centrifuge JA-14, Beckman Coulter Inc., USA), washed twice and resuspended in ISS; the final pellet was resuspended in ISS. This suspension was used to inoculate (10% v/v) APT-broth tubes with pH adjusted to 3.6, 4.0 and 10.0; non-modified APT broth was included as control. Broths were incubated at 30 °C, aliquots were obtained at 1 and 5 h, diluted in phosphate buffer 0.1 M pH 7.5 ($NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, J. T. Baker, Mexico) and centrifuged as described above. The experiment to obtain adapted cells was run separately twice; the RT-qPCR was performed for each sample in triplicate.

For total RNA extraction, the cell pellets recovered were resuspended in 800 μ L of Trizol reagent (Tri-Reagent, Molecular Research Center, USA) added with 200 μ L of cold chloroform (Chloroform at 99+%, Sigma, USA), and mixed by inverting the tube 10 times. Samples were centrifuged for 15 min at 4 °C and $15,366 \times g$ (Hermle Z160M Microcentrifuge, Barnstead International, USA). Afterwards, samples were added with 500 μ L of cold isopropanol, followed by incubation for 20 min at -70 °C. Samples were then centrifuged at $22,000 \times g$ for 15 min at 4 °C. Supernatants were discarded and 1 mL of cold ethanol (ethanol solution 75% v/v, Reactivos y Productos Químicos Finos, Mexico) was added. Pellets were washed two more times with 0.5 mL of cold ethanol and centrifuged; the supernatants were discarded. The final pellets were resuspended in 40 μ L of sterile water.

For the cDNA synthesis, 3 μ g of RNA were used, adding 1 μ L of Oligo (dT)15 Primer (500 μ g/mL; Promega, USA), and bringing the volume to 15 μ L with sterile water. This mixture was incubated for 5 min at 70 °C in a thermocycler (T Personal Thermocycler, Biometra, UK). Five μ L of M-MLV 5 \times buffer (Promega, USA) were added with 1 μ L of M-MLV reverse transcriptase (200 u/ μ L; Promega, USA), bringing the final volume to 25 μ L with sterile water, and incubating in thermocycler for 60 min at 42 °C.

2.8.1. Analysis of gene expression by qPCR

RT-qPCR was performed with a mixture reaction that contained 15 μ L of Master Mix (Taq 1.1 \times Master Mix, 2.0 mM $MgCl_2$, Ampliqon, Denmark); the corresponding forward and reverse primers (0.2 μ M); 0.5 μ L of EvaGreen Dye 20 \times (EvaGreen Dye, 20 \times in water, Biotium, USA); 0.3 μ L of ROX reference dye (Invitrogen, Thermo Scientific, Mexico); and a volume equivalent to 100–150 ng/ μ L cDNA, bringing the final volume to 20 μ L with sterile water. Quantitative amplification was performed in a Rotor-Gene Q (Qiagen, Germany) with a two-step cycle consisting of 95 °C for 10 s followed by 60 °C for 45 s, repeated for a total of 40 cycles. Data were normalized using the reference gene 16S rRNA amplified with primers 338f and 518r. Primers for the genes *atpB*, *dnaK*, *groEL* and *ptsG* were designed in this work (Table 2).

Data analysis was performed with the Rotor-Gene Q Series Software v2.3.1.49 (Qiagen, Germany) by the double-delta method [$\Delta\Delta Ct$ (Livak and Schmittgen, 2001)]. Threshold-cycle values were estimated, considering a threshold of 0.1, automatically by the software.

2.9. Statistical analysis

Statistical comparison of the percent survival of adapted vs non-

Table 2

Primers used for the qPCR analysis of the differential gene expression of *atpB*, *dnaK*, *groEL* and *ptsG*, in *S. infantarius* subsp. *infantarius* 25124 under acidic (pH 3.6, 4.0) and alkaline (pH 10.0) conditions.

Gene	Primer	Sequence 5'-3'	nt	Amplicon (pb)	Reference
<i>atpB</i>	atpB1	GCTGGTGAAGTTGTTACTGC	20	95	This work
	atpB2	GCAACCCAAGCCAAGTTAAG	20		
<i>dnaK</i>	dnaK1	CCAGTTCGTCAAGCTCTTTC	20	128	This work
	dnaK2	GGTTCCTTGCCAGTTTCAGC	20		
<i>groEL</i>	groEL1	CAATTGGTATCCGTCGTGG	19	105	This work
<i>ptsG</i>	ptsG1	TCTTCCCAGCTAAACATGCC	20	105	This work
	ptsG2	CAGAGAATGGCACACCGTTA	20		
16S rRNA	338V3For	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	20	180	Lane (1991)Muyzer et al. (1993)
	158V3Rev	ATTACCGCGGCTGCTGG	17		

nt. nucleotides. bp. Base pairs.

adapted cells exposed to the lethal acid challenge (to assess ATR induction by acid or alkaline adaptation), and for heat-shocked vs non-heat shocked cells exposed to the lethal acid challenge or alkali tests (for the ATR or AlTR induction by heat shock), were performed by a single factor ANOVA followed by a Duncan's multiple range test, using the statistic software package SPSS 22.0 (IBM, USA); $P < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Identification by partial *sodA* gene sequence comparison

Streptococcus bovis/*S. infantarius* subsp. *coli* 25124 (Díaz-Ruiz et al., 2003) and 26 *Streptococcus* spp. strains isolated from *pozol* dough, were identified by the analysis of *sodA* gene sequence as *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*. The strain 25124 is now recognized as *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* 25124 (*Sii*-25124). Neighbor-Joining (NJ) dendrogram was made using DNADist tool from the BioEdit software (Fig. 1), comparing *pozol Sii* strains *sodA* sequences against other streptococci and non-streptococci species shown in Table 1. *Sii*-25124 and the 26 *Sii* strains are part of the same homogenous cluster, which also includes *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* strain CJ18 and *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* strain CIP10610. This cluster is separated from *Streptococcus bovis* and *Streptococcus lutetiensis* (formerly *Streptococcus infantarius* subsp. *coli*), species phylogenetically close to *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* (Poyart et al., 2002).

3.2. Cardinal pH values for the growth of *Sii*-25124

To assess the effect of acid and alkali stresses on *Sii*-25124, the growth kinetics at different pH values in commercial APT broth was measured as an increase of the OD₆₀₀ during incubation at 30 °C. Since APT broth is an unbuffered medium, the effect of initial pH was assessed. *Sii*-25124 showed higher OD₆₀₀ from pH 6.6 to 9.0, with optimal growth at pH 8.0 (Fig. 2). Maximum growth rate was estimated for the strain, with three-parameter Gompertz model (as described in section 2.4), at pH values of 4.0, 5.0, 6.6, 7.0, 8.0, 9.0, 11.0, these were: 0.049, 0.901, 1.700, 1.700, 1.700, 1.560, 0.537, 0.414 h⁻¹, respectively. The highest pH where growth was still evident was 11.0, reaching counts of 4.6 ± 0.5 log CFU/mL. The minimum pH value where growth was still recorded was 4.0 with not evident increase in OD₆₀₀, at least during the incubation time of 24 h used in this study, but counts increased from 6.0 to 7.2 ± 0.4 log CFU/mL after 5 h at 30 °C. An acid pH of 3.6 was lethal for *Sii*-25124, cells decreased in counts from 7.6 ± 0.9 to 1.6 ± 0.06 log CFU/mL after 1 h. Then, this defines its minimum and maximum pH for growth as: 4.0, and 11.0, respectively, with an optimal between 6.6 and 8.0, being in consequence alkali tolerant.

3.3. Growth kinetics variability of *Streptococcus* spp. strains in APT broth

The growth kinetics of strains: *Sii* - 1, *Sii*-50.21, *Sii*-50.31, *Sii*-84.31, *Sii*-92.1 and *Sii*-107.1 were compared to that of *Sii*-25124 in APT broth incubated at 30 °C. Maximum growth rates estimated using the three-parameter Gompertz model were: *Sii*-25124, 1.080 h⁻¹; *Sii*-1, 1.040 h⁻¹; *Sii*-1, 0.966 h⁻¹; *Sii*-92.1, 0.827 h⁻¹; *Sii*-50.21, 0.770 h⁻¹; *Sii*-84.31, 0.744 h⁻¹; *Sii*-50.31, 0.713 h⁻¹.

3.4. Growth threshold pH for *Streptococcus* spp. strains

After finding that growth in APT broth, incubated at 30 °C for 24 h, was similar (an average of 0.877 ± 0.150 h⁻¹) for all *Sii* strains evaluated, their growth at low pH values was assessed using as reference the *Sii*-25124 pH_{min} (pH 4.0) and its pH_{max} 11.0. *Sii*-1, *Sii*-50.21, *Sii*-50.31, *Sii*-84.31, *Sii*-92.1 and *Sii*-107.1 strains showed differences in tolerance and persistence at pH 4.0. Strain *Sii*-92.1 did not show an increase in OD₆₀₀ but it remained viable. Strains *Sii*-1 and *Sii*-50.21 showed OD₆₀₀ values of 0.2 units after 24 h of growth, being still viable after 48 h. Those strains with less acid tolerance were *Sii*-50.31, that lost viability after 48 h, and *Sii*-107.1, which lost viability after 24 h. In the most alkaline pH value where *Sii*-25124 still remains, pH 11.0, no growth was observed for any of the strains; all the strains lost viability after 3 h with a reduction of 6 log CFU/mL. The same was observed with pH 3.6 which was also lethal for them.

3.5. ATR induction by acid or alkaline adaptation

Since pH 3.6 was lethal for *Sii*-25124 and the other *Sii pozol* strains, this condition was used for the lethal acid challenge. Only *Sii*-25124 was used as a first attempt to assess *Sii pozol* strains adaptation to changes in the niche conditions. Sublethal acid and alkaline conditions where *Sii*-25124 showed minimum growth were pH 4.0, 10.0 and 11.0. These pretreatments significantly enhanced survival after exposure to the lethal acid challenge ($P < 0.05$), compared with non-adapted cells (Fig. 3). After 5 min of exposure in the lethal acid challenge, cells adapted to pH 4.0 showed 13.01 ± 0.28% survival, while those adapted to pH 10.0 and pH 11.0 attained 5.45 ± 0.25% and 2.76 ± 0.12% survival, respectively, and non-adapted cells, 0.09 ± 0.02%. After 30 min, these values were: 0.90%, 1.60% survival for cells adapted to pH 4.0 and pH 10.0, compared to 0.004% survival of non-adapted cells. Oral streptococci which show this kind of induction of ATR, such as *S. mutans* and *S. sobrinus*, adapted to pH 5.5 and then challenged with pH 2.85, showed survival of 0.38% and 0.49% after 90 min, respectively, against 0.009% and 0.0025% of non-adapted cells kept at pH 7.0 (Nascimento et al., 2004). These results suggest that this kind of adaptation, both acid and alkali, induce an ATR in *Sii*-25124.

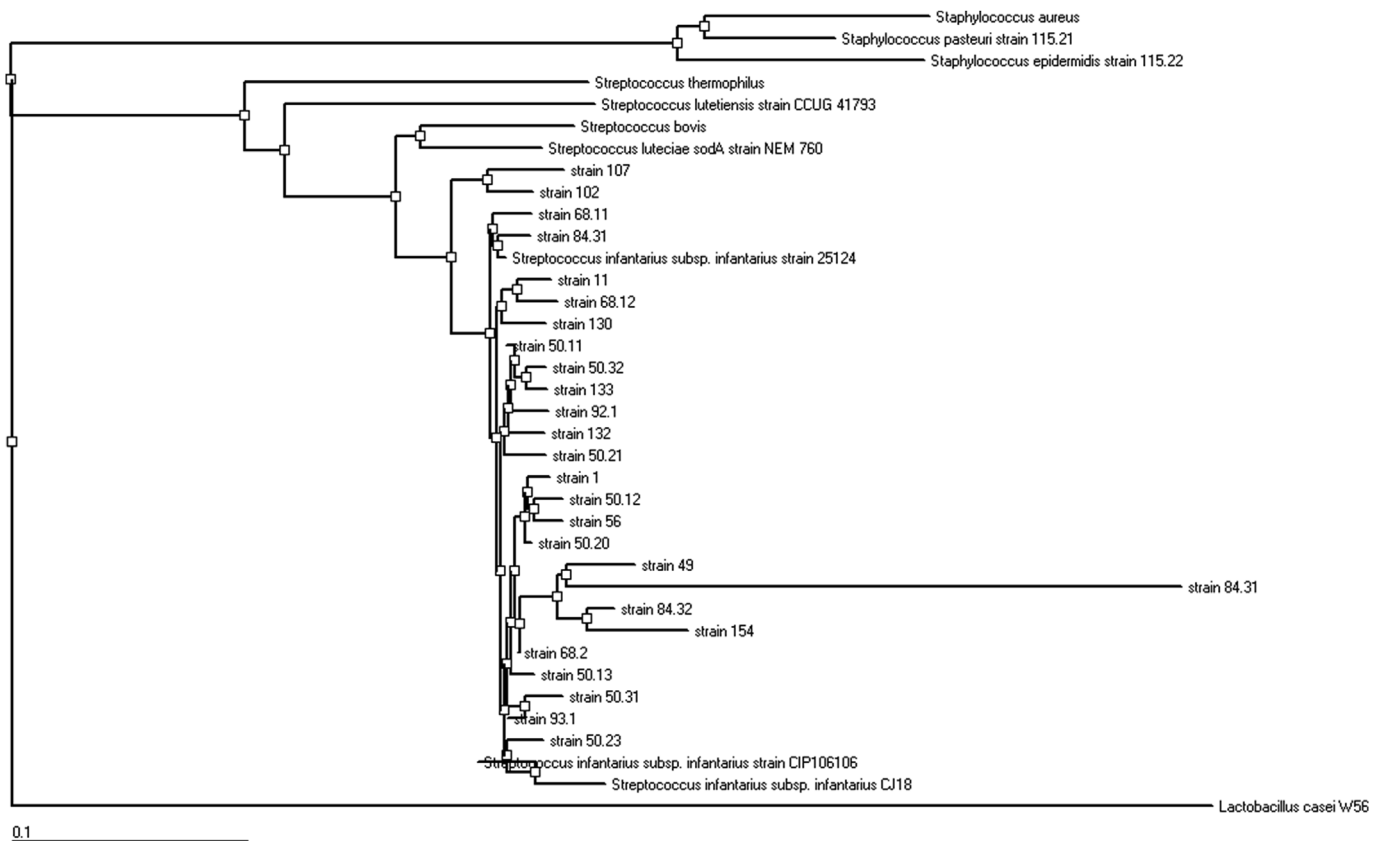


Fig. 1. Identification of *Streptococcus* spp. strains isolated from *pozol*. Neighbor-Joining dendrogram constructed by analysis and comparison of partial sequences of *sodA* gene from *Streptococcus* spp. strains and the previously designated *Streptococcus bovis*/*S. infantarius* subsp. *coli* 25124, all of them isolated from *pozol*, and *sodA* sequences from other streptococci and non-streptococci species obtained from GenBank. *Clostridium botulinum* ATCC 19397 as external group. Horizontal bar indicates substitution rate. Bootstrap = 1000.

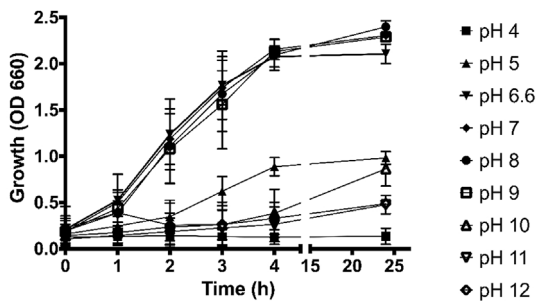


Fig. 2. *Sii*-25124 growth kinetics at different pH values. Growth of *Sii*-25124 in APT broth, measured as OD₆₆₀, adjusted to pH values of 4.0 and 5.0 with lactic acid; 6.6 in non-modified APT broth; 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 and 12.0 adjusted with NaOH; all incubated at 30 °C. Standard deviations of 3 separate experiments are shown as vertical lines.

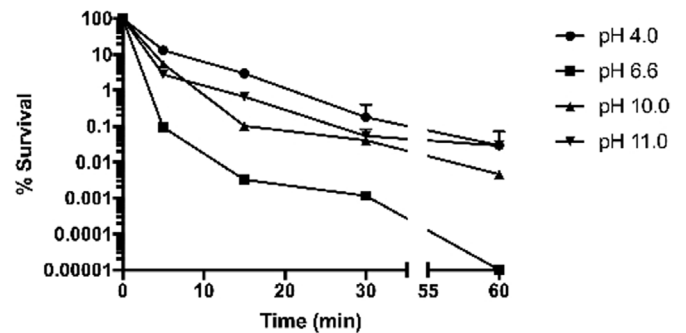


Fig. 3. ATR induction by acid or alkaline adaptation. Effect of acid or alkaline adaptation in APT broth on the subsequent percent survival of *Sii*-25124 in APT adjusted at pH 3.6 with lactic acid. Cells were adapted for 5 h in APT adjusted to pH 4.0, 10.0 and 11.0 prior to the lethal acid challenge. Non-adapted cells were grown in APT broth at pH 6.6 prior to the test. Percent survival was calculated by subtraction of CFU/mL at time zero from CFU/mL at the indicated time point, considering the count at time zero as 100%. Standard deviations of 3 separate experiments are shown as vertical lines.

3.6. ATR or AITR induction by heat shock, cross-protective effect

The induction of cross-protection to a certain kind of stress by other type or level of stress makes bacteria more tolerant to niche changes (Flahaut et al., 1997; Gahan et al., 1996; Giotis et al., 2008); then, considering the process used to prepare *pozol* dough, not only pH response was tested but also *Sii*-25124 heat tolerance. The most probable effective dose for the strain was 2.52 min at 62 °C in APT broth (data not shown). Considering this value, the conditions for the heat shock were: 2 min at 62 °C, to use it to evaluate the cross-protective effect of thermal stress to induce ATR or AITR. Results in Table 3 show that *Sii*-25124 exposed to alkaline stress displayed a significantly higher percent survival when previously heat-shocked, relative to non-heat

shocked cells ($P < 0.05$). In contrast, no protective effect to acid killing was induced by heat shock as there were no differences in percent survival between previously heat-shocked and non-heat shocked cells ($P > 0.05$). A similar cross protective effect was observed in *Enterococcus faecalis*, considered as a highly adapted bacterium (Giraffa, 2003), for which an adaptation to pH 10.5 induced thermotolerance to 62 °C (Flahaut et al., 1997).

Table 3

Effect of heat shock (62 °C, 2 min) on the subsequent acid (pH 3.6) or alkali (pH 10.5) tolerance of *Sii-25124*, measured as percent survival of viable cells, relative to non-heat shocked cells (Control at 30 °C, 2 min).

Exposure time ^a (min)	pH 3.6 Percent Survival		pH 10.5 Percent Survival	
	Control	Heat-shocked	Control	Heat-shocked
5	0.7 ± 0.1 ^a	6.7 ± 0.5 ^a	25.7 ± 5.3 ^c	85.8 ± 1.9 ^e
15	0.4 ± 0.1 ^a	0.2 ± 0.2 ^a	20.6 ± 5.5 ^c	75.8 ± 9.5 ^d
30	0.05 ± 0.003 ^a	0.04 ± 0.04 ^a	10.6 ± 2.7 ^b	26.4 ± 9.9 ^c
60	0.003 ± 0.002 ^a	0.006 ± 0.001 ^a	3.9 ± 1.5 ^{ab}	6.5 ± 1.4 ^{ab}

^a Exposure time to acid or alkali stress. ± Standard deviation of 3 separate experiments. ^{abcde}Different letters indicate statistically significant differences among heat-shocked cells at the given pH value vs its control (P < 0.05).

3.7. Modification of *Sii-25124* gene expression associated with acid or alkali stress

Given the results obtained for *Sii-25124*, alkaline pH induces cross-protection triggering an ATR and heat shock induces cross-protection triggering an AITR. This cross protective effect is possibly related to changes in the expression of general stress genes. Thus, the contribution of heat-shock proteins such as DnaK and GroEL, and also the role of F₁F₀-ATPase and phosphoenolpyruvate phosphotransferase system (PEP-PTS) to these adaptations were studied. This was done through the changes in the expression of the associated genes under lethal acid (pH 3.6), sublethal acid (pH 4.0) and sublethal alkaline (pH 10.0) conditions. The results of the expression of genes *dnaK*, *groEL*, *atpB* and *ptsG* are shown as the ratio of the expression of each gene at the pH values tested vs the normalized expression at the control pH 6.6, using 16S rRNA as reference gene; hence, values higher than 1 were considered as over-expression.

Up-regulation of the *atpB* gene was observed in *Sii-25124* exposed to the acid-killing pH of 3.6 for 1 h (Fig. 4A). After 5 h, *atpB*, *dnaK*, *groEL* and *ptsG* seem to be up-regulated at this pH value (Fig. 4B). Nevertheless, no increase in the expression of these genes was observed at pH 4.0 exposed for 1 h and only after 5 h of exposure the expression ratio of *dnaK* increased. Alkali stress induced up-regulation of genes *dnaK* and *ptsG* at 1 h. After 5 h, it showed a behavior similar to the 1 at pH 3.6. Genes *atpB*, *dnaK* and *groEL* were over-expressed. However, the effect of alkalinity caused in the expression of gene *ptsG* was different, a

decreased expression after 5 h of exposure was observed. These results suggest that the role of *atpB* and *dnaK* are both relevant for de ATR and the AITR.

Also, after 5 h of exposure to pH 10.0 displaying similar expression levels of *atpB*, *dnaK*, and even of *groEL* and *ptsG* (despite their role seems not to be as marked as the other two), compared to those after exposure to pH 3.6, possibly links the observations done from the physiological experiments. This means that the alkali adaptation prepares the expression levels of these genes in *Sii-25124* in order to be able to have an efficient ATR within harsh acidic pH conditions.

4. Discussion

Pozol is a maize dough-based fermented beverage where *S. infantarius* subsp. *infantarius* has been detected as part of its dominant microbiota. This species is present from the beginning to the end of the fermentation process, in spite of acidification of the dough and the changes promoted by *nixtamalization* (boiling kernels in limewater). This process makes *pozol* different from other traditional fermented maize foods such as *kenkey*, *mahewu*, *togwa* or *boza*, with initial fermentation pH values from 5.9 to 5.2 (Gotcheva et al., 2000; Halm et al., 1993; Mugula et al., 2003; Omemu et al., 2007) and for which the main species of the microbiota are lactobacilli (Hayford et al., 1999; Mugula et al., 2003; Petrova et al., 2010). After *nixtamalization*, kernels are washed to remove maize husks and excess of lime, so that the pH of *nixtamal* just before fermentation starts is near neutrality, or slightly alkaline if it was not washed properly (pH values near the optimal pH value for *Sii-25124*). Our results suggest that *Sii* could be able to withstand the pH values of the dough before and throughout fermentation, allowing it to become dominant since the beginning of fermentation, as observed by Ampe et al. (1999). This is a contribution to its survival, even if it is not as amyolytic as other LAB besides *Sii-25124* has a specific growth rate of 0.94 h⁻¹ on MRS broth with potato starch instead of glucose, compared to *L. plantarum* A6 (0.43 h⁻¹) and *L. fermentum* OgiE1 (0.35 h⁻¹) (Díaz-Ruiz et al., 2003).

Accordingly, in this work *Sii-25124* tolerated and persisted across a wide range of pH values (pH_{min} 4.0 and pH_{max} 11.0). The cardinal pH values of *Sii-25124* are consistent with those reported for *pozol* dough, for which the highest pH before fermentation ranges from 7.5 to 6.8, then, decreasing to values between 4.4 and 3.6 after fermentation (Díaz-Ruiz et al., 2003; Nuraida et al., 1995). These pH values are consistent with those found in other fermented foods (not maize based)

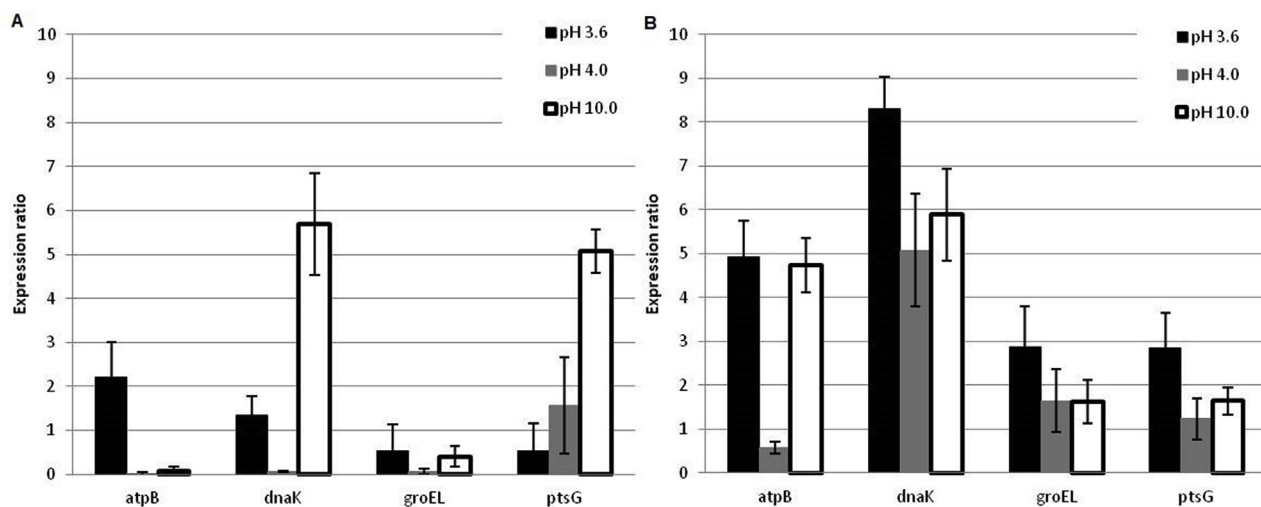


Fig. 4. Changes in the expression ratio of genes *atpB* (a subunit of F₁F₀-ATPase), *dnaK* (heat-shock protein, hsp70, chaperone), *groEL* (heat-shock protein, hsp60, chaperonine) and *ptsG* (glucose permease from PEP-PTS, EII^{Glu}) of *Sii-25124* exposed in APT broth to acid killing pH 3.6 (■), sublethal acid pH 4.0 (■), and alkaline pH 10.0 (□). (A) Exposure for 1 h as short-term stress and (B) for 5 h as long-term stress. Gene expression was normalized with the results in APT broth at pH 6.6 (control) and using the expression of gene 16S rRNA as reference. Standard deviations of 4 experiments are shown as vertical lines.

Table 4

Cardinal pH values reported for LAB isolated from fermented food products and *Sii-25124* isolated from *pozol* dough.

Bacteria	pH _{minimum}	pH _{optimal}	pH _{maximum}	Reference
<i>Lb. fermentum</i>	3.00	5.77	8.10	Le Blanc et al. (2004)
<i>Lb. plantarum</i>	3.40	6.00	8.80	Giraud et al. (1991)
<i>Lb. amylovorus</i>	3.55	5.40	9.00	Messens and DeVuyst (2002)
<i>Lb. sanfranciscensis</i>	3.94	5.47	6.67	Gänzle et al. (1998)
<i>Sii-25124</i>	4.00	6.6–8.00	12.00	This work
<i>E. faecalis</i>	5.00	7.00–7.50	9.60	Flahaut et al. (1997)

where *Sii* is part of the fermentative microbiota. As *obushera* (prepared from sorghum and/or millet) that has an initial fermentation pH of 6.0 and a final pH from 4.0 to 3.5 (Mukisa et al., 2012). For African fermented dairy products such as *gariss*, *suusac*, *fenè*, *mala*, *roab* and the Indian *dahi*, fermentation starts at a pH above 6.0: camel milk, pH 6.5–6.2; goat milk, 6.8–6.5; cow milk, 6.7–6.6 (Jans et al., 2012, 2013b); and ends at pH values ranging from 4.4 to 3.6 (Abdelgadir et al., 2008; Lore et al., 2005). This ability of *Sii-25124* to thrive in a broader pH range compared with data reported for LAB isolated from other fermented food products (Table 4) would contribute to its adaptability to the niche, as described for *E. faecalis*, a species that is able to adapt to extreme environments (Giraffa, 2003).

Unlike lactobacilli such as *Lb. plantarum* and *Lb. fermentum*, commonly found in fermented non-nixtamalized maize products, which are more tolerant to acidic conditions (Agati et al., 1998; Hounghouian et al., 1993; Olasupo et al., 1996) than *Sii*, the preference of the tested strain *Sii-25124* for alkaline rather than acid media, as well as its optimal pH for growth, which is between 6.6 and 8.0, should be important traits in order to be dominant in *nixtamal* dough. Some plant isolated lactobacilli have been reported to be alkali tolerant, with pH_{max} between 8.5 and 8.9 (Sawatari and Yokota, 2007), these values are lower than the highest pH tolerated by *Sii-25124* (pH 11.0). Possibly being another contribution to *Sii* adaptability to withstand different pH values.

Another factor that contributes to *Sii-25124* adaptability is that it is able to induce ATR by sublethal acid adaptation at pH 4.0, thus enhancing its survival to the lethal acid pH 3.6 (Fig. 3). It has been shown that adaptation to milder acidic conditions increases survival compared with non-adapted cells, as seen in *Sii-25124* and also observed in *S. mutans* (Nascimento et al., 2004), *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* (Papadimitriou et al., 2007) and *E. faecalis* (Flahaut et al., 1997). But the induction of ATR by alkali adaptation is not that common. Acid sensitivity was induced in *E. coli* and *E. faecalis* by alkaline pretreatments (Flahaut et al., 1997; Rowbury et al., 1993); while this adaptation induced cross-protection to lower pH levels in *Sii-25124* (Fig. 3). Both cases, ATR induced by acid or alkali are likely elements in the mechanisms used by this bacterium to overcome the changes in pH prior to the fermentation of *pozol* and the acidification that occurs.

Heat tolerance is likely not as important as ATR induction to enhance *Sii-25124* survival in *pozol* dough; however, it was observed that although heat shock does not induce cross-protection to lethal acid pH values, it does induce cross-protection to alkaline stress increasing significantly ($P < 0.05$) cell survival (Table 3). An induction of AITR similar to that shown by *Sii-25124* was also observed in *E. faecalis* but it was the alkaline pretreatment that induced thermotolerance (Flahaut et al., 1997). Therefore, the mechanisms involved in alkali tolerance and heat tolerance likely overlap, a phenomenon that may also occur in *Sii-25124*.

It is interesting to highlight that F_1F_0 -ATPase, Hsps (such as DnaK and GroEL) and the PEP-PTS glucose permease seem to participate in this overlap, particularly between alkali stress and the response to acid shock in *Sii-25124*.

F_1F_0 -ATPase is considered as the main enzyme involved in the

regulation of cytoplasmic pH when acidification occurs in streptococci. Its activity and/or expression increases during acidic conditions in *Streptococcus* species (Lemos et al., 2007; Martín-Galiano et al., 2001; Papadimitriou et al., 2007), as well as in *Sii-25124*, as observed by the induction of *atpB* at pH 3.6 (Fig. 4AB). Acid adaptation to pH 4.0 enhances the survival of *Sii-25124* in the lethal acid challenge (Fig. 3), but *atpB* is not induced (Fig. 4AB). *S. sobrinus* also shows this atypical behavior relative to oral streptococci. This species shows a non-significant change in F_1F_0 -ATPase levels at low pH (Nascimento et al., 2004), suggesting that *de-novo* protein synthesis is not required to enhance the survival of *Sii-25124*.

Alkali-tolerant lactobacilli have been reported (Sawatari and Yokota, 2007), but the mechanisms triggering AITR are not well documented for them or other LAB, including streptococci. The proton-translocation role of F_1F_0 -ATPase during alkaline stress is not known in LAB, while in the gram-positive *L. monocytogenes* an increase in *atpG* (gamma F_1 subunit) and *atpD* (beta F_1 subunit) has been reported, both being up-regulated by high pH values associated with a proton-import activity of F_1F_0 -ATP synthase (Giotis et al., 2010). Thus, the over-expression of *atpB* in *Sii-25124* at pH 10.0 observed in long-term stressed cells, with an almost five-fold induction (Fig. 4B), is possibly consistent with an ATP-synthase role.

Our results also suggest a potential relationship between this F_1F_0 -ATPase over-expression in *Sii-25124* during long-term exposure to pH 10.0 and the cross-protective effect of alkaline adaptation recorded in the lethal acid challenge (Fig. 3). The long-term alkaline exposure to pH 10.0 was equivalent to the alkaline adaptation prior to the lethal acid challenge in the survival experiments, thus improving the survival of *Sii-25124* also having a dual role in ATR and AITR, permitting to withstand the acid challenge.

Hsps are a set of almost 20 proteins that are induced in *E. coli* and other mesophilic bacteria, including LAB, when an up-shift of temperature occurs. These are important for growth and survival (Auffray et al., 1995; Boutibonnes et al., 1991, 1992). Both the chaperone DnaK and the chaperonin GroEL are part of Hsps and are recognized as general stress proteins (Lenz et al., 2010; Rince et al., 2000). They contribute to refold stress-denatured proteins; DnaK assists in the correct folding of newly synthesized proteins, participating in the assembly and disassembly of protein complexes, in the presentation of proteins for degradation and translocation, and in controlling signal transduction by regulating transcriptional factors (Erbse et al., 2004). DnaK and GroEL were up-regulated during acid shock and in the adaptation of *S. mutans* to low pH (Lemos et al., 2007), as well as in acid-adapted *S. thermophilus* (Zotta et al., 2009), and in the weakly acid-tolerant *S. pneumoniae* (Martín-Galiano et al., 2001). Thus, as expected, during the long-term stress at the lethal acid pH and at pH 4.0, the up-regulation of DnaK and GroEL was also evident in *Sii-25124* (Fig. 4B).

The increase of DnaK in *Sii-25124* seems to be more relevant under both, long-term acid stress and long-term alkaline stress (Fig. 4B; eight-fold increase at pH 3.6; five-fold at pH 4.0, six-fold at pH 10.0); hence, DnaK likely plays a more important role in cellular homeostasis under this kind of stress during long-term stress than GroEL, which has three-fold increase at pH 3.6 and slightly above a one-fold increase at pH 4.0 and 10.0 (Fig. 4B). This is consistent with the behavior of *S. mutans* for which both Hsps are rapidly induced by acid shock (Lemos et al., 2005), but with a more relevant role of DnaK because it was observed that a down-regulated DnaK-*S. mutans* mutant strain was not able to grow in acidic conditions, but a GroEL down-regulated mutant was (Lemos et al., 2007). As well, under alkaline stress, up-regulation of both Hsps is reported for *E. faecalis* and *L. monocytogenes* (Flahaut et al., 1997; Giotis et al., 2008), but the extent of over-expression varies.

Likewise, in *Sii-25124* the induction of these Hsps under long-term exposure to pH 4.0 and pH 10.0 may induce ATR to withstand the lethal acid challenge, as observed by the enhanced survival of *Sii-25124* previously adapted to these conditions. Yet another contribution of DnaK to withstand acid stress lies in maintaining the integrity of PEP-

PTS proteins, even having a role in the biogenesis and stability of the F_1F_0 -ATPase complex, as hypothesized by Lemos et al. (2007).

The PEP-PTS function was also evaluated in *Sii-25124* by the expression of *ptsG*. This gene encodes the PTS glucose permease. The gene *ptsG* was up-regulated, being induced with long-term exposure to acid shock, and slightly induced under long-term exposure to pH 4.0 (Fig. 4B). PEP-PTS was up-regulated in *S. sobrinus*, showing induction at low pH (Martínez et al., 2010), and also when exposed to acid shock after 1 h; the same was also observed in *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* at low pH (Papadimitriou et al., 2007). The behavior of both streptococci resembles that of *Sii-25124*; this induction is likely related to the need to support glycolysis, since this sustained glucose transport during acid stress is associated with the enhanced activity of glycolytic enzymes in other LAB (Marceau et al., 2002). In *Sii-25124*, *ptsG* induction could be explained as a glycolytic flux that increases under acid stress. This may also fulfill the ATP demand of F_1F_0 -ATPase and its role as proton-pump, as well as the supply of other ATP-dependent mechanisms like the chaperone/chaperonin functions of DnaK and GroEL. This relationship would explain our observation, namely the induction of the 4 genes during long-term exposure to lethal acid pH.

The induction of *ptsG* during short-term alkaline stress (Fig. 4A) possibly could be explained as an increased glycolytic flux, resulting from the need to acidify the environment by the lactic acid formed during fermentation, and to offset and withstand the alkaline pH outside the cell. A similar behavior has been observed in oral streptococci, but to enhance amino acid catabolism to contribute to environmental alkalization under acidic conditions (Cotter and Hill, 2003). Under a long-term exposure of *Sii-25124* to alkaline conditions, the induction of *ptsG* was lower than under a short-term exposure, likely because the F_1F_0 -ATPase/synthase function replaces fermentation, enhancing proton uptake and producing ATP by oxidative phosphorylation, thereby contributing to cytoplasmic pH homeostasis. Glycolysis could be maintained if the Δ pH lies within a range that is suitable for the function of glycolytic enzymes, as reported for alkali-tolerant lactobacilli (Sawatari and Yokota, 2007). Another possibility is that glycolytic enzymes are damaged by long-term alkalization, resulting in decreased activity: consequently, when glycolysis cannot be performed, F_1F_0 -ATPase functions as synthase, as in *S. mutans* cells under acidic stress and during starvation, sustaining ATP pools (Sheng and Marquis, 2006).

5. Conclusions

The results of this work contribute to understand the ability of *Sii* to persist in *pozol* dough because of its capacity to withstand alkali and acid stresses.

The wide range of pH values under which *Sii-25124* grows, its alkali and acid tolerance and its ability to develop both, the ATR induced by acid or alkali adaptation and the AITR induced by heat shock, can be interpreted as traits that facilitate its persistence in the niche despite its acidification. In addition, the differences of *Sii* strains isolated from *pozol*, other than *Sii-25124*, in growth and in resistance to acid and alkali stresses would allow it to survive as a species.

Acid and alkali tolerance and the adaptation by induction of ATR or AITR of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* strain 25124 reported in this work would allow this strain to dominate during fermentation. The similarity of growth kinetics and the wide range of acid tolerance among *Sii-25124* and the other *pozol Sii* strains studied, would allow this species to dominate in *pozol* fermentation.

Then results suggest that thermal and pH changes serve as selective conditions, due to the adaptative advantages observed. This could make possible for *Sii* to compete against other LAB during the early fermentation stages and later, contributing to allow it to persist, when its numbers decrease and other LAB become more abundant, even if the pH value drops to the acidic range because of their higher acid tolerance. This is a first attempt to understand the ability of *Sii* to withstand

acid, alkali and thermal stresses, such as those that occur during fermentation.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Rebeca Ramírez for her assistance with the statistical analysis and to Dr. Gloria Díaz-Ruiz for her support. Special thanks to the indigenous Mayan people that shared with us their heritage about this traditional food. Funding: This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México project CB-2009-131615; Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México, México project IN223917; and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México PhD grant 344938.

References

- Abdelgadir, W., Nielsen, D.S., Hamad, S., Jakobsen, M., 2008. A traditional Sudanese fermented camel's milk product, *Gariss*, as a habitat of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*. Int. J. Food Microbiol. 127, 215–219. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2008.07.008>.
- Agati, V., Guyot, J.P., Morlon-Guyot, J., Talamond, P., Hounhouigan, D.J., 1998. Isolation and characterization of new amyolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawè and ogi) from Benin. J. Appl. Microbiol. 85, 512–520. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.853527.x>.
- Ampe, F., ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C., Guyot, J.P., 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation independent methods to investigate traditional fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 65, 5464–5473 PMID: PMC91745.
- Auffray, Y., Lecesne, E., Hartke, A., Boutibonnes, P., 1995. Basic features of the *Streptococcus thermophilus* heat shock response. Curr. Microbiol. 30, 87–91. <https://doi.org/10.1007/BF00294188>.
- Boleij, A., Schaeps, R.M.J., Tjalsma, H., 2009. Association between *Streptococcus bovis* and colon cancer. J. Clin. Microbiol. 47, 516. <https://doi.org/10.1128/JCM.01755-08>.
- Boleij, A., Muytjens, C.M.J., Bukhari, S.I., Cayet, N., Glaser, P., Hermans, P.W.M., Swinkels, D.W., Bolhuis, A., Tjalsma, H., 2011. Novel clues on the specific association of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* with colorectal cancer. J. Infect. Dis. 203, 1101–1109. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq169>.
- Boutibonnes, P., Gillot, B., Auffray, Y., Thammavongs, B., 1991. Heat shock induces thermotolerance and inhibition of lysis in a lysogenic strain of *Lactococcus lactis*. Int. J. Food Microbiol. 14, 1–10. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90031-J](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90031-J).
- Boutibonnes, P., Tranchard, C., Hartke, A., Thammavongs, B., Auffray, Y., 1992. Is thermotolerance correlated to heat-shock protein synthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*? Int. J. Food Microbiol. 16, 227–236. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90083-F](https://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90083-F).
- Bouvet, A., Grimont, F., Collins, M.D., Benaoudia, F., Devine, C., Regnault, B., Grimont, P.A., 1997. *Streptococcus infantarius* sp. nov. related to *Streptococcus bovis* and *Streptococcus equinus*. Adv. Exp. Med. Biol. 418, 393–395. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1825-3_94.
- Correidora, J., Alonso, M.P., Coira, A., Varela, J., 2008. Association between *Streptococcus infantarius* (formerly *S. bovis* II/1) bacteremia and noncolonic cancer. J. Clin. Microbiol. 46, 1570. <https://doi.org/10.1128/JCM.00129-08>.
- Corredoira, J., Alonso, M.P., García-Garrote, F., García-Pais, M.J., Coira, A., Rabuñal, R., Gonzalez-Ramirez, A., Pita, J., Matesanz, M., Velasco, D., López-Álvarez, M.J., Varela, J., 2014. *Streptococcus bovis* group and biliary tract infections: an analysis of 51 cases. Clin. Microbiol. Infect. 20, 405–409. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12333>.
- Cotter, P.D., Hill, C., 2003. Surviving the acid test responses of gram-positive bacteria to low pH. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67, 429–453. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.429-453.2003>.
- Díaz-Ruiz, G., Guyot, J.P., Ruiz-Teran, F., Morlon-Guyot, J., Wachter, C., 2003. Microbial and physiological characterization of weak amyolytic but fast growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in Pozol. Appl. Environ. Microbiol. 69, 4367–4374. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4367-4374.2003>.
- Erbse, A., Mayer, M.P., Bukau, B., 2004. Heat shock proteins and modulation of cellular function. Biochem. Soc. Trans. 32, 617–621.
- Flahaut, S., Hartke, A., Giard, J.C., Auffray, Y., 1997. Alkaline stress response in *Enterococcus faecalis*: adaptation, cross-protection, and changes in protein synthesis. Appl. Environ. Microbiol. 63, 812–814 PMID: PMC168376.
- Gahan, C.G., O' Driscoll, B., Hill, C., 1996. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 62, 3128–3132 PMID: PMC168105.
- Gänzle, M.G., Vermeulen, N., Vogel, R.F., 2007. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. Food Microbiol. 24, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.006>.
- Giotis, E.S., Muthaiyan, A., Blair, I.S., Wilkinson, B.J., McDowell, D.A., 2008. Genomic and proteomic analysis of the alkali-tolerance response (AITR) in *Listeria monocytogenes* 10403S. BMC Microbiol. 8, 102–113. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8>

- 8-102.
- Giotis, E.S., Muthaiyan, A., Natesan, S., Wilkinson, B.J., Blair, I.S., McDowell, D.A., 2010. Transcriptional analysis of alkali shock and alkali adaptation in *Listeria monocytogenes* 10403S. *Foodb. Pathog. Dis.* 7, 1147–1157. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0501>.
- Giraffa, G., 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 215–222. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00183-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00183-1).
- Giraud, E., Brauman, A., Keleke, S., Lelong, B., Raimbault, M., 1991. Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 379–383. <https://doi.org/10.1007/BF00208160>.
- Gotcheva, V., Pandiella, S.S., Angelov, A., Roshkova, Z.G., Webb, C., 2000. Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage boza. *Process Biochem.* 36, 127–130. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00192-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00192-8).
- Halm, M., Lillie, A., Sorensen, A.K., Jakobsen, M., 1993. Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize dough for kenkey production in Ghana. *Int. J. Food Microbiol.* 19, 135–143. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)90179-K](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90179-K).
- Hamza, A.A., El Gaali, E.I., Mahdi, A.A., 2009. Use of the RAPD-PCR fingerprinting and API system for clustering lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese sour milk (Roab). *Afr. J. Biotechnol.* 8, 3399–3404.
- Hayford, A.E., Petersen, A., Vogensen, F.K., Jakobsen, M., 1999. Use of conserved randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fragments and RAPD pattern for characterization of *Lactobacillus fermentum* in Ghanaian fermented maize dough. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3213–3221. PMID: PMC91476.
- Hounhouigan, D.J., Nout, M.J.R., Nago, C.M., Houben, J.H., Rombouts, F.M., 1993. Characterization and frequency distribution of species of lactic acid bacteria involved in the processing of mawé, a fermented maize dough from Benin. *Int. J. Food Sci. Technol.* 18, 279–287. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)90151-6](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90151-6).
- Jans, C., Boleij, A., 2018. The road to infection: host-microbe interactions defining the pathogenicity of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex members. *Front. Microbiol.* 9, 603. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00603>.
- Jans, C., Gerber, A., Bugnard, J., Njage, P.M.K., Lacroix, C., Meile, L., 2012. Novel *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* variants harboring lactose metabolism genes homologous to *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiol.* 31, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.001>.
- Jans, C., Follador, R., Hochstrasser, M., Lacroix, C., Meile, L., Stevens, M.J.A., 2013a. Comparative genome analysis of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* CJ18, an African fermented camel milk isolate with adaptations to dairy environment. *BMC Genom.* 14, 200. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-200>.
- Jans, C., Kaindi, D.W.M., Böck, D., Njage, P.M.K., Kouamé-Sina, S.M., Bonfob, B., Lacroix, C., Meile, L., 2013b. Prevalence and comparison of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* and *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* in raw and fermented dairy products from East and West Africa. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.008>.
- Jans, C., Meile, L., Lacroix, C., Stevens, M.J.A., 2015. Genomics, evolution and molecular epidemiology of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBSEC). *Infect. Genet. Evol.* 33, 419–436. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.09.017>.
- Kaindi, D.W.M., Kogi-Makau, W., Lule, G.N., Kreikemeyer, B., Renault, P., Bonfob, B., Schelling, E., Zinsstag, J., Lacroix, C., Meile, L., Jans, C., Hattendorf, J., 2018. Investigating the association between African spontaneously fermented dairy products, faecal carriage of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* and colorectal adenocarcinoma in Kenya. *Acta Trop.* 178, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.018>.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M.D. (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley, Chichester, England, pp. 115–175. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620310616>.
- Lazarovitch, T., Shango, M., Levine, M., Brusivinsky, R., Akins, R., Hayakawa, K., Lephart, P.R., Sobel, J.D., Kaye, K.S., Marchaim, D., 2013. The relationship between the new taxonomy of *Streptococcus bovis* and its clonality to colon cancer, endocarditis, and biliary disease. *Infection* 41, 329–337. <https://doi.org/10.1007/s15010-012-0314-x>.
- Le Blanc, J.G., Garro, M.S., de Giori, G.S., 2004. Effect of pH on *Lactobacillus fermentum* growth, raffinose removal, α -galactosidase activity and fermentation products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 119–123. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1532-z>.
- Lemos, J.A., Abranches, J., Burne, R.A., 2005. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr. Issues Mol. Biol.* 27, 95–107. PMID: 15580782.
- Lemos, J.A., Luzardo, Y., Burne, R.A., 2007. Physiological effects of forced down-regulation of dnaK and groEL expression in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 189, 1582–1588. <https://doi.org/10.1128/JB.01655-06>.
- Lenz, C.A., Ferstl, C.M., Vogel, R.F., 2010. Sub-lethal stress effect on virulence gene expression in *Enterococcus faecalis*. *Food Microbiol.* 27, 317–326. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.008>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- López, G., 2006. Estudio de la variabilidad microbiológica del pozol mediante PCR-DGGE con el gen *rpoB*. M.Sc. Thesis, Facultad de Química, UNAM, México.
- Lore, A.T., Mbugua, K.S., Wango, H.J., 2005. Enumeration and identification of microflora in suusac, a Kenyan traditional fermented camel milk product. *Lebensm. Wiss. Technol.* 38, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.05.008>.
- Marceau, A., Zagorec, M., Champomier-Vergès, M.C., 2002. Analysis of *Lactobacillus sakei* adaptation to its environment by a proteomic approach. *Sci. Aliments*. 22, 97–105. <https://doi.org/10.3166/sda.22.97-105>.
- Martín-Galiano, A.J., Ferrandiz, M.J., de la Campa, A.G., 2001. The promoter of the operon encoding the F_0F_1 ATPase of *Streptococcus pneumoniae* is inducible by pH. *Mol. Microbiol.* 41, 1327–1338. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02597.x>.
- Martínez, A.R., Abranches, J., Kajfasz, J.K., Lemos, J.A., 2010. Characterization of the *Streptococcus sobrinus* acid-stress response by interspecies microarrays and proteomics. *Mol. Oral Microbiol.* 25, 331–342. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2010.00580.x>.
- Messens, W., De Vuyst, L., 2002. Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs. *Int. J. Food Microbiol.* 72, 31–43. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00611-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00611-0).
- Mugula, J.K., Nnko, S.A.M., Narvhus, J.A., Sørhaug, T., 2003. Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 187–199. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00141-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00141-1).
- Mukisa, I.M., Porcellato, D., Byaruhanga, Y.B., Muyanja, C.M.B.K., Rudi, K., Langsrud, T., Naryhus, J.A., 2012. The dominant microbial community associated with fermentation of Obushera (sorghum and millet beverages) determined by culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.023>.
- Muyzer, G., De Wall, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling complex microbial populations by denaturing gradient electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700. PMID: PMC202176.
- Nascimento, M.M., Lemos, J.A.C., Abranches, J., Gonçalves, R.B., Burne, R.A., 2004. Adaptive acid tolerance response of *Streptococcus sobrinus*. *J. Bacteriol.* 186, 6383–6390. <https://doi.org/10.1128/JB.186.19.6383-6390.2004>.
- Nuraida, L., Wacher, C., Owens, J.D., 1995. Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 567–571. <https://doi.org/10.1007/BF00286375>.
- Olasupo, N.A., Olukoya, D.K., Odufa, S.A., 1996. Studies on local strains of amylolytic *Lactobacillus* from Nigerian fermented food. *Nahrung* 40, 44–46. <https://doi.org/10.1002/food.19960400113>.
- Omemu, A.M., Oyewole, O.B., Bankole, M.O., 2007. Significance of yeasts in the fermentation of maize for ogi production. *Food Microbiol.* 24, 571–576. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.01.006>.
- Pacini, F., Cariolato, D., Andrighetto, C., Lombardi, A., 2006. Occurrence of *Streptococcus macedonicus* in Italian cheeses. *FEMS Microbiol. Lett.* 261, 69–73. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00330.x>.
- Papadimitriou, K., Pratsinis, H., Nebe-von-Caron, G., Kletsas, D., Tsakalidou, E., 2007. Acid tolerance of *Streptococcus macedonicus* as assessed by flow cytometry and single-cell sorting. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 465–476. <https://doi.org/10.1128/AEM.01244-06>.
- Petrova, P., Emanuilova, M., Petrov, K., 2010. Amylolytic *lactobacillus* strains from Bulgarian fermented beverage boza. *Z. Naturforsch. C Biosci.* 65, 218–224. <https://doi.org/10.1515/znc-2010-3-409>.
- Poyart, C., Quesne, G., Trieu-Cuot, P., 2002. Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences: reclassification of '*Streptococcus infantarius* subsp. *coli*' as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and *Streptococcus bovis* biotype II.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1247–1255. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-4-1247>.
- Rashid, M.H., Togo, K., Ueda, M., Miyamoto, T., 2007. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented milk 'Dahi' in Bangladesh. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 125–133. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9201-x>.
- Renye Jr, J.A., Somkuti, G.A., Van Hekken, D.L., Guerrero-Prieto, V.M., 2011. Short communication: characterization of microflora in Mexican Chihuahua cheese. *J. Dairy Sci.* 94, 3311–3315. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4177>.
- Rince, A., Flahaut, S., Auffray, Y., 2000. Identification of general stress genes in *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 87–91. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00180-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00180-X).
- Rowbury, R.J., Goodson, M., Humphrey, T.J., 1993. Novel acid sensitivity induced in *Escherichia coli* at alkaline pH. *Lett. Appl. Microbiol.* 16, 223–227. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1993.tb01403.x>.
- Sawatari, Y., Yokota, A., 2007. Diversity and mechanism of alkali tolerance in lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3909–3915. <https://doi.org/10.1128/AEM.01367-07>.
- Sheng, J., Marquis, R.E., 2006. Enhanced acid resistance of oral streptococci at lethal pH values associated with acid-tolerance catabolism and with ATP synthase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 262, 93–98. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00374.x>.
- Tsakalidou, E., Zoidou, E., Pot, B., Wassill, L., Ludwig, W., Devriese, L.A., Kalantzopoulos, G., Schleifer, K.H., Kersters, K., 1998. Identification of streptococci from Greek Kasser cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 519–527. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-2-519>.
- Wullschlegel, S., Lacroix, C., Bonfob, B., Sissoko-Thiam, A., Hugenschmidt, S., Romanens, E., Baumgartner, S., Traoré, I., Yaffee, M., Jansm, C., Meile, L., 2013. Analysis of lactic acid bacteria communities and their sensorial variations in a spontaneously fermented dairy product (Malian fène) by applying a cultivation/genotype-based binary model. *Int. Dairy J.* 29, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.08.001>.
- Zotta, T., Asterinou, K., Rossano, R., Ricciardi, A., Varcamonti, M., Parente, E., 2009. Effect of inactivation of stress response regulators on the growth and survival of *Streptococcus thermophilus* Sf39. *Int. J. Food Microbiol.* 129, 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.024>.