



UNIVERSIDAD VERACRUZANA
INSTITUTO DE CIENCIAS BASICAS



Estudio del potencial probiótico de la cepa de
Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides BL-UV04

Tesis que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Alimentarias

Presenta:

QFB. Ana Lilia Téllez Mújica

Director de Tesis

Dr. Micloth López de Castillo Lozano

Xalapa, Veracruz

2017



Universidad Veracruzana



La presente tesis titulada

**Estudio del potencial probiótico de *Leuconostoc mesenteroides*
ssp mesenteroides BL-UV04**

Realizada por la

Q.F.B. ANA LILIA TELLEZ MUJICA

Ha sido aprobada por el comité de evaluación de tesis, y aceptada como
requisito parcial para la obtención del grado de:

Maestro en Ciencias Alimentarias

Otorgando su autorización como jurado para ser presentada y defendida
oralmente el 22 de septiembre de 2017.

Dra. Rosa Isela Guzmán Gerónimo

Dr. Oscar García Barradas

Dr. Luis Gilberto Bermúdez Humaran

DEDICATORIA

*Al que pone en mí tanto el querer como el hacer por su buena
voluntad.*

A Agustín, Rodolfo, Eliud, Katy, Paloma, Katya y Leonel.

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por la beca 712856/590534.

A la Universidad Veracruzana y a la maestría en ciencias alimentarias, así como al cuerpo académico por la formación que nos brinda.

Agradezco las facilidades de la Dra. Yolanda Cocotle Ronzón para trabajar en el Laboratorio 5 de la Facultad de Ciencias Químicas de esta ciudad, pero sobre todo por su tiempo y trato personal. De igual forma a la Dra. Nieves del Socorro por el apoyo a mi trabajo y persona. A la I. en A. Monserrath González por su colaboración y a todos los compañeros que trabajamos en dicho laboratorio.

Al Dr. Micloth López del Castillo Lozano y la Dra. Carmen Bulbarela Sampieri, fue un placer trabajar con ustedes, su guía, su tiempo y compromiso lo valoro en gran manera.

A la IQ. Alejandra Escartin Torres. Que placer conocerte y compartir esta aventura contigo.

Jesús y familia, todo lo bueno que hay o que puede haber en mi es por ustedes.

ÍNDICE

1.Introducción.....	- 1 -
2.Marco Teórico	- 2 -
2.1 Microbiota intestinal.....	- 2 -
2.2 Bacterias Ácido Lácticas (BALs)	- 4 -
2.2.1 Clasificación de las bacterias ácido lácticas.....	- 5 -
2.2.2 Genero <i>Leuconostoc</i>	- 8 -
2.3 Probióticos.....	- 9 -
2.3.1 Desarrollo histórico.....	- 9 -
2.3.2 Características de los probióticos.....	- 10 -
2.3.3 Mecanismos de acción de los probióticos	- 12 -
2.3.4 Probióticos como alimento funcional	- 15 -
2.3.5 Aplicaciones clínicas reportadas	- 17 -
2.3.7 Contras del uso de probióticos	- 19 -
3.Planteamiento del Problema	- 21 -
4.Objetivos e hipótesis	- 22 -
4.1 Objetivo General	- 22 -
4.2 Objetivos Específicos	- 22 -
4.3 Hipótesis.....	- 22 -
5. Metodología.....	- 23 -
5.1 Microorganismo	- 23 -
5.2 Cinética de crecimiento bacteriano	- 24 -
5.3 Identificación bioquímica de <i>L. mesenteroides</i> BL-UV04	- 25 -
5.4 Resistencia a pH	- 26 -

5.5 Resistencia a sales biliares	- 26 -
5.6 Actividad de la enzima hidrolasa de sales biliares	- 26 -
5.7 Resistencia a antibióticos	- 26 -
5.8 Resistencia a vancomicina	- 27 -
5.9 Actividad antagónica	- 28 -
5.10 Producción de bacteriocinas	- 29 -
6. Resultados	- 30 -
6.1 Cinética de crecimiento bacteriano	- 30 -
6.2 Identificación bioquímica de <i>L. mesenteroides</i> BL-UV04	- 31 -
6.3 Resistencia a pH ácido.....	- 33 -
6.4 Resistencia a sales biliares	- 34 -
6.5 Actividad de la enzima hidrolasa de sales biliares	- 35 -
6.6 Resistencia a antibióticos	- 36 -
6.7 Resistencia a vancomicina	- 37 -
6.8 Actividad antagónica	- 38 -
6.9 Producción de bacteriocinas	- 39 -
7. Conclusiones	- 41 -
8. Recomendaciones.....	- 42 -
9. Bibliografía	- 43 -
10. Anexo	- 47 -
10.1 Medios de cultivo.....	- 47 -
10.1.1 Caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe).....	- 47 -
10.1. 2 Medio Base Piloncillo	- 47 -
10.1.3 Medio Base Glucosa	- 48 -

10.1.4 Agar Müller-Hinton.....	- 48 -
10.1.4 Medio API-50 CHL	- 49 -
10.2 Soluciones	- 49 -
10.2.1 Buffer PBS.....	- 49 -
10.3 Tablas de Referencia.....	- 50 -
10.3.1 Componentes de la batería API 50-CHL	- 50 -
10.3.1Tabla de Sensibilidad a antibióticos.	- 51 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta Embden Meyerhof Parnas.	- 6 -
Figura 2. Ruta de las Pentosas Fosfato.	- 7 -
Figura 3. Criterios de aceptación para bacterias probióticas.	- 11 -
Figura 4. Resumen de características de los Probióticos.	- 12 -
Figura 5. Mecanismos de acción de los probióticos.	- 14 -
Figura 6. Mecanismo de acción de los probióticos.	- 14 -
Figura 7. Desarrollo de la metodología.	- 23 -
Figura 8. Diluciones seriadas para el conteo de células viables.	- 25 -
Figura 9. Diagrama de sembrado.	- 28 -
Figura 10. Cinética de crecimiento <i>L. mesenteroides</i> BL-UV04.	- 30 -
Figura 11. Efecto del crecimiento de <i>L. mesenteroides</i> BL-UV04 sobre el pH del medio.	- 31 -
Figura 12. Patrón de fermentación de <i>L. mesenteroides</i> BL-UV04 mediante la batería API 50-CHL.	- 32 -
Figura 15. Prueba de hidrólisis de sales biliares.	- 36 -
Figura 16. Resistencia a antibióticos.	- 37 -
Figura 18. Actividad antagonista de <i>L. mesenteroides</i> BL-UV04.	- 39 -
Figura 19. Producción de bacteriocinas por <i>L. mesenteroides</i> BL-UV04.	- 40 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de bacterias más usadas en preparados probióticos.	- 15 -
Tabla 2. Lista de cepas probióticas más usados en preparados comerciales..	- 16 -
Tabla 3. Lista de antibióticos	- 27 -
Tabla 4. Resultados pruebas bioquímicas API 50-CHL	- 33 -
Tabla. 5 Medio MRS.....	- 47 -
Tabla. 6 Medio Base (MBP)	- 47 -
Tabla. 7Medio Base (MBG)	- 48 -
Tabla. 8 Medio Mueller_Hinton.....	- 48 -
Tabla. 9 Medio para pruebas bioquímicas de bacterias ácido láctico.	- 49 -
Tabla. 10 PBS	- 49 -
Tabla. 11 Pruebas bioquímicas de la batería API50-CHL	- 51 -
Tabla. 12 Rango de sensibilidad de antibióticos	- 51 -

RESUMEN

En la actualidad los alimentos funcionales que contienen probióticos son los más buscados por el consumidor, esto es debido al aumento de enfermedades relacionadas con algún tipo de disbiosis de la microbiota intestinal. En las últimas décadas muchos estudios clínicos han comprobado la efectividad de los probióticos para prevenir o mejorar algunas enfermedades. Debido a esto y a la amplia variedad de bacterias que podemos encontrar en el ecosistema es que este campo de estudio sigue siendo de gran importancia.

En el presente trabajo se han analizado algunos de los criterios de evaluación del potencial probiótico de la cepa *L. mesenteroides* BL-UV04. Esta cepa fue aislada en el Laboratorio 34 de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana. Su aislamiento se realizó a partir de frutas de la región. Es una bacteria ácido láctica (BAL) productora de exopolisacáridos a partir de sacarosa.

La bacteria fue sometida a pruebas de resistencia a pH, Sales biliares y antibióticos, además de pruebas de antagonismo bacteriano. Los resultados demuestran que la cepa de *L. mesenteroides* BL-UV04 es resistente a las sales biliares así como a la agresión que ocasiona el pH 2.0 del estómago. Estas observaciones permiten inferir que la bacteria tiene la capacidad de llegar viva al intestino de un posible huésped. La cepa también fue capaz de resistir el ataque de diversos antibióticos para bacterias Gram positivas, siendo solamente sensible a la Eritromicina.

Las pruebas de actividad antagonista no revelaron capacidad para inhibir la proliferación de otras bacterias patógenas, por lo cual se infiere que la bacteria carece de actividad antimicrobiana, sin embargo, las cualidades antes mencionadas dejan pauta para que esta cepa siga en estudio para determinar su potencial probiótico, por lo que también se propone realizar algunas pruebas más de función fisiológica.

SUMMARY

Currently functional foods containing probiotics are the most sought after by the consumer, this is due to the increase of diseases related to some type of intestinal microbiota dysbiosis. In the last decades many clinical studies have tested the effectiveness of probiotics to prevent or ameliorate some diseases. Because of this and the wide variety of bacteria that we can find in the ecosystem is that this type of study remains of great importance.

In the present work we have analyzed some of the criteria for evaluating the probiotic potential of *Leuconostoc mesenteroides spp mesenteroides* BL-UV04. This strain was isolated in Laboratory 34 of the faculty of chemical sciences of the University Veracruzana. Its isolation was made from fruits of the region. It is a lactic acid bacterium producing exopolysaccharides from sucrose.

Leuconostoc mesenteroides spp mesenteroides BL-UV04 is resistant to bile salts as well as to the aggression occasioned by the pH 2.0 of the stomach. With these results we can infer that the bacterium has the ability to reach the intestine of a possible host alive. The strain was also able to resist the attack of various antibiotics for Gram positive bacteria, being only sensitive to Erythromycin.

The antagonistic activity tests do not reveal the capacity to inhibit the proliferation of other pathogenic bacteria, therefore, we can infer that the bacterium lacks antimicrobial activity, however, the qualities mentioned above leave a guideline for this strain to continue being studied to determine its probiotic potential, so it is also proposed to perform some more physiological function tests.

1. INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos que confieren un beneficio a la salud del huésped cuando se administran en cantidades adecuadas (FAO/WHO 2001). Los productos alimenticios elaborados con bacterias probióticas son bien aceptados por el consumidor y desde hace mucho tiempo está familiarizado con algunos de ellos, tales son el caso del yogurt y el queso.

Hasta el momento se ha estudiado como los probióticos pueden ayudar en el peristaltismo intestinal y se les atribuyen potenciales resultados en el tratamiento de la diarrea del viajero y en varios padecimientos a nivel gastrointestinal, actualmente se estudia las mejorías que su consumo puede traer a pacientes propensos a la diabetes, a la hipertensión y hasta en cáncer de colon, entre otros.

Las Bacterias Acido Lácticas (BALs) son los probióticos por excelencia, estas bacterias tienen la capacidad como su nombre lo dice de fermentar los sustratos de carbono a ácido láctico, aunque también pueden producir ácido acético, etanol y dióxido de carbono, pero esto puede depender de sus condiciones nutricionales y de manejo. A estos productos finales es que las BALs deben sus usos tecnológicos, tales como, la conservación de alimentos, la producción de olores y también la de sabores.

El uso de estas bacterias con fines tecnológicos es conocido y dominado desde tiempos remotos, sin embargo, sus funciones han pasado de ser meramente tecnológicas a nutricionales y funcionales. La búsqueda del consumidor por alimentos que además de ser agradables sean adecuados nutricional y físicamente para ellos demanda la caracterización y valoración del carácter probiótico de nuevas cepas que brinden estos beneficios.

Por tal motivo en el presente trabajo se estudia el potencial probiótico de la cepa de *L. mesenteroides* BL-UV04, una BAL productora además de exopolisacáridos (EPS), aislada en el Laboratorio 34 de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana, campus Xalapa.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Microbiota intestinal

El tracto gastrointestinal humano contiene una enorme variedad de bacterias aerobias y anaerobias que forman un complejo ecosistema. La concentración de la microbiota humana es aproximadamente de 10^{12} UFC/g (Gary *et al.*; 1986). Se estima que su composición comprende *Bacteroides* 37%, *Clostridium leptum* 16%, *Eubacterium* 14%, *Bifidobacterium* 0.7%, *Enterobacterias* 0.7%, *Lactobacilos* 0.6% y un 30% sin identificar (Guarner *et al.*, 2003).

En el jugo gástrico hay una concentración pobre de bacterias ya que muy pocas son capaces de resistir el pH ácido de este; sin embargo, el contenido bacteriano va aumentando a lo largo del intestino delgado (Quinto *et al.*, 2014). Iniciando con una concentración de 10^4 UFC/L en el duodeno y alcanzando hasta 10^7 UFC/mL en el íleon. En el colon la población es mucho mayor de 10^{11} hasta 10^{13} UFC/mL, esto es debido al arrastre de bacterias generado por la motilidad del intestino (Guarner *et al.*, 2003).

Si bien para el hospedador la microbiota no es indispensable para vivir, estudios realizados en animales libres de gérmenes evidencian las ventajas de desarrollar una microbiota adecuada, por ejemplo, el control del colesterol sérico, proliferación del epitelio intestinal, ritmo normal del peristaltismo y una generosa producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Nyangale *et al.*, 2012).

Estos AGCC pueden ser el ácido fórmico, acético, propiónico, butírico y láctico, los cuáles se producen por el metabolismo anaeróbico de los carbohidratos, y son capaces de disminuir el pH del ambiente. La forma en que estos inhiben el crecimiento bacteriano se debe a que son capaces de atravesar las membranas plasmáticas de las células, el ambiente alcalino de estas provoca una disociación de los ácidos y entonces acidifican el citoplasma, y por otro lado el anión ácido fomenta un estrés osmótico (Gillor *et al.*, 2008)

La microbiota intestinal realiza tres tipos de funciones: Nutrición-metabolismo, Protección y efectos tróficos. En cuanto al tipo metabólico y de nutrición, la microbiota es capaz de fermentar los residuos de la dieta no digeribles y el moco que se produce por el epitelio intestinal, recupera energía metabólica gracias a la producción de AGCC y, además sintetiza vitamina K y absorbe iones Ca, Fe y Mg (Guarner *et al.*, 2003).

La función protectora se debe a que los microorganismos que conforman la microbiota se adhieren a las paredes del epitelio impidiendo que microorganismos patógenos puedan implantarse, este mecanismo se denomina “efecto barrera”. Las funciones tróficas de la microbiota intestinal son las de estimular la proliferación y diferenciación celular del epitelio intestinal, es decir ayuda a que el huésped mejore la respuesta inmune innata (Guarner *et al.*, 2003).

La inmunidad innata es la habilidad del organismo para contrarrestar el ataque de agentes externos. La falta de esta respuesta pone en riesgo la salud del huésped. Desde esta perspectiva el sistema inmune recibe la información que se da entre el huésped y el medio ambiente. Muchos estudios revelan que las interacciones más fuertes entre los microorganismos y el huésped comienzan a partir del nacimiento, sin embargo, también se ha observado en distintos casos de embarazos normales una inmunoestimulación prenatal (Patel *et al.*, 2015).

En general la microbiota de un individuo y otro es diferente al igual que lo es nuestra genética, sin embargo, hay otros factores por los que puede variar la microbiota de una población a otra, por ejemplo, la ubicación geográfica, el tipo de dieta, la forma de nacimiento, el uso de antibióticos y el consumo de probióticos, prebióticos o simbióticos. La ubicación geográfica y el tipo de dieta van muy de la mano ya que en zonas donde las dietas tienen un mayor contenido de fibra, las bacterias de la microbiota intestinal se ven más favorecidas pues tienen más sustratos disponibles para realizar la fermentación (Scott *et al.*, 2013).

En cuanto al consumo de antibióticos por desgracia, estos no son capaces de discriminar entre bacterias benéficas y bacterias patógenas, por lo que su ingesta siempre traerá como consecuencia daños a la microbiota intestinal, es por eso que

ahora es más frecuente el uso de probióticos para tratar de contrarrestar el daño (Scott *et al.*, 2013).

Otros factores, además de los antibióticos que pueden perjudicar el funcionamiento de la microbiota intestinal son el consumo excesivo de alcohol, alimentos altos en grasa, el abuso de carbohidratos, la comida rápida, el estrés y la exposición a toxinas, etc., (Patel *et al.*, 2015). El término usado para referirnos a las alteraciones de la microbiota intestinal es conocido como disbiosis (Logan *et al.*, 2016).

La disbiosis puede traer como resultado una amenaza a la simbiosis que existe con el huésped, involucra la pérdida de microorganismos benéficos y aumenta la probabilidad de la expansión de los microorganismos perjudiciales. Esto trae como consecuencia el desarrollo de algunas enfermedades alérgicas, cardiometabólicas, inflamación intestinal, cáncer de colon y por supuesto infecciones por microorganismo patógenos (Logan *et al.*, 2016).

2.2 Bacterias Ácido Lácticas (BALs)

Son un grupo de bacterias relacionadas que producen ácido láctico como el principal metabolito o único producto de fermentación; son microorganismos nutricionalmente exigentes los cuales son capaces de hidrolizar péptidos de la leche. Además de producir el ácido láctico, las bacterias acidificantes, contribuyen al sabor, aroma, textura y el valor nutricional de alimentos fermentados, algunas son capaces de producir EPS y también pueden modificar proteínas, lo anterior debido a su actividad metabólica sobre proteínas, azúcares y lípidos, contribuyendo así a la digestibilidad de alimentos y preservación del producto final (Burn *et al.*, 2003).

Las BALs tienen varios usos tecnológicos, como: la formación de sabores, la inhibición de organismos patógenos, la gelificación de la leche, la reducción del contenido de lactosa, formación de aromas, proteólisis en la maduración de quesos, y también son muy usadas como probióticos (Arribas, 2009).

Los EPS son polisacáridos de cadena larga consistentes de ramificaciones de unidades repetidas de carbohidratos; que en su mayoría son glucosa, galactosa y

ramnosa en diferentes proporciones. Estos EPS son ampliamente utilizados como geles, emulsificantes y suspensiones estabilizantes; otro beneficio, aunque este de tipo fisiológico, es en la adherencia de bacterias probióticas ya que estos apoyan a resistir la agresión del tracto gastrointestinal. Algunos de estos EPS tienen efectos antitumorales, anti-inflamatorio, efectos inmunoestimulantes y la facilidad de disminuir los niveles de colesterol en sangre. (Parra, 2010).

2.2.1 Clasificación de las bacterias ácido lácticas

Según la ruta de fermentación que realicen pueden clasificarse en homofermentativas o heterofermentativas y dependiendo de la temperatura de crecimiento en mesófilas o termófilas. Las bacterias homofermentativas siguen la ruta de fermentación Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) (Figura 1), que da como principal producto el ácido láctico, con un rendimiento de hasta el 85% a partir de glucosa.

Las bacterias heterofermentativas no siguen la ruta EMP ya que carecen de las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa por lo que deben seguir la ruta de las pentosas fosfato (Figura 1), en esta ruta no solo se genera ácido láctico sino también etanol o acetato y dióxido de carbono, por lo que la producción de ácido láctico es solo del 50%. Estas son muy empleadas a nivel tecnológico debido a que sus productos finales le confieren a los alimentos distintos aspectos, consistencias, aromas, etc.

De acuerdo a su temperatura de crecimiento las bacterias que crecen en rangos de 20–25 °C se denominan mesófilas y las bacterias que tienen su temperatura óptima de crecimiento entre los 40–45°C son llamadas termófilas (Parra, 2010).

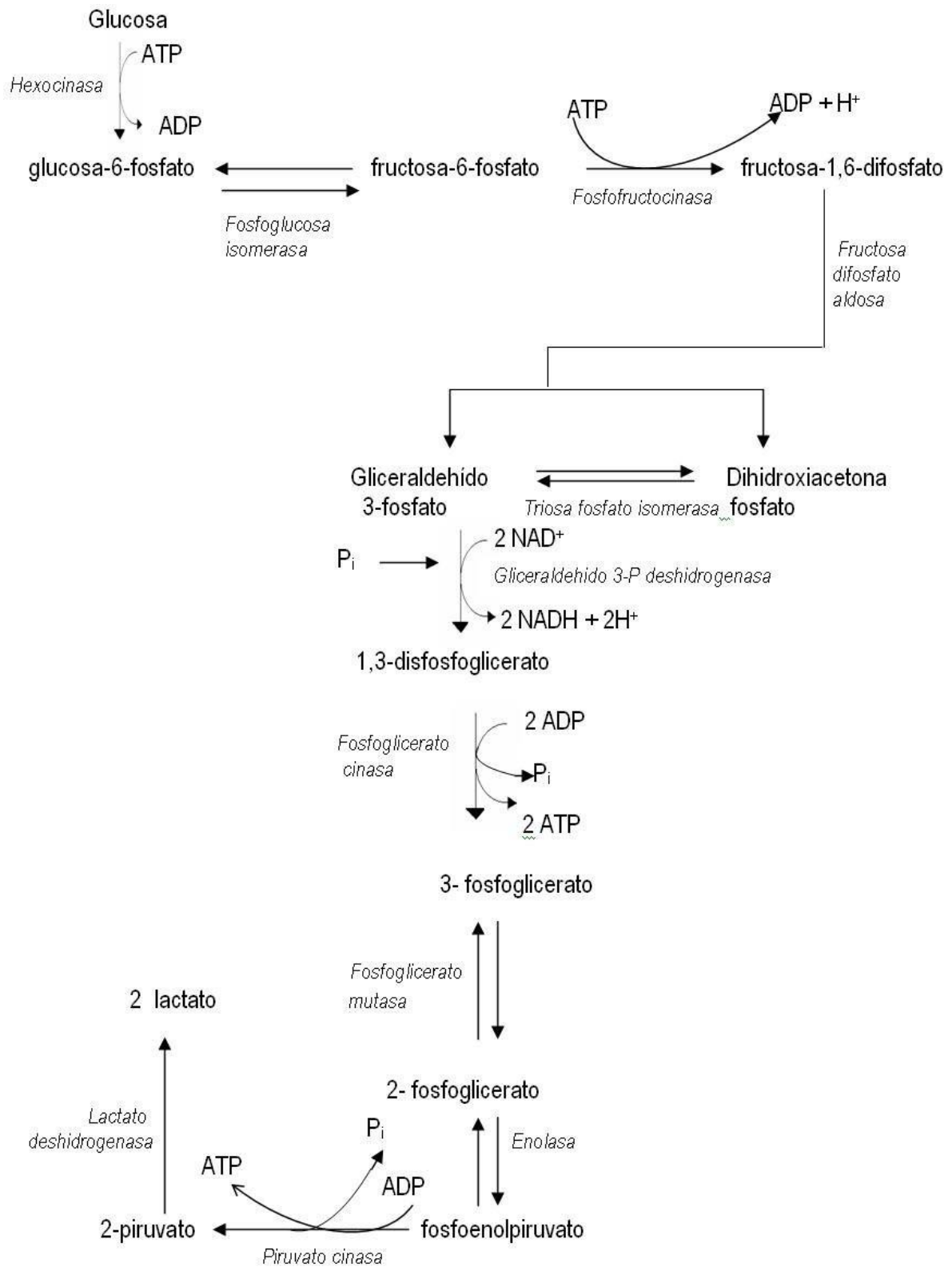


Figura 1. Ruta Embden Meyerhof Parnas.

Tomado de Ortiz-Balderas, M. (2006).

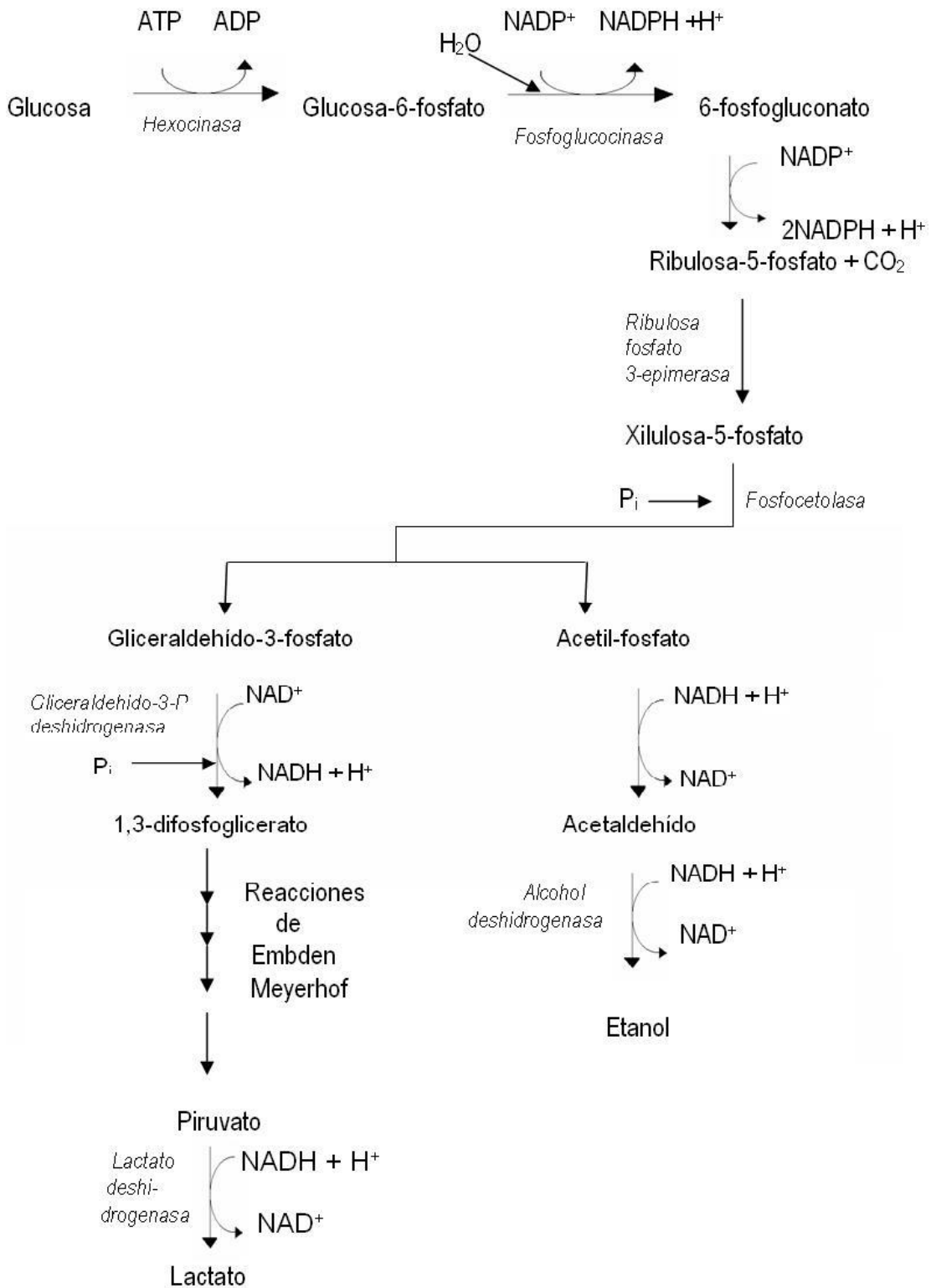


Figura 2. Ruta de las Pentosas Fosfato.
Tomado de Ortiz-Balderas, M. (2006).

2.2.2 Genero *Leuconostoc*

Las cepas de *Leuconostoc* son no móviles, no formadoras de esporas, Gram positivas, catalasa negativa y se agrupan formando pequeñas cadenas. Son bacterias heterofermentativas capaces de producir CO₂, lactato, acetato y etanol. Anaerobias facultativas y mesofílicas.

Se pueden encontrar en diferentes ambientes, sin embargo, es común aislarlas de vegetales y de raíces, pero pueden adaptarse a diversos medios, se encuentran de forma abundante en productos lácteos aunque esto puede deberse a contaminaciones cruzadas en la ordeña o por mala pasteurización.

Estas cepas son muy empleadas en productos de consumo diario como quesos, leches fermentadas, y cárnicos, esto ya que además de que prolongan la vida de anaquel por el proceso de acidificación que generan también porque producen olores, sabores y sobre todo texturas.

Para su crecimiento no requiere de medios selectivos, como la mayoría de BALs puede crecer en medio MRS, sin embargo, es más común el empleo de medios modificados para obtener resultados más específicos, así, en medios enriquecidos con sacarosa nos ayuda a aumentar la velocidad de crecimiento, y la producción de distintos productos como lo son los dextranos. Además se les suele añadir vancomicina para evitar posibles contaminaciones.

La supervivencia de esta cepa en condiciones de estrés por disminución de pH se ve muy afectada, creciendo adecuadamente en pH que va de 5.4 al neutro. Por lo que también es común agregar a los medios soluciones buffers que ayuden a mantenerlo un poco más estable a pesar de los ácidos que la propia bacteria produce durante su crecimiento (Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004).

Algunas cepas del género *Leuconostoc* han sido empleadas también como probiótico para dar funcionalidad a alimentos, ya que demostraron tener buenos efectos en diarreas de infantes y actividad contra la influenza, esto a pesar de que este mismo género ha reportado varios casos de infecciones nosocomiales, sin

embargo, no representa ningún tipo de riesgo su consumo en pacientes no inmunocomprometidos (Drider & Rivera, 2016).

2.3 Probióticos

2.3.1 Desarrollo histórico

Elie Metchnikoff en 1906 fue el primer científico en asegurar que algunos “microbios” tenían la capacidad de formar ácido láctico en el intestino de animales. A este fenómeno atribuyó beneficios en la salud, desarrollo del sistema inmunológico e incluso la prolongación de la vida (Gordon, 2008). Esta teoría la inmortalizó en su libro: *The prolongation of life; optimistic studies*. En este libro Metchnikoff promovía el consumo de alimentos que tuvieran bacterias formadoras de ácido láctico asegurando que estas evitaban la putrefacción de los alimentos y que podrían hacer lo mismo una vez alojadas en el intestino (Metchnikoff, 1906).

Este científico ruso fue el primero en relacionar el funcionamiento de la microbiota intestinal con el sistema inmunológico y el consumo de alimentos que contuvieran microorganismos, pues ya sea que fueran patógenos o benéficos, estos afectarían de alguna forma al huésped (Metchnikoff, 1906).

En 1965 Lilly y Stillwell fueron los primeros en emplear el término probiótico que significa en favor de la vida. Y se consideró que estos estimulaban el crecimiento de otros microorganismos. Para 1989 la definición fue ampliada por Fuller, quien postuló que el microorganismo probiótico debería emplearse vivo, e indujo la teoría de que estos producían beneficios al huésped (Tormo, 2006).

En la actualidad la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (WHO) reconocen la definición de Guarner y Schaafsma de 1998, la cual señala que los probióticos son microorganismos vivos que confieren un beneficio a la salud del huésped cuando se administran en cantidades adecuadas (FAO/WHO 2001).

2.3.2 Características de los probióticos

Para que una bacteria, un hongo o una levadura sea considerada probiótica, debe cumplir con ciertos criterios de evaluación, los cuales son innatos para estos microorganismos y a su vez les brindan la capacidad de provocar mejoras a la salud de su hospedador.

1. El primer criterio con el que deben cumplir los microorganismos es el de seguridad. Su consumo no debe perjudicar de ninguna forma al consumidor, en el caso de las BALs, estas son generalmente reconocidas como seguras (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Federación de Alimentación y Medicamentos (FDA). Sin embargo, esto no garantiza que todas las bacterias de este grupo sean probióticas.
2. El segundo criterio de evaluación es el tecnológico, es decir, los microorganismos deben soportar el manejo necesario para ser incorporados en una matriz alimentaria, así como cumplir con tiempos adecuados de vida de anaquel.
3. Un tercer criterio de evaluación es el funcional, en este caso, los microorganismos deben tener la capacidad de resistir las barreras del hospedador y poder llegar vivos al intestino del huésped. Estas barreras son el pH bajo del intestino, la presencia de sales biliares y el jugo pancreático.
4. A continuación en los siguientes puntos se plantean características que garantizan el cumplimiento del cuarto criterio que es el fisiológico, con el cual se puede evaluar la capacidad del microorganismo para aportar un beneficio a su hospedador. En primer lugar podemos hablar de la capacidad de producir sustancias antimicrobianas. Algunas bacterias producen bacteriocinas, que son sustancias consideradas antibióticos naturales ya que pueden inhibir el crecimiento de otras bacterias. También pueden ser capaces de producir AGCC que además de modificar el ambiente intestinal también inhiben el crecimiento de algunos patógenos.

5. Resistencia a los antibióticos, esta cualidad es necesaria para que las bacterias probióticas tengan la posibilidad de colonizar el intestino cuando ha sufrido daños por el consumo de estos medicamentos.
6. Características antagonistas contra bacterias patógenas. Es decir, debe ser capaz de competir por sitios de adhesión en el epitelio o incluso inhibir la proliferación de bacterias patógenas para que estas no dañen al huésped.
7. Capacidad de adhesión celular. Para ellos deben de resistir las mucinas producidas en el intestino.
8. Estimular la respuesta inmune. Esto debido a la estrecha relación que existe entre el sistema digestivo y el sistema inmunológico (Tripathi & Giri, 2014)

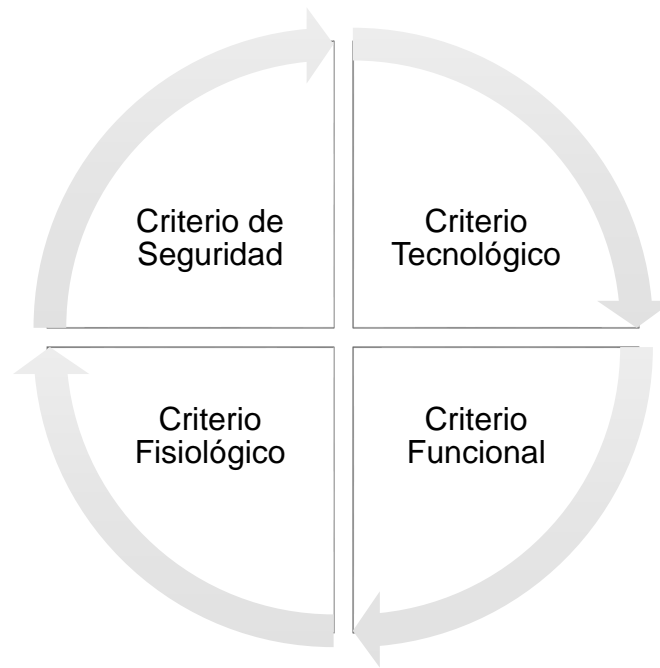


Figura 3. Criterios de aceptación para bacterias probióticas.



Figura 4. Resumen de características de los Probióticos.

Modificado de Saarela *et al.*, 2000.

2.3.3 Mecanismos de acción de los probióticos

Los microorganismos probióticos tienen diversas formas de actuar en el ambiente gastrointestinal de su hospedador. A continuación se describirán estos mecanismos (World Gastroenterology Organisation, 2011).

1. Los probióticos tienen capacidad de generar la llamada inhibición competitiva, esta se debe a que este tipo de bacterias tienen una buena capacidad para adherirse a las paredes del epitelio intestinal de su huésped y esto genera el efecto barrera que impide que otros agentes externos puedan translocarse en el epitelio (Figura 5).
2. Cuando se han instalado en el intestino las bacterias probióticas comienzan a fermentar los sustratos no digeribles de la dieta de su huésped, aquí comienza la producción de lactato lo que genera una disminución del pH del

medio, esto genera un ambiente hostil para el microorganismo que pudieran ser ingeridos por el huésped (Figura 5).

3. Los probióticos estimulan el sistema inmunológico. Esto se debe a que activan a los macrófagos por lo tanto aumenta la presentación de antígenos a los linfocitos B y estos incrementan la producción de inmunoglobulina A de forma local y sistémica (Figura 5).
4. Dependiendo el género y especie de la bacteria probiótica esta tendrá la capacidad de generar sustancias que inhiban el crecimiento de otras bacterias, estas son llamadas bacteriocinas conocidas en algunos casos también como lantibióticos (Figura 5).
5. Estimulan la producción de mucinas las cuales dificultan que agentes externos puedan adherirse a las paredes del epitelio (Figura 5).
6. Estimulan la actividad enzimática, en la actualidad esta característica los hace ser considerados también como organismos con capacidad antioxidante (Figura 6).
7. Estimulan la transformación de colesterol en sales biliares, ya que estos son capaces de hidrolizar las sales biliares y estas al ser hidrolizadas son eliminadas en las heces fecales, por lo tanto se da el mensaje de que más colesterol sea transformado en sales biliares (Figura 6).
8. Ayudan a modular la carcinogénesis evitando que las criptas aberrantes del colon aumenten tamaño y lleguen a convertirse en tumores, aunque este es solo uno de los mecanismos propuestos para esta actividad (Figura 6).

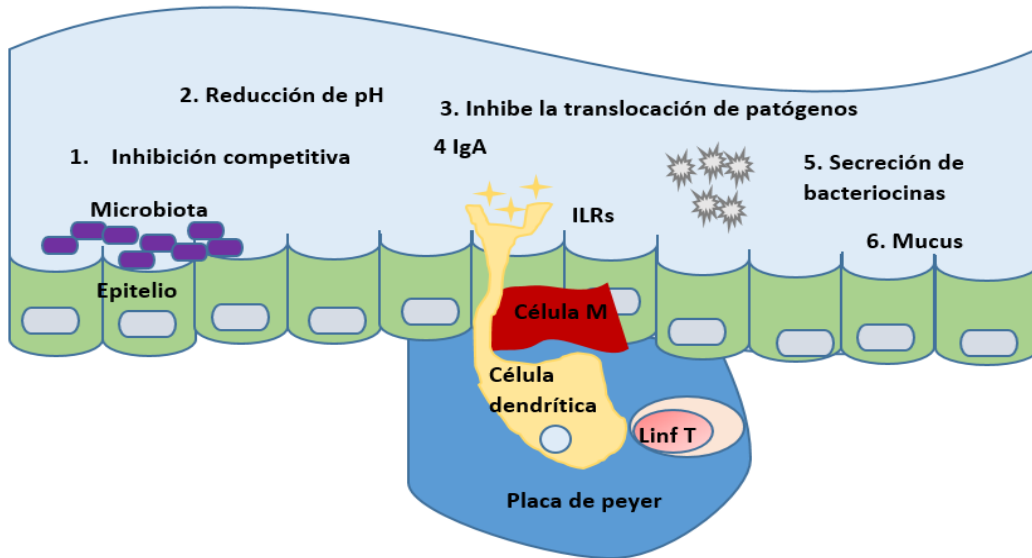


Figura 5. Mecanismos de acción de los probióticos.

(Modificado de "Microbiota, Probióticos, Prebióticos y Simbióticos", 2017).

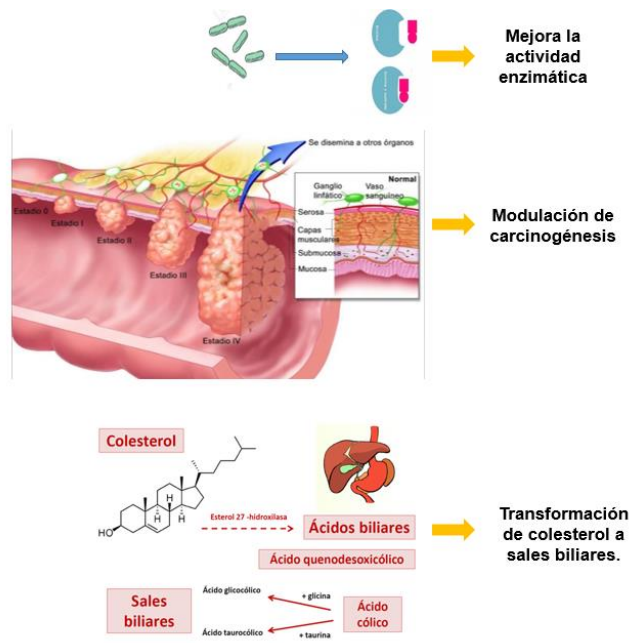


Figura 6. Mecanismo de acción de los probióticos.

2.3.4 Probióticos como alimento funcional

Los alimentos funcionales son aquellos que pueden ser parte de la dieta diaria del consumidor y que cuentan con un ingrediente bioactivo que beneficia a la salud. Por esta razón los alimentos que contiene probióticos son considerados como funcionales y estos junto con las fibras son lo que más demanda tiene en el mercado de los alimentos (Al-Sheraji *et al.*, 2013). Para el año 2013 se reportó en el mercado global un consumo de 176.7 billones de dólares, y se estima que esto equivale al 60% o 70% del consumo total de alimentos funcionales. Muchos de estos productos fueron leches fermentadas, helados, quesos, leche en polvo, postres, bebidas fermentadas y leches saborizadas (Tripathi & Giri, 2014).

A continuación se muestran en la Tabla 1 las especies de bacterias más usadas como probióticas y en la Tabla 2 las aplicaciones comerciales de algunas de estas bacterias.

Tabla 1. Especies de bacterias más usadas en preparados probióticos.

Bacteria probiótica	Especies
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> spp., <i>L. cellobiosus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. brevis</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>B. bifidum</i> , <i>B. adolescentes</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. thermophilum</i> , <i>B. longum</i>
<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecalis</i> , <i>E. Faecium</i>
<i>Streptococcus</i> sp.	<i>S. cremoris</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. diacetylactis</i> , <i>S. intermedius</i>

(Modificado de Tripathi & Giri, 2014)

Tabla 2. Lista de cepas probióticas más usados en preparados comerciales.

Empresa/Producto	Cepa
Chr. Hansen	<i>L. acidophilus</i> LA1/LA5, <i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaris</i> Lb12, <i>L. paracasei</i> CRL431, <i>B. animalis</i> spp. <i>Lactis</i> Bb12
Danisco	<i>L. acidophilus</i> NCFMs, <i>L. acidophilus</i> La, <i>L. paracasei</i> Lpc, <i>B. lactis</i> HOWARUTM/BI
DSM Food specialties	<i>L. acidophilus</i> LAFTIs L10, <i>B. lactis</i> LAFTIs B94, <i>L. paracasei</i> LAFTIs L26
Nestle	<i>L. johnsonni</i> La1
Snow Brand Milk	<i>L. acidophilus</i> SBT-20621 products Co. Ltd, <i>B. longum</i> SBT-29281
Institute Rosell	<i>L. rhamnosus</i> R0011, <i>L. acidophilus</i> R0052
Yakult	<i>L. casei shirota</i> , <i>B. breve</i> strain yaku
Fonetera	<i>B. lactis</i> HN019 (DR10), <i>L. rhamnosus</i> HN001 (DR20)
Probi AB	<i>L. plantarum</i> 299V, <i>L. rhamnosus</i> 271
Danone	<i>L. casei</i> <i>immunitas</i> , <i>B. animalis</i> DN173010 (Bioactiva)
Essum AB	<i>L. rhamnosus</i> LB21, <i>Lactococcus lactis</i> L1A
Biogaia	<i>L. reuteri</i> SD2112
Morinaga Milk Industry Co. Ltd.	<i>B. longum</i> BB536
Lacteol Laboratory	<i>L. acidophilus</i> LB
Medipharm	<i>L. paracasei</i> F19

(Modificado de Tripathi & Giri, 2014)

2.3.5 Aplicaciones clínicas reportadas

Las aplicaciones de los probióticos conciernen en su mayoría a enfermedades causadas por una posible disbiosis en la microbiota intestinal. Las bacterias que más se han estudiado como tratamientos en algunas de estas enfermedades son del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque también en menor medida se ha recurrido a algunas de los géneros *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*. En otros casos también se ha demostrado la utilidad de la levadura *Saccharomyces boulardii* (Butel, 2014).

- Probióticos y diarrea infecciosa. Estudios clínicos han demostrado que el tratamiento con probióticos pueden reducir el tiempo de infección de 4 días a sólo un día y disminuir las evacuaciones en adultos. En niños los probióticos también disminuyen la duración de la diarrea y la fiebre, pero no disminuyeron las evacuaciones. En el caso de las diarreas causadas por rotavirus la cepa probiótica de *Lactobacillus GG* (LGG) ha dado muy buenos resultados. Otro tipo de diarreas tratadas con probióticos son las causadas por antibióticos, en este caso las especies con mejores resultados han sido *Bifidobacterium lactis*, LGG y la levadura *S. boulardii*.
- Probióticos y colitis ulcerosa. Hasta ahora no se ha determinado que haya un cepa probiótica específica para tratar esta enfermedad, sin embargo, se han hecho estudios con *Escherichia coli*, *S. boulardii* y más recientemente con *Faecalibacterium praustnizii*.
- Probióticos y síndrome de intestino irritable (IBS). Este es un padecimiento que se presenta por diferentes causas, eso hace que en los estudios se muestren muchas diferencias entre ellos y los efectos que se reportan, sin embargo, se han obtenido buenos resultados con algunas bifidobacterias y algunas mezclas de otras bacterias.
- Probióticos y alergias. El aumento de alergia en países desarrollados se atribuye en parte a la teoría del exceso de higiene, los estudios reflejan que las modificaciones excesivas de higiene no contribuyen al desarrollo del

sistema inmunológico. Estudios actuales muestran que los probióticos pueden ayudar a prevenir las alergias, su efectividad dependerá del tipo de cepa y de la dosis administrada.

- Probióticos y *Helicobacter pylori*. En este caso se ha demostrado que los probióticos brindan mejorías en el caso de la gastritis ulcerosa, algunos estudios demuestran que la levadura *S. boulardii* tiene efectos prometedores como adyuvante en el tratamiento con antibióticos.
- Probióticos para obesidad y diabetes. Distintos autores han reportado estudios de la relación entre la microbiota intestinal y la obesidad así como la diabetes tipo 2. Una de las explicaciones se ha enfocado a la fermentación de los productos no digeribles y la producción de ácido grasos de cadena corta que pueden ser transformados en energía. Hasta el momento no hay estudios que establezcan un tratamiento específico con probióticos (Butel, 2014).

2.3.6 Reglamentación de probióticos

Si bien hay un consenso científico, no existe una definición legal del término “probiótico.” Los criterios mínimos que se debe cumplir para los productos probióticos son:

- Especificarse por género y cepa, la investigación sobre determinadas cepas específicas de probióticos no se puede aplicar a cualquier producto comercializado como probiótico.
- Estar vivos en el producto.
- Administrarse en dosis adecuadas hasta el final de la vida útil (con variabilidad mínima de un lote a otro).
- Haber demostrado ser eficaces en estudios controlados en humanos.
- Ser inocuos para el uso para el que estarían destinados.

Al no haber normas universalmente establecidas y/o aplicadas para el contenido y las declaraciones en la etiqueta de los productos, la industria debería mantener la integridad en la formulación y etiquetado de los productos para que los consumidores puedan tener confianza en esta categoría de productos (Guarner *et al.*, 2011).

2.3.7 Contras del uso de probióticos

- Infecciones Nosocomiales. Algunas cepas de bacterias probióticas han estado implicadas en infecciones nosocomiales, el mayor riesgo se presenta en pacientes con síndrome de intestino corto o pacientes con catéter central.
- Toxicidad. Algunas bacterias probióticas pueden producir metabolitos que causan toxicidad, como podría ser el caso del *D*-lactato, por ejemplo, en pacientes con síndrome de intestino corto el exceso de bacterias lácticas podrían causar una acidosis que podría terminar en hiperventilación o encefalopatía.
- Resistencia a los antibióticos. Debido al enorme y diverso ecosistema que es la microbiota intestinal, el intercambio de genes de resistencia es altamente probable en este medio. Esto ha sido comprobado en diversos estudios, por lo que se plantea el problema de utilizar bacterias probióticas cuyo género o especie posean de forma natural factores de virulencia como lo son *Enterococcus* y *E. coli* ya que si se presentaran casos de infección por dichas bacterias y estas hubieran adquirido genes de resistencia de otras sería muy difícil encontrar un tratamiento adecuado (Butel, 2014).

2.3.8 Prebióticos y Simbióticos

Los prebióticos son ingredientes no digeribles de la dieta, que producen efectos beneficiosos estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon, las que tienen a su vez la propiedad de elevar el potencial de salud del hospedero. Son fundamentalmente fructo y galacto oligosacáridos. Incluida en este concepto está la fibra dietética. Un simbiótico se ha definido como una combinación de prebióticos con probióticos, la cual beneficia al

huésped mediante el aumento de la supervivencia e implantación de los microorganismos vivos de los suplementos dietéticos en el sistema gastrointestinal. Se ha descrito un efecto sinérgico entre ambos, es decir, los prebióticos pueden estimular el crecimiento de cepas específicas y por tanto contribuir a la instalación de una microflora bacteriana específica con efectos beneficiosos para la salud (de las Cagigas Reig, A. L., & Anesto, J. B. 2002).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad el empleo de BALs como bacterias iniciadoras en la industria de los alimentos es algo muy común, es fácil de manejar gracias a toda la información que hay actualmente de estas, y sobre todo destaca la preferencia que el consumidor tiene hacia estos productos ya que aprueba su sabor, olor, textura y lo más importante su valor nutricional. Estos productos son elaborados desde épocas ancestrales, pero hace apenas un siglo que el uso de estas bacterias tiene una nueva perspectiva, desde que Metchnikoff propuso que la ingesta de algunos “microbios” podría ayudar a quienes los ingieren se han hecho muchos estudios al respecto, incluso ahora se conocen bien los mecanismos de acción, se reconoce el estímulo al sistema inmunológico y se cree que algunas de estas BALs actualmente conocidas como probióticas también podrían influir en el control de cáncer de colon. Esto se debe a que estas bacterias pueden ingerirse vivas y formar parte de la microbiota del consumidor trayendo así nuevos beneficios a la salud de este. Además, el incremento de enfermedades gastrointestinales debido a una inadecuada alimentación y al estrés, crea en el consumidor la necesidad de productos que no solo le aporten un beneficio nutricional sino que también pueda ayudar directamente en la mejora de su salud. Esta demanda crea la necesidad de seguir identificando bacterias que puedan tener potencial probiótico y evaluarlas para garantizar que al ser ingeridas realmente brindaran un beneficio en su huésped.

4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1 Objetivo General

Estudiar el potencial probiótico de la cepa de *L. mesenteroides* BL-UV04.

4.2 Objetivos Específicos

- Realizar una caracterización fenotípica por pruebas bioquímicas de la cepa de *L. mesenteroides* BL-UV04.
- Determinar el potencial de resistencia de la cepa de *L. mesenteroides* BL-UV04 a las barreras fisiológicas.
- Realizar pruebas de función fisiológica a la cepa de *L. mesenteroides* BL-UV04.

4.3 Hipótesis

L. mesenteroides BL-UV04 es una BAL con buenas características de seguridad, tecnológicas y funcionales para determinar su potencial probiótico.

5. METODOLOGÍA

Para desarrollar los objetivos particulares, se planteó la metodología del presente trabajo en tres etapas (Figura 7).

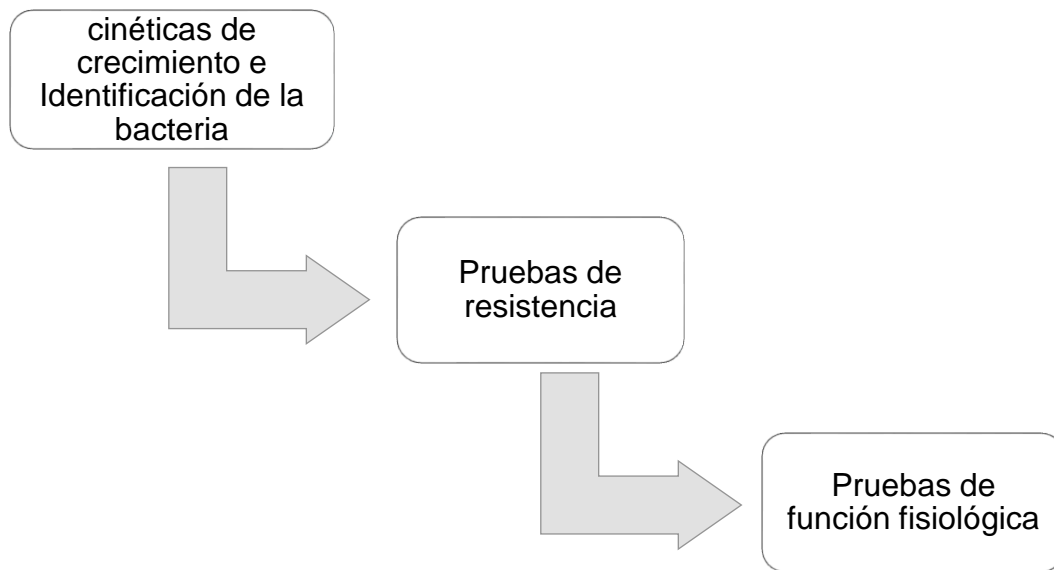


Figura 7. Desarrollo de la metodología.

5.1 Microorganismo

Para la realización de este estudio se empleó una cepa aislada a partir de frutas de la región en el Laboratorio 34 de proyectos de investigación de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana, en la ciudad de Xalapa, Veracruz.

Esta cepa fue elegida por la capacidad de producir EPS en un medio enriquecido con sacarosa (obtenida a partir de piloncillo). Fue denominada *L. mesenteroides* BL-UV04 por una primera caracterización fenotípica realizada en ese mismo laboratorio.

En esta primera caracterización fenotípica se clasificó como una bacteria cocoide, Gram- positiva, catalasa negativa, no formadora de esporas, no móvil, que se agrupa en pequeñas cadenas, productora de EPS y resistente a vancomicina (Montiel-Pineda, 2014).

La cepa es mantenida en conservación por liofilización para lo cual se empleó caldo MRS (Difco) suplementado con 10% de glicerol y 10% de leche en polvo, el medio se esterilizo a 121 °C por 15 min.

Para los posteriores análisis se empleó un medio de cultivo con los requerimientos necesarios, el cual dependiendo del sustrato de carbono es denominado medio base con glucosa (MBG) o medio base con piloncillo (MBP) (Anexo).

5.2 Cinética de crecimiento bacteriano

El desarrollo de la cinética de crecimiento consiste en ir midiendo la velocidad a la que aumenta la masa bacteriana. Para ello, primeramente se realizó un preinoculo que consiste en incubar una colonia de la cepa en 10 mL de caldo MBG durante 24 h a 37°C, a partir de este cultivo se preparó un cultivo al 1% de concentración bacteriana. Este cultivo se mantuvo a 37°C para tomar muestreos cada dos horas durante 24 horas. En cada muestreo se midió el crecimiento celular por dos técnicas a) la técnica de diluciones seriadas (Figura 7) y sembradas por inclusión en agar MBG, las cajas fueron incubadas a 37°C durante 24h para realizar el conteo de UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias por mL) y b) densidad óptica medida espectrofotométricamente a una DO_{600nm} , también se midió la disminución del pH.

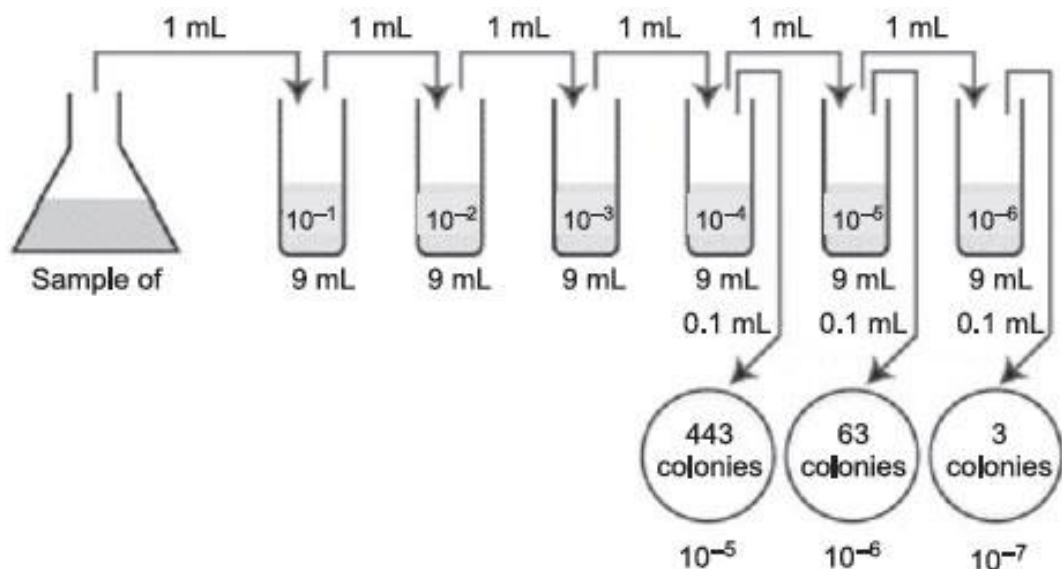


Figura 8. Diluciones seriadas para el conteo de células viables.

5.3 Identificación bioquímica de *L. mesenteroides* BL-UV04

La identificación de la especie de la bacteria *L. mesenteroides* BL-UV04 se realizó empleando la batería API50-CHL diseñada para el estudio bioquímico del metabolismo de 49 carbohidratos.

La batería consta de cúpulas que contienen los medios necesarios para que la BAL metabolice alguno de los componentes y podamos ver a simple vista una reacción química.

El llenado de los microtubos con el medio 50CHL, la adición del inóculo, la incubación, la lectura e interpretación de las pruebas se realizó de acuerdo con la metodología descrita en la ficha técnica que incluye la batería del sistema API 50CHL de Biomerieux (Anexos).

La comparación del patrón de fermentación para determinar la especie de la cepa en estudio se realizó con la base de datos apiweb API 50CHL V5.1.

5.4 Resistencia a pH

Las bacterias después de una incubación de 18 h a partir de un cultivo en MBP, fueron obtenidas por centrifugación a 5000 rpm x 6 min x 4 °C. El botón celular fue lavado dos veces con PBS a pH 7.2, una vez lavadas las células fueron resuspendidas en volúmenes iguales de PBS a pH 2 ajustado con HCl 1N, manteniéndose a 37 °C. El conteo de células viables fue evaluado con una serie de muestras tomadas en los siguientes tiempos: 0, 1, 2 y 3 horas. Posteriormente sembradas en agar MBG incubando a 37 °C por 24 h. Después de las 24 h se hizo el recuento de UFC (Torres-Maravilla *et al.*, 2015).

5.5 Resistencia a sales biliares

Las bacterias de estudio se emplearon con una incubación de 18 horas, fueron centrifugadas y lavadas con PBS a pH7.0, para posteriormente ser resuspendidas en volúmenes iguales de PBS con 1% de sales biliares (w/v). Se tomó la primera muestra al tiempo cero y después cada hora durante 3 horas; estas muestras fueron sembradas en agar MBG para hacer el conteo en placa de UFC, incubando por 24 horas a 37 °C (Torres-Maravilla *et al.*, 2015).

5.6 Actividad de la enzima hidrolasa de sales biliares

Para realizar esta prueba se siguió el método descrito por Argyri *et al.*, 2013 con ligeras modificaciones. El agar MBG fue suplementado con 1% de sales biliares y se vertió en placas, posteriormente la bacteria fue estandarizada al 0.5 de McFarland y sembrada en dichas placas. Se incubó a 37 °C por 24 horas. La desconjugación de sales biliares se revela por la presencia de un precipitado o halo blanquecino en la periferia de las colonias de las BALs.

5.7 Resistencia a antibióticos

La resistencia a los antibióticos fue evaluada por ensayo de difusión con discos. Los antibióticos que se estudiaron son los más comunes para bacterias Gram

positivas. En la tabla 3 se enlistan los antibióticos y concentraciones empleados para esta prueba.

A partir de un cultivo fresco se preparó una suspensión estandarizada al 0.5 de la escala de Mcfarland. La bacteria es sembrada uniformemente en placas de agar Mueller Hilton suplementado con glucosa como fuente de carbono, y después se colocaron los discos con antibióticos (Investigación diagnóstica). Se puso en incubación por 24 horas a 37 °C. La formación de halos debe medirse para conocer si hay o no resistencia (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015).

Tabla 3. Lista de antibióticos

Código	Antibiótico	Concentración
AM	Ampicilina	10 mcg
CF	Cefalotina	30 mcg
CFX	Cefotaxima	30 mcg
CPF	Ciprofloxacino	5 mcg
CLM	Clindamicina	30 mcg
DC	Dicloxacilina	1 mcg
E	Eritromicina	15 mcg
GE	Gentamicina	10 mcg
PE	Penicilina	10 UI
SXT	Sulfametoxazol/trimetropin	25mcg
TE	Tetraciclina	30 mcg
VA	Vancomicina	30 mcg

Adaptado del inserto que incluye el Kit de sensidiscos de Investigación Diagnóstica, 2017.

5.8 Resistencia a vancomicina

Esta prueba fue realizada por el ensayo de difusión con discos. Para ello se preparó una solución de vancomicina con una concentración de 100 µg/mL. El inóculo fresco de 24 horas de incubación fue estandarizado al 0.5 de la escala de

McFarland y sembrado en placas de MBG. Después fueron colocados los discos impregnados con el antibiótico. Se incubó a 37 °C por 24 horas (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015).

5.9 Actividad antagónica

Para la realización de esta prueba se emplearon las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus delbreuckii*. Pertenecientes al cepario del Laboratorio 5 de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana. Cada una de ellas fue probada contra la cepa de *L. mesenteroides* BL-UV04.

A partir de un medio de cultivo fresco de 24 horas se elaboró una suspensión estandarizada al 0.5 de la escala de McFarland de cada una de las bacterias de estudio, con la cual se procedió a realizar un sembrado en forma de cruz (como se muestra en la Figura 9), con esto se expone a dos cepas diferentes a los cambios de ambiente que una le pueda generar a la otra, en algunos casos, se puede observar zonas de inhibición si es que alguna de ellas tiene la facultad de impedir el crecimiento de la otra (Arasu *et al.*, 2014).

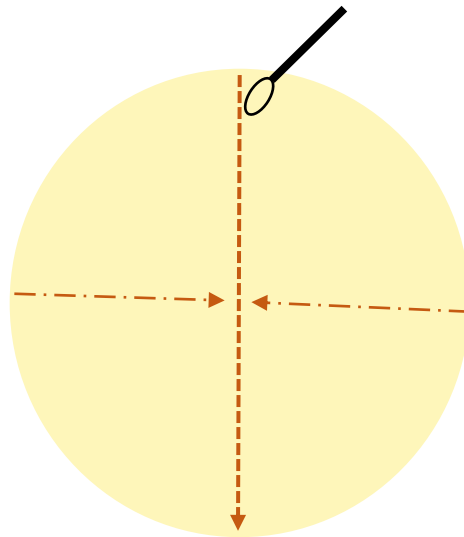


Figura 9. Diagrama de sembrado

5.10 Producción de bacteriocinas

Para esta prueba se emplearon las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Pertenecientes al cepario del Laboratorio 5 de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana.

Se procedió de acuerdo a la técnica de difusión en pocillos, preparándose agar Mueller Hilton de acuerdo a las instrucciones del propio medio. Se vació en cajas Petri y una vez solidificado se sembró un inóculo estandarizado al 0.5 de la escala de McFarlan de cada una de las bacterias de estudio. Después se procedió a horadar el medio y a depositar 300 µL de sobrenadante de un cultivo fresco de 24 horas de *L. mesenteroides* BL-UV04. Se incubó a 37 °C por 24 horas (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015).

6. RESULTADOS

6.1 Cinética de crecimiento bacteriano

A fin de conocer los parámetros de crecimiento de *L. mesenteroides* BL-UV04 se realizó una cinética de crecimiento bacteriano. Los resultados revelan que la bacteria alcanza su máxima producción celular a las 18 horas de incubación, alcanzando una población de hasta 5×10^8 UFC/mL, tiene un tiempo de generación de 27 min y una velocidad de crecimiento de 1.5 h.

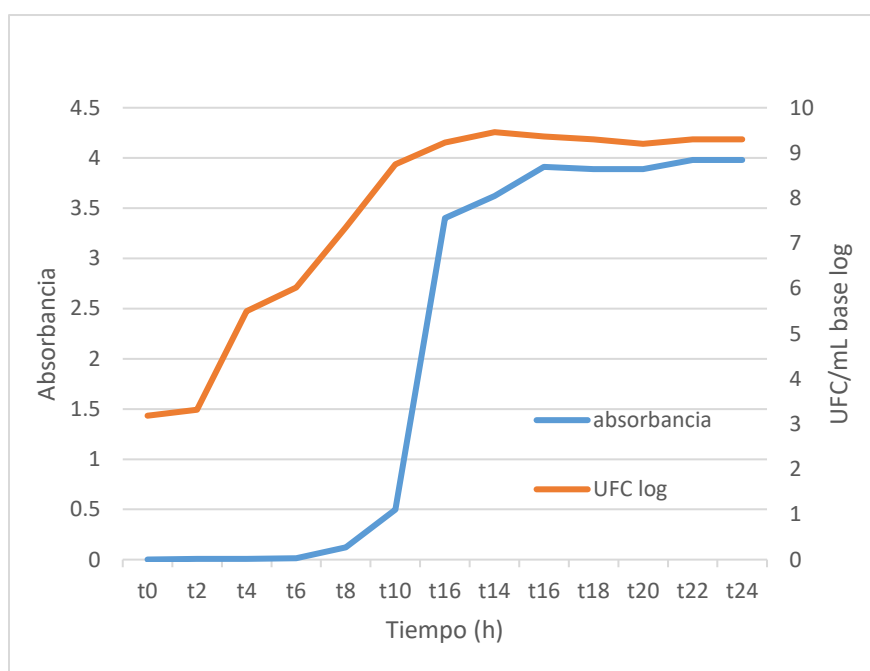


Figura 10. Cinética de crecimiento *L. mesenteroides* BL-UV04

También se pudo observar la caída del pH a partir de las 8 horas de iniciado el procedimiento, y este al final de las 24 horas alcanzó un pH de 4.0

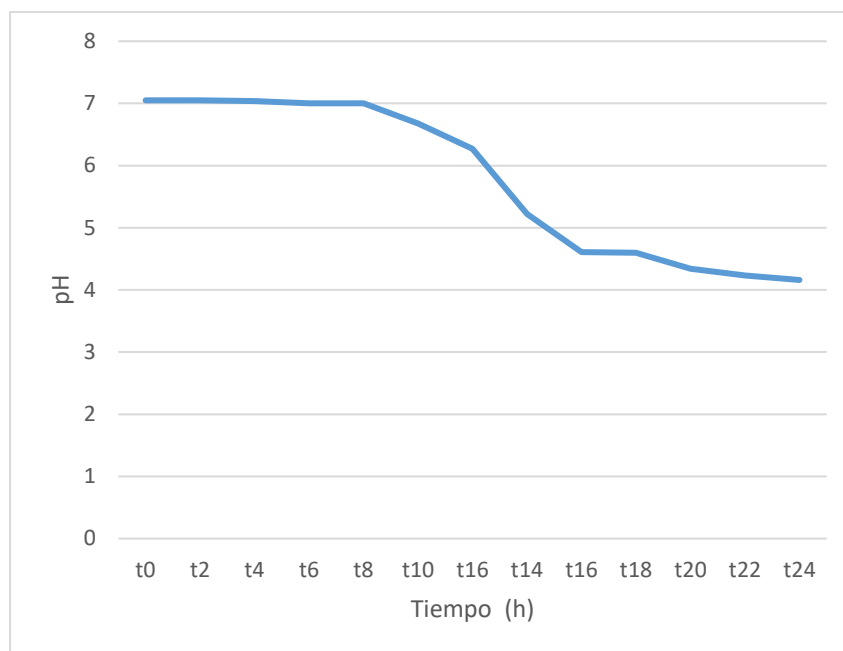


Figura 11. Efecto del crecimiento de *L. mesenteroides* BL-UV04 sobre el pH del medio

6.2 Identificación bioquímica de *L. mesenteroides* BL-UV04

Se determinó el patrón de fermentación de la cepa *L. mesenteroides* BL-UV04 mediante la batería API 50CHL (Figura 12), los resultados se resumen en la Tabla 4, dicho patrón fue comparado en la base de datos apiweb API 50CHL V5.1, teniendo como resultado:

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Lactobacillus brevis 1	99.8	0.35	GAL 99%	MDG14%	AMY99%	2KG 20%
			5KG 14%			
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides/dextranicum 1	0.1	0.0	GAL 80%	MAN12%	AMY80%	TUR 99%
			GNT25%	2KG 0%	5KG 0%	

En base a la característica de producción de EPS a partir de sacarosa y la resistencia a vancomicina se concluye que la cepa identificada es *Leuconostoc mesenteroides* ssp *mesenteroides*.



Figura 12. Patrón de fermentación de *L. mesenteroides* BL-UV04 mediante la batería API 50-CHL

Tabla 4. Resultados pruebas bioquímicas API 50-CHL

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
24 h	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
48 h	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Ch	0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
24 h	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
48 h	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Ch	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR
	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
24 h	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
48 h	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Ch	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC
	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
24 h	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
48 h	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Ch	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN
	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
24 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ch	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG

6.3 Resistencia a pH ácido

La prueba de resistencia a pH ácido tiene la finalidad de revelar si la bacteria de estudio tiene o no la capacidad de soportar el pH más ácido de sistema gastrointestinal, que es el pH de los jugos gástricos del estómago que puede ser de 2 o menos. En este caso *L. mesenteroides* BL-UV04 fue sometido a pH 2 en buffer PBS, como resultados podemos observar que se inició con una concentración celular de 10^7 UFC/mL y la prueba finalizó con una población de 10^2 UFC/mL, por lo cual podemos concluir que se perdieron 5 ciclos logarítmicos, sin embargo, la

población continuo viable. Argyri *et al.*, en el 2012 reportaron que solo una de diecisiete cepas fue capaz de sobrevivir a la prueba de pH.

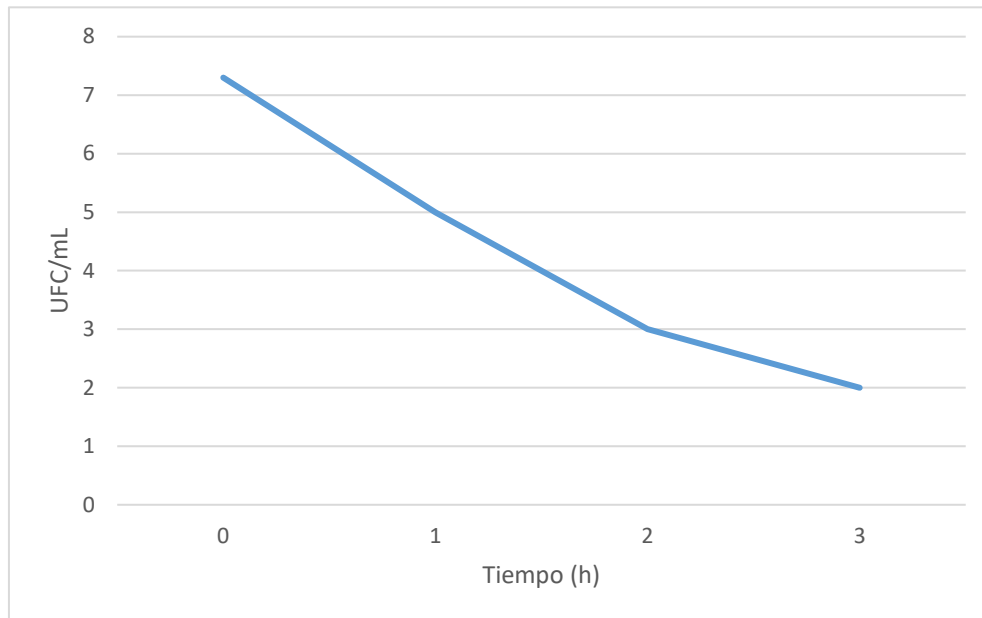


Figura 13. Resistencia a pH 2.0.

6.4 Resistencia a sales biliares

La prueba de sales biliares se lleva a cabo para saber si las bacterias son capaces de resistir la agresión que estas representan hacia la pared celular, aquellas bacterias que son capaces de resistir las sales biliares tienen más probabilidades de llegar vivas al intestino del huésped. En el caso de *L. mesenteroides* BL-UV04 podemos observar que la población inicial fue de 10^9 UFC/mL y se finalizó la prueba con una población de 10^4 perdiendo solamente cinco ciclos logarítmicos, estos valores son mayores a lo reportado por Anthoula *et al.*, en el 2012 donde ellos iniciaron con una población igual pero finalizaron con una población de 10^2 , perdiendo siete ciclos logarítmicos.

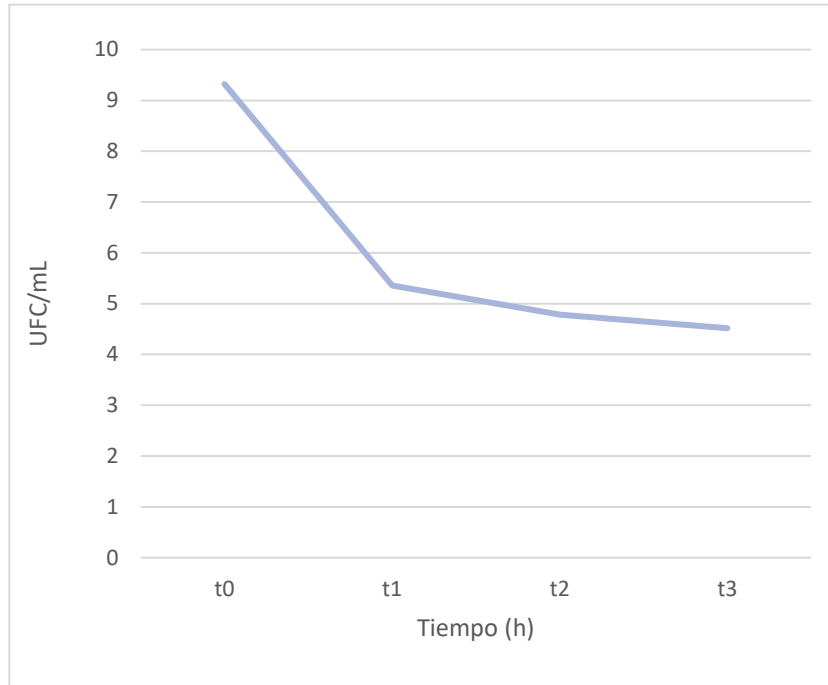


Figura 14. Resistencia a sales biliares.

6.5 Actividad de la enzima hidrolasa de sales biliares

La hidrólisis de sales biliares se observa positiva cuando alrededor de las colonias se observan halos de un color más claro al resto del medio, la ausencia de estos halos indican que las bacterias no tiene actividad de la enzima hidrolasa. En el caso de *L. mesenteroides* BL-UV04 no se observan halos claros alrededor de las colonias por lo que podemos inferir que dicha cepa no tiene actividad de enzima hidrolasa, por lo que además podemos suponer que al no tener la capacidad de hidrolizar las sales biliares tampoco es capaz de ayudar a disminuir los niveles de colesterol, esto en base a la teoría de que al hidrolizarse las sales biliares estas son excretadas en las heces generando una señal para que más colesterol se convierta en sal biliar.

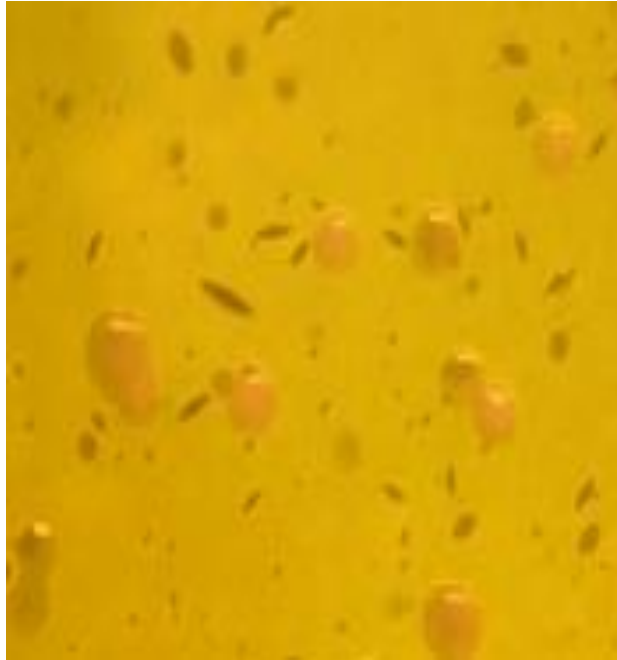


Figura 13. Prueba de hidrólisis de sales biliares.

6.6 Resistencia a antibióticos

La presencia de halos de inhibición bacteriana representarían la susceptibilidad de la cepa hacía dichos antibióticos. En el caso de *L. mesenteroides* BL-UV04 se observan halos de inhibición alrededor del antibiótico eritromicina, el cual tiene una concentración de 15 mcg, a esta concentración halos de inhibición de más de 18 mm se consideran sensibles. En este caso el halo de inhibición fue en promedio de 23 mm, por lo que podemos catalogar a *Leuconostoc* spp. BL-UV04 sensible a eritromicina (Figura 16).

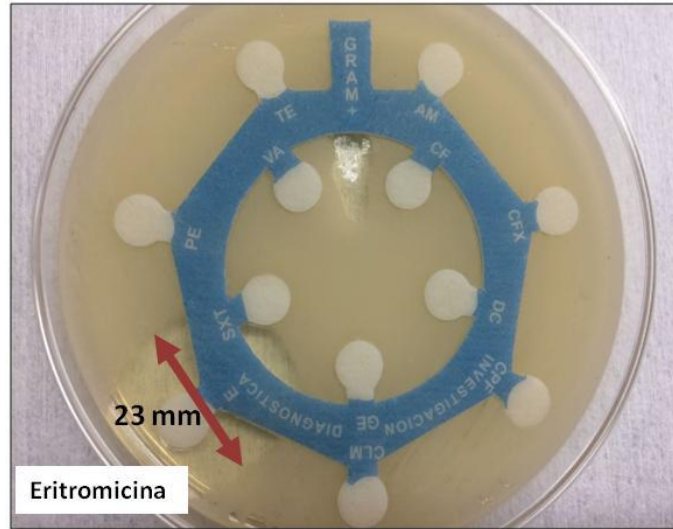


Figura 14. Resistencia a antibióticos

6.7 Resistencia a vancomicina

El género de LABs *Leuconostoc* se ha reportado como resistente al antibiótico vancomicina en concentraciones $<30 \mu\text{g/mL}$. Como prueba confirmatoria del género de la bacteria de estudio se realizó esta prueba encontrando que es resistente hasta en concentraciones mayores de $100 \mu\text{g/mL}$ de vancomicina. Esto se evidencia en la placa de agar dónde no se observaron halos de inhibición.

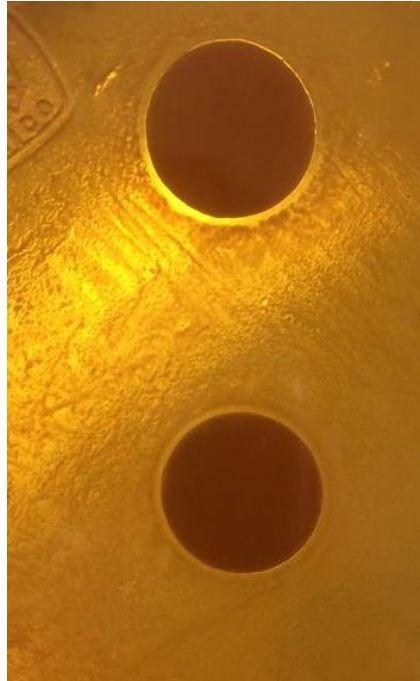


Figura 17. Prueba de resistencia a vancomicina.

6.8 Actividad antagónica

L. mesenteroides BL-UV04 fue probada contra otras bacterias ácido lácticas y contra bacterias patógenas. Esto con la finalidad de observar si *L. mesenteroides* BL-UV04 podía inhibir o ser inhibida por alguna de las otras bacterias, sin embargo, en ninguno de los casos se observaron inhibiciones, de ninguna bacteria.

En la Figura 18 se puede apreciar el crecimiento de ambas bacterias de prueba, y se destaca como además las bacterias ácido lácticas crecieron en abundancia estando juntas.

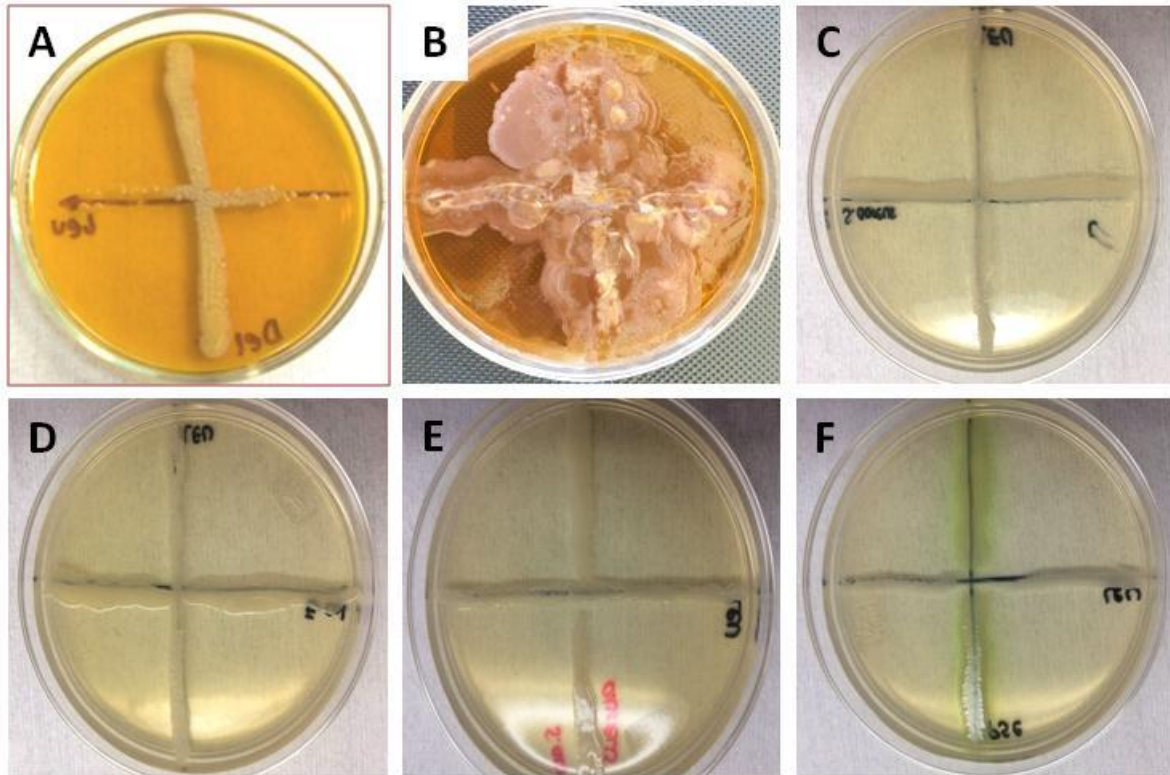


Figura 15. Actividad antagonista de *L. mesenteroides* BL-UV04.
 (A) *Lactobacillus delbreuckii*, (B) *Lactobacillus casei*, (D) *Escherichia coli*, (E) *Staphylococcus epidermidis*, (F) *Pseudomonas aeruginosa*.

6.9 Producción de bacteriocinas

Para verificar si *L. mesenteroides* BL-UV04 estaba produciendo bacteriocinas se realizó la prueba de difusión por pocillos, empleando solamente sobrenadante de un cultivo de dicha cepa. Este sobrenadante se probó contra bacterias patógenas, después de incubar por 24 horas no se observó ningún halo de inhibición en ninguno de los casos, por tal motivo se puede inferir la falta de producción de bacteriocinas por parte de *L. mesenteroides* spp. BL-UV04.

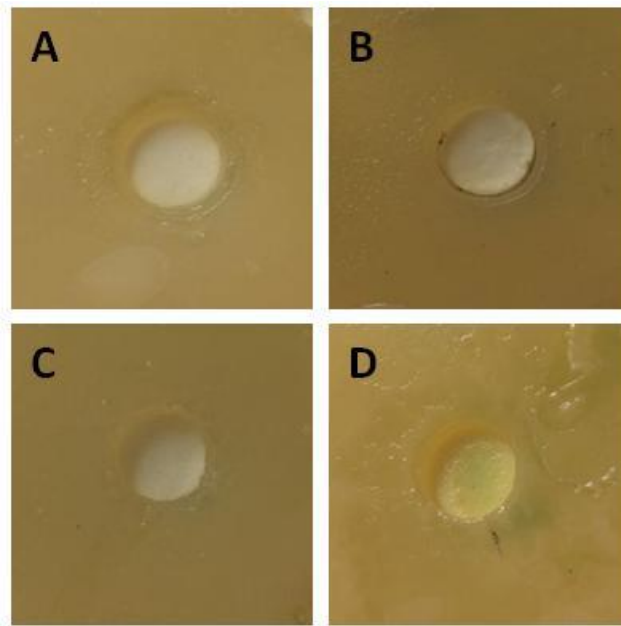


Figura 16. Producción de bacteriocinas por *L. mesenteroides* BL-UV04. (A) *Staphylococcus aureus*, (B) *Escherichia coli*, (C) *Staphylococcus epidermidis*, (D) *Pseudomonas aeruginosa*.

7. CONCLUSIONES

L. mesenteroides BL-UV04 entra en fase estacionaria a las 18 horas, tiene un tiempo de generación de 27 minutos.

L. mesenteroides BL-UV04 es resistente al pH ácido y a las sales biliares con una pérdida de solo 5 ciclos logarítmicos. Aunque es capaz de resistir las sales biliares aparentemente no tiene la capacidad de desconjugarlas. Basándose en la teoría de que al desconjugarse las sales biliares se genera un mensaje de que más colesterol se convierta en sal biliar entonces esta cepa no proporcionaría ese beneficio al ser consumida.

L. mesenteroides BL-UV04 no inhibe el crecimiento de *L. casei* y *L. delbreuckii*. Esto es importante ya que muchos liofilizados y productos alimenticios que contienen probióticos tienen más de una cepa de estos. Con esto se puede concluir que esta cepa no compite con otras bacterias probióticas, sin embargo, tampoco tiene la capacidad de inhibir a las bacterias patógenas probadas lo cual tampoco provee un sistema de protección para un huésped.

L. mesenteroides BL-UV04 es sensible a eritromicina pero resistente a otros antibióticos lo cual es importante desde dos puntos de vista, el primero es porque al ser una bacteria con posible potencial probiótico se puede usar en la terapia con antibióticos, desde otro punto de vista *Leuconostoc* es un género de bacteria que si bien es considerado GRAS también es catalogada como una bacteria oportunista y su sensibilidad a eritromicina abre paso a un tratamiento de ser este necesario.

Si bien las pruebas de actividad antagónica no revelan que *L. mesenteroides* BL-UV04 tenga la capacidad de inhibir bacterias patógenas esta bacteria aún puede seguir siendo estudiada para determinar su potencial probiótico gracias a su capacidad de resistir sales biliares, el pH bajo del intestino y varios antibióticos para bacterias Gram positivas.

8. RECOMENDACIONES

Aun cuando la bacteria continuo viable después de someterla a las pruebas de resistencia que simulan las barreras del hospedador se podría optimizar o asegurar la cantidad de células vivas si se recurre a un método que sea capaz de protegerlas, como puede ser la liofilización o el encapsulamiento. Esto también daría paso a pruebas de inclusión en una matriz alimentaria, dónde se probaría la estabilidad que este tendría.

Para poder determinar más adecuadamente el potencial probiótico de *L. mesenteroides* BL-UV04 pueden realizarse pruebas de adherencia celular para así determinar si tiene la capacidad de adherirse al epitelio intestinal y tener función de barrera y de estimular el sistema inmunológico. Algunas pruebas que se podrían incluir son las de mucinas y la adherencia a células HT-29.

Se recomienda realizar la prueba de actividad de la β -galactosidasa, ya que esta prueba daría información adecuada para determinar si *L. mesenteroides* BL-UV04 puede ser empleada para ayudar en los casos de consumidores con alergia a la lactosa.

Se ha reportado que los exopolisacáridos, son capaces de estimular el sistema inmune e inhibir bacterias, y en vista de que *L. mesenteroides* BL-UV04 es capaz de producir grandes cantidades de estos compuestos (datos no mostrados) se recomienda realizar pruebas de actividad antagónica contra bacterias patógenas, y también pruebas para determinar si tiene capacidad prebiótica.

9. BIBLIOGRAFÍA

Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusof, R. M., & Hassan, F. A. (2013). Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1542-1553.

Arasu, M. V., Kim, D. H., Kim, P. I., Jung, M. W., Ilavenil, S., Jane, M., & Choi, K. C. (2014). In vitro antifungal, probiotic and antioxidant properties of novel *Lactobacillus plantarum* K46 isolated from fermented sesame leaf. *Annals of Microbiology*, 64(3), 1333-1346.

Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, 33(2), 282-291.

Arribas, M. B. (2009). *Probióticos: una nueva estrategia en la modulación del sistema inmune* (Doctoral dissertation, Tesis de Doctorado]. Granada: Universidad de Granada).

Butel, M. J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et maladies infectieuses*, 44(1), 1-8.

Costello, C. M., Sorna, R. M., Goh, Y. L., Cengic, I., Jain, N. K., & March, J. C. (2014). 3-D intestinal scaffolds for evaluating the therapeutic potential of probiotics. *Molecular pharmaceuticals*, 11(7), 2030-2039.

De las Cagigas Reig, A. L., & Anesto, J. B. (2002). Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Revista Cubana Aliment Nutr*, 16(1), 63-8.

Dridier, D., & Rivera, V. (2016). *Bacterias Ácido Lácticas. Fundamentos y Aplicaciones* (1st ed., pp. 49-50). México: Alfaomega.

Gary L. Simon, MD, phd, and Sherwood L. Gorbach, MD. (septiembre, 1986). The Human Intestinal Microflora. Digestive Diseases and Sciences, 31, 147S-162S. 05/02/2016, De Springer Base de datos.

Gillor, O., Etzion, A., & Riley, M. A. (2008). The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(4), 591-606.

Gordon, S. (2008). Elie Metchnikoff: father of natural immunity. *European journal of immunology*, 38(12), 3257-3264.

Guarner, F., & Schaafsma, G. J. (1998). Probiotics. *International journal of food microbiology*, 39(3), 237-238.

Guarner, F., & Malagelada, J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 361(9356), 512-519

Guarner, F., Khan, A. G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., & Fedorak, R. (2011). Probióticos y prebióticos. *Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos*, 1-29.

Hemme, D., & Foucaud-Scheunemann, C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 14(6), 467-494.

Logan, A. C., Jacka, F. N., & Prescott, S. L. (2016). Immune-microbiota interactions: dysbiosis as a global health issue. *Current allergy and asthma reports*, 16(2), 13.

Metchnikoff, I. I. (2004). *The prolongation of life: optimistic studies*. Springer Publishing Company.

Microbiota, Probióticos, Prebióticos y Simbióticos. (2017). *Pediatriaintegral.es*. Retrieved 28 August 2017, from <https://www.pediatriaintegral.es/publicacion-2015-06/microbiota-probioticos-prebioticos-y-simbioticos/>

Mukherjee, S., Singh, A. K., Adhikari, M. D., & Ramesh, A. (2013). Quantitative Appraisal of the Probiotic Attributes and In Vitro Adhesion

Potential of Anti-listerial Bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 5(2), 99-109.

Nyangale, E. P., Mottram, D. S., & Gibson, G. R. (2012). Gut microbial activity, implications for health and disease: the potential role of metabolite analysis. *Journal of proteome research*, 11(12), 5573-5585.

Ortiz Balderas, M. (2006). Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo. TESIS

Parra Huertas, R. A. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93-105.

Patel, S., Shukla, R., & Goyal, A. (2015). Probiotics in valorization of innate immunity across various animal models. *Journal of functional foods*, 14, 549-561.

Quinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., & Girbés, T. (2014). Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences*, 5(18), 1765.

Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*, 84(3), 197-215.

Scott, K. P., Gratz, S. W., Sheridan, P. O., Flint, H. J., & Duncan, S. H. (2013). The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological research*, 69(1), 52-60.

Tormo Carnicé, R. (2006). Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. In *Anales de Pediatría* (Vol. 65, No. Monogr 4, pp. 30-41).

Torres-Maravilla, E., Lenoir, M., Mayorga-Reyes, L., Allain, T., Sokol, H., Langella, P., & Bermúdez-Humarán, L. G. (2016). Identification of novel anti-inflammatory probiotic strains isolated from pulque. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(1), 385-396.

Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods*, 9, 225-241.

10. ANEXO

10.1 Medios de cultivo

10.1.1 Caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe)

Para la preparación de este medio se empleó caldo MRS para *Lactobacillus* BD Difco™

Componentes	Cantidad g/L
Proteasa pectona no. 3	10.0
Extracto de carne	10.0
Extracto de levadura	5.0
Dextrosa	20.0
Polisorbato 80	1.0
Citrato de amonio	2.0
Acetato de sodio	5.0
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato dipotasico	2.0
Agar *	15.0

Tabla. 5 Medio MRS

- * El medio fue ajustado a un pH final de 6.5 ± 0.2 .
- * El agar solo fue incorporado en los casos que se requería cultivo en caja.
- * El medio se esteriliza a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ /15 lb/ 15 min

10.1. 2 Medio Base Piloncillo

Componentes	Cantidad g/L
Extracto de carne	10.0
Extracto de levadura	5.0
Piloncillo	150
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Cloruro de Calcio	0.1
Cloruro de Sodio	0.5
Fosfato dipotasico	15
agar *	15.0

Tabla. 6 Medio Base (MBP)

- * El medio fue ajustado a un pH final de 6.5 ± 0.2 .

- * El agar solo fue incorporado en los casos que se requería cultivo en caja.
- * El medio es centrifugado a 4500 rpm x 15 min x 4 °C para eliminar el precipitado ocasionado por las sales.
- * El medio se esteriliza a 121 °C /15 lb/ 15 min
- * El piloncillo se compró en mercados de la región.

10.1.3 Medio Base Glucosa

Componentes	Cantidad g/L
Extracto de carne	10.0
Extracto de levadura	5.0
Glucosa	50
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Cloruro de calcio	0.1
Cloruro de sodio	0.5
Fosfato dipotásico	15
Agar *	15.0

Tabla. 7 Medio Base (MBG)

- * El medio fue ajustado a un pH final de 6.5 ± 0.2 .
- * El medio es centrifugado a 4500 rpm x 15 min x 4 °C para eliminar el precipitado ocasionado por las sales.
- * El medio se esteriliza a 121 °C /15 lb/ 15 min
- * El agar solo fue incorporado en los casos que se requería cultivo en caja.

10.1.4 Agar Mueller-Hinton

Se utilizó caldo Mueller-Hinton BD Difco™

Componentes	Cantidad g/L
Hidrolizado ácido de caseína	17.5
Extracto de carne	3.0
Almidón	1.5

Tabla. 8 Medio Mueller_Hinton

- * El medio se esteriliza a 121 °C /15 lb/ 15 min

10.1.4 Medio API-50 CHL

Componentes	Cantidad g/L
Polypeptona (bovine/porcine origin)	10 g
Extracto de levadura	5 g
Tween 80	1 ml
Difosfato de potasio	2 g
Acetato de sodio	5 g
Citrato Diamonico	2 g
Sulfato de magnesio	0.20 g
Sulfato de manganesio	0.05 g
Purpura de bromocresol	0.17 g
Agua desmineralizada	1000 ml
pH : 6.7-7.1	

Tabla. 9 Medio para pruebas bioquímicas de bacterias ácido láctico.

- * El medio se esteriliza a 121 °C /15 lb/ 15 min

10.2 Soluciones

10.2.1 Buffer PBS

Componentes	Cantidad g/L
NaCl	17.5
KCl	3.0
Na ₂ HPO ₄	1.5
KH ₂ HPO ₄	0.20
Agua destilada	c.s.p. 1L*
pH final 7.0 ± 0.2	

Tabla. 10 PBS

- * Para la prueba de Resistencia el buffer fue ajustado con HCl 1N
- * El buffer fue esterilizado a 121 °C /15 lb/ 15 min

10.3 Tablas de Referencia

10.3.1 Componentes de la batería API 50-CHL

Tubo	Ensayo	Componentes activos	Cantidad (mg/microtube)
0	-	Testigo	-
1	GLY	Glicerol	1.64
2	ERY	Eritrol	1.44
3	DARA	<i>D</i> -arabinosa	1.4
4	LARA	<i>L</i> -arabinosa	1.4
5	RIB	<i>D</i> -ribosa	1.4
6	DXYL	<i>D</i> -xilosa	1.4
7	LXYL	<i>L</i> -xilosa	1.4
8	ADO	<i>D</i> -adonitol	1.36
9	MDX	Metil- <i>D</i> -xilopiranosida	1.28
10	GAL	<i>D</i> -galactosa	1.4
11	GLU	<i>D</i> -glucosa	1.56
12	FRU	<i>D</i> -fructuosa	1.4
13	MNE	<i>D</i> -mannosa	1.4
14	SBE	<i>L</i> -sorbosa	1.4
15	RHA	<i>L</i> -rhamnosa	1.36
16	DUL	Dulcitol	1.36
17	INO	Inositol	1.4
18	MAN	<i>D</i> -manitol	1.36
19	SOR	<i>D</i> -sorbitol	1.36
20	MDM	Metil- <i>D</i> -manopiranosida	1.28
21	MDG	Metil- <i>D</i> -glucopiranosida	1.28
22	NAG	N-acetilglucosamina	1.28
23	AMY	Amigdalina	1.08
24	ARB	Arbutina	1.08
25	ESC	Esculina citrato férrico	1.16
26	SAL	Salicina	1.04
27	CEL	<i>D</i> -celobiosa	1.32
28	MAL	<i>D</i> -maltosa	1.4
29	LAC	<i>D</i> -lactosa (origen bovino)	1.4
30	MEL	<i>D</i> -melibiosa	1.32
31	SAC	<i>D</i> -sacarosa	1.32
32	TRE	<i>D</i> -trehalosa	1.32

33	INU	Inulina	1.28
34	MLZ	<i>D</i> -melezitosa	1.32
35	RAF	<i>D</i> -rafinosa	1.56
36	AMD	Almidón	1.28
37	GLYG	Glicógeno	1.28
38	XLT	Xilitol	1.4
39	GEN	Gentiobiosa	0.5
40	TUR	<i>D</i> -turanosa	1.32
41	LYX	<i>D</i> -lixosa	1.4
42	TAG	<i>D</i> -tagatosa	1.4
43	DFUC	<i>D</i> -fucosa	1.28
44	LFUC	<i>L</i> -fucosa	1.28
45	DARL	<i>D</i> -arabitol	1.4
46	LARL	<i>L</i> -arabitol	1.4
47	GNT	Gluconato potásico	1.84
48	2 Kg	2-Cetogluconato potásico	2.12
49	5 kg	5-Cetogluconato potásico	1.8

Tabla. 11 Pruebas bioquímicas de la batería API50-CHL

Adaptado de Ortiz Balderas, M. (2006)

10.3.1 Tabla de Sensibilidad a antibióticos.

Código	Antibiótico	Concentración	R (igual o menor)	I (entre)	S (igual o mayor)
AM	Ampicilina	10 mcg			
CF	Cefalotina	30 mcg	14	15-17	18
CFX	Cefotaxima	30 mcg	14	...	23
CPF	Ciprofloxacino	5 mcg	15	16-20	21
CLM	Clindamicina	30 mcg	14	15-20	21
DC	Dicloxacilina	1 mcg
E	Eritromicina	15 mcg	13	14-17	18
GE	Gentamicina	10 mcg	12	13-14	15
PE	Penicilina	10 UI			
SXT	Sulfametoxazol/trimetropin	25mcg	10	11-15	16
TE	Tetraciclina	30 mcg	14	15-18	19
VA	Vancomicina	30 mcg

Tabla. 12 Rango de sensibilidad de antibióticos

Adaptado del Inserto que incluye el Kit de sensibilización
Diagnostica, 2017.