

**EVALUACION DEL PROCEDIMIENTO MICROBIOLÓGICO  
DE CILINDRO EN PLACA PARA LA DETERMINACION  
DE RESIDUOS DE PENICILINA, ESTREPTOMICINA  
Y TETRACICLINA EN LECHE**

FRANCISCO VELÁZQUEZ Q.<sup>1</sup>  
MARCELO PÉREZ D.<sup>1</sup>

La leche es reconocida como un alimento casi perfecto que debe formar parte de la dieta diaria de los individuos jóvenes, especialmente de los niños. Para que este producto pueda cumplir su función al máximo, es necesario que no sea vehículo de sustancias que pudieran ser potencialmente dañinas a la salud humana. Dentro de los requisitos estipulados por el reglamento del Control Sanitario de la Leche, de la S.S.A., se señala que ésta debe estar libre de antibióticos y otros compuestos bacteriostáticos (*Diario Oficial*, 1976). Sin embargo, estudios recientes indican que la mayoría de las leches comerciales en México, están contaminadas con antibióticos en niveles cada vez más elevados (Muciño y Trujillo, 1978; Aguirre, Díaz y Pérez, 1980; Velázquez y González, 1979; Velázquez, Pérez y González, 1980a y 1980b).

Para garantizar la calidad sanitaria de la leche es indispensable disponer de programas de muestreo adecuados y de métodos, tanto cualitativos como cuantitativos, que permitan detectar los diferentes antibióticos. Las técnicas microbiológicas recomendadas por la Food and Drug Administration son ampliamente aceptadas como procedimientos para establecer contaminaciones de la leche por antibióticos (Kramer *et al.*, 1968; AOAC 1980). Por tanto, el objetivo de este trabajo es presentar una

evaluación del procedimiento microbiológico de cilindro en placa, que permite determinar cuantitativamente la presencia de residuos de penicilina, estreptomycinina o tetraciclina en leche.

Experimento 1. Este experimento se realizó con objeto de establecer los límites mínimos de detección de residuos de los antibióticos penicilina, estreptomycinina y tetraciclina en leche, siguiendo el procedimiento microbiológico de cilindro en placa (Kramer *et al.*, 1978). A partir de estándares de referencia U.S.P. se prepararon soluciones de referencia de penicilina G potásica (1,000 UI/ml), sulfato de estreptomycinina (1,000 mcg/ml) y clorhidrato de tetraciclina (1,000 mcg/ml). A partir de estas soluciones se prepararon las concentraciones finales para la curva patrón, empleando como diluyente leche libre de antibióticos. Estas concentraciones aparecen en el Cuadro 1. Se efectuaron 3 análisis por cada antibiótico.

Experimento 2. Se realizó este experimento con el objeto de evaluar la especificidad de esta técnica para la determinación de residuos de antibióticos. Se obtuvo leche libre de antibióticos que fue dividida en 8 partes y a las que les fue agregada una o diferentes combinaciones de los antibióticos penicilina, estreptomycinina y tetraciclina. El Cuadro 2 representa los diferentes tratamientos probados, así como los niveles de cada uno de los antibióticos. A las 24 hs después de la adición de los antibióticos, a cada una de las soluciones les fue determinada la presencia de antibióticos, siguiendo el procedimiento especí-

Recibido para su publicación el 20 de junio de 1980.

<sup>1</sup> Depto. de Nutrición Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Apd. Postal 41-652, México 10, D.F.

CUADRO 1

Concentraciones usadas para el establecimiento de las curvas patrón

Antibiótico	Concentraciones					
Penicilina UI/ml	0.00625	0.0125	0.025	0.05 <sup>b</sup>	0.1	0.2
Estreptomocina mcg/ml	0.0625	0.125	0.250	0.5 <sup>b</sup>	1.0	2.0
Tetraciclina <sup>a</sup> mcg/ml	0.025	0.05	0.1	0.2 <sup>b</sup>	0.4	0.8

<sup>a</sup> Se prepara cada concentración 3 veces mayor y se diluye con Sol. Buffer de fosfatos 0.1 M, pH 4.6, al momento de utilizarse.

<sup>b</sup> Concentraciones medias de referencia.

fico para cada antibiótico. Se efectuaron tres repeticiones para cada tratamiento.

Para la cuantificación de residuos de penicilina se empleó el medio de Grove y Randall Núm. 1\* a un pH de 6.6 y una cepa de *Sarcina lutea* ATCC-9341. La incubación a 30°C fue de 18 hs. Para la cuantificación de residuos de estreptomocina se empleó el medio especial para antibióticos Núm. 34 (Freeman, Johnson y Gerth, 1977) a un pH de 8.0 y una cepa de *Bacillus subtilis* ATCC-6633. La incubación a 37°C fue de 18 hs. Para la valoración de residuos de tetraciclina se empleó el medio

de Grove y Randall Núm 8\*\* a un pH de 5.7 y una cepa de *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC-11778. La incubación a 30°C fue de 18 hs. En las tres pruebas se utilizó como diluyente leche libre de antibióticos.

Preparación del Inóculo

Para la preparación del inóculo de *Sarcina lutea* se empleó un cultivo de 24 hs en tubo inclinado con medio de Grove y Randall Núm. 1, se sembró en botella de Roux con 250 ml del mismo medio y se cultivó durante 24 hs a 35-37°C. Se cosechó con 50 ml de solución fisiológica (suspensión madre de bacterias).

Las preparaciones de inóculos de *Bacillus subtilis* y de *Bacillus cereus* var. *mycoides* se hicieron de la siguiente manera: después de cosechados de la botella de Roux con 50 ml de solución fisiológica se calentaron durante 30 minutos a 70°C con objeto de promover esporulación. Se centrifugaron a 1,500 rpm durante 3 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 50 ml de agua destilada (suspensión madre de esporas).

Medio Inóculo

El medio inóculo se prepara con 100 ml del medio correspondiente, a 50°C, al que se agrega 0.5-1.0 ml de suspensión madre de bacterias o de esporas.

En el Cuadro 3 se presentan los niveles de detección de residuos de antibióticos en leche por este método. Como puede obser-

CUADRO 2

Combinaciones y concentraciones de diferentes antibióticos añadidos a leche

Tratamiento Número <sup>a</sup>	Antibiótico añadido		
	Penicilina UI/ml	Estreptomocina mcg/ml	Tetraciclina mcg/ml
1	0.1	—	—
2	—	0.5	—
3	—	—	0.4
4	0.1	0.5	—
5	0.1	—	0.4
6	—	0.5	0.4
7	0.1	0.5	0.4

<sup>a</sup> Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

\* Medios Núms. 1 y 2 de Grove y Randall para antibióticos. Artículos Núms. 5272 y 5270, Merck-México, S.A.

\*\* Artículo Núm. 5271 (ajustar al pH indicado) Merck-México, S.A.

**CUADRO 3**  
Niveles de detección de residuos  
de antibióticos en leche

Antibiótico	Mínimo	Máximo
Penicilina UI/ml	0.01	0.2
Estreptomomicina mcg/ml	0.1	2.0
Tetraciclina	0.05	0.8

vase, el nivel mínimo de detección de penicilina fue de 0.01 UI/ml, para la estreptomomicina fue de 0.1 mcg/ml y para la tetraciclina el límite mínimo fue de 0.05 mcg/ml. Con objeto de obtener la sensibilidad requerida, se estableció el límite máximo en el rango que se presenta en el Cuadro 3 para cada antibiótico. Si la leche contuviera niveles de antibióticos más altos, se harían diluciones de la misma.

En el Cuadro 4 se presentan los valores de las correlaciones entre concentración de antibióticos y diámetro de zona de inhibición. En general, estos valores pueden considerarse aceptables, especialmente en el caso de la tetraciclina, en donde la correlación fue casi 1. Por lo tanto, la sensibilidad de detección mínima por estos procedimientos es lo suficientemente alta para considerarlos seguros en programas de verificación con leches comerciales, ya que las concentraciones esperadas en leches contaminadas caen en este rango (Velázquez y

Pérez, 1978; Velázquez, Pérez y González, 1979; Velázquez, Pérez y González, 1980a y 1980b).

Como puede apreciarse en el Cuadro 5 y las Fotografías, la especificidad demostrada por estos procedimientos es altamente confiable. Todas las muestras que contenían penicilina, ya fuera como único contaminante o combinada con otros, mostraron la presencia de este antibiótico. Las muestras que no contenían penicilina pero sí otros antibióticos, dieron resultado negativo a la penicilina.

De igual manera las muestras que contenían estreptomomicina o tetraciclina solas o en combinación con otros, fueron positivas cuando se determinaron a través de su procedimiento específico. Por otro lado, las muestras que no contenían el antibiótico fueron negativas.

La característica de estos procedimientos, de detectar específicamente al antibiótico en cuestión, se debe a que las condiciones de la prueba, como lo es el tipo de bacteria utilizada, los amortiguadores usados, la temperatura de incubación y los diferentes medios de cultivo, por un lado elevan al grado óptimo las condiciones para que el antibiótico buscado ejerza su máxima acción y por otro lado bloquean la acción de otros antibióticos contaminantes de la muestra (Freeman, Johnson y Gerth, 1977; A.O.A. C., 1975). Hay que recalcar que las condiciones descritas en este trabajo, permiten discriminar sólo las acciones de diferentes familias de antibióticos. Para poder dife-

**CUADRO 4**

Correlación entre concentración de residuos de antibióticos en leche y diámetro de la zona de inhibición. Se presentan también los valores de intersección y la pendiente de la curva

Antibiótico	$r^2$	m	b
Penicilina	0.8022	0.0822	0.0082
Estreptomomicina	0.8418	1.4538	0.1268
Tetraciclina	0.9961	0.2218	0.0212

Fórmula de regresión:  $y = mx + b$

donde: y = concentración

x = diámetro de la zona de inhibición (mm)

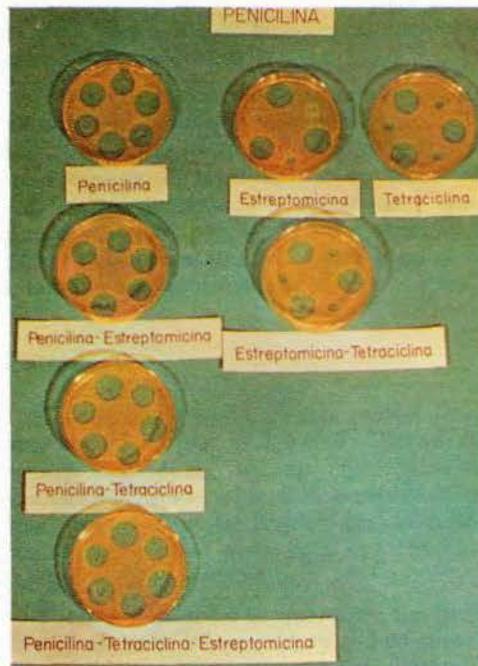
CUADRO 5

Diámetro de inhibición de crecimiento debido a la presencia de antibióticos

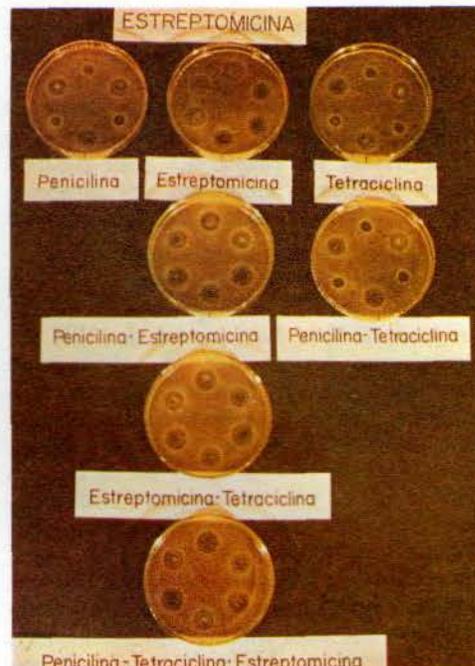
Tratamiento	Antibiótico detectado (zona de inhibición mm $\pm$ desv. est.) <sup>a</sup>					
	Penicilina		Estreptomina		Tetraciclina	
	Estándar	Muestra	Estándar	Muestra	Estándar	Muestra
1 (P)	20.4 $\pm$ .92	20.9 $\pm$ .17	16.7 $\pm$ .30	NI	18.9 $\pm$ .65	NI
2 (E)	20.7 $\pm$ .60	NI	17.3 $\pm$ .81	16.7 $\pm$ .81	18.7 $\pm$ .37	NI
3 (T)	10.8 $\pm$ .20	NI	17.3 $\pm$ .51	NI	19.3 $\pm$ .30	18.4 $\pm$ .70
4 (P + E)	20.5 $\pm$ .47	20.3 $\pm$ .41	17.3 $\pm$ .41	17.0 $\pm$ .41	19.4 $\pm$ .58	NI
5 (P + T)	10.4 $\pm$ .49	20.6 $\pm$ .28	17.3 $\pm$ .26	NI	19.5 $\pm$ .20	18.3 $\pm$ .40
6 (E + T)	19.7 $\pm$ .23	NI	17.4 $\pm$ .70	16.9 $\pm$ .61	18.7 $\pm$ .72	17.8 $\pm$ .35
7 (PET)	19.8 $\pm$ 1.21	20.0 $\pm$ .55	17.4 $\pm$ .47	16.6 $\pm$ .61	19.1 $\pm$ .61	17.9 $\pm$ .66

P, Penicilina; E, Estreptomina; T, Tetraciclina; NI, No Inhibición.

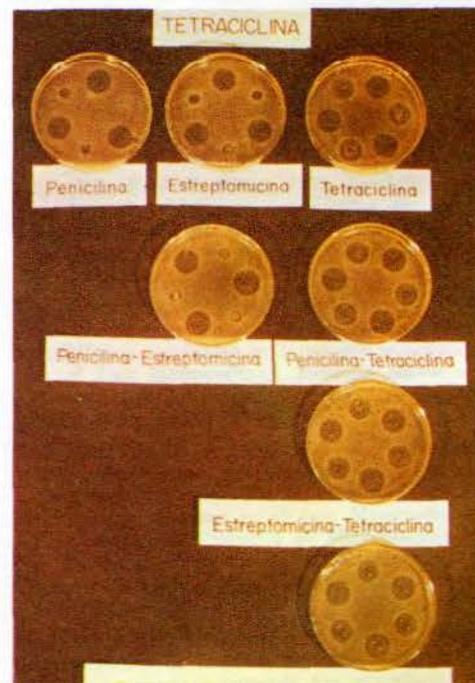
<sup>a</sup> Para la determinación de cada antibiótico se siguió el procedimiento específico para cada uno.



FOTOGRAFIA 1a



FOTOGRAFIA 1b



FOTOGRAFIA 1c

Fotografías demostrando las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano debido a la presencia de antibióticos.

1a. Procedimiento específico para la cuantificación de penicilina. Puede observarse que todas las pruebas que contenían penicilina causaron inhibición del crecimiento bacteriano; en ninguna de las pruebas que no contenían penicilina hubo inhibición.

1b. Procedimiento específico para la cuantificación de estreptomina. Puede observarse que todas las pruebas que contenían estreptomina causaron inhibición del crecimiento bacteriano; en ninguna de las pruebas que no contenían estreptomina hubo inhibición.

1c. Procedimiento específico para la cuantificación de tetraciclina. Puede observarse que todas las pruebas que contenían tetraciclina causaron inhibición del crecimiento bacteriano; en ninguna de las pruebas que no contenían tetraciclina hubo inhibición.

NOTA: En todas las cajas de Petri se colocaron, en forma alternativa, muestras de leche que contenían estándares del antibiótico específico para el procedimiento usado. En todas las cajas de Petri pueden observarse las zonas de inhibición ocasionadas por estos estándares.

renciair antibióticos homólogos, deberán usarse otros procedimientos.

Como conclusión de estos experimentos, se puede afirmar que la técnica microbiológica de cilindro en placa, para cuantificar residuos de antibióticos en leche es suficientemente exacta y sensitiva, y que puede utilizarse con confianza y seguridad para establecer si una leche está o no contaminada con antibióticos.

### Summary

Milk is considered a nearly perfect food that should be part of the daily diet of all young individuals, mainly children. For the same reason, it is indispensable that this product must be free of any contaminant potentially dangerous to human health, such as antibiotics.

Therefore in order to guarantee the quality of the milk it is necessary to have practical and sensitive screening techniques. The microbiologic methods used for detec-

ting antibiotics in milk are widely used and have been accepted as the official method by many sanitary agencies in many Countries. The purpose of this paper is to present an evaluation of the microbiologic methods used specifically for detecting residues of the antibiotics Penicillin, Streptomycin and Tetracyclin in milk.

In the first experiment we established that the lowest levels of detection of Penicillin, Streptomycin and Tetracyclin were .01 UI/ml, 0.1 mcg/ml and .05 mcg/ml respectively. In the second experiment, different combinations of antibiotics were added to milk samples and the procedure specific for each antibiotic studied was applied to all samples. The result of each procedure was positive only to the sample that contained the specific antibiotic, and it was negative to the samples that lack the specific antibiotic, even though there were other antibiotics. It is concluded that the microbiological methods used are sensitive, specific and very reliable in detecting specific antibiotics in milk.

### Literatura citada

- ACUIRRE, L.E., V.N. DÍAZ y P.G. PÉREZ, 1980, Identificación y cuantificación microbiológica de penicilina en leche, VII Reunión de Provincia de Microbiología, *Sociedad Mexicana de Microbiología y Asociación Oaxaqueña de Microbiología y Química*, Oaxaca, p. 20.
- AOAC, 1980, Official Methods of Analysis, *Association of Official Analytical Chemists*, 13th Edition, Washington, D.C., 719-733.
- "Diario Oficial" del 24 de septiembre de 1976, Reglamento para el Control Sanitario de la Leche, *Secretaría de Salubridad y Asistencia*, Estados Unidos Mexicanos.
- FREEMAN, K.A., P.D. JOHNSON and M.A. GERTH, 1977, Assuring reliable performance of antibiotic assay media, *IAOAC*, 60(6):1261.
- KRAMER, J., G.G. CARTER, B. ARRET, J. WILNER, W.W. WRIGHT and A. KIRSHBAUM, 1968, Antibiotic residues in milk, dairy products, and Animal Tissues, *Methods, Reports and Welfare*, Washington, D.C., 20204.
- MUCIÑO, H.C. y G.A. TRUJILLO, 1978, Determinación de antibióticos en leche proveniente del municipio de Toluca y cinco pasteurizadoras adyacentes, *Reunión Btannual de Microbiología, Asociación Mexicana de Microbiología y Escuela de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México*, Toluca, Méx., 13.
- VELÁZQUEZ, F. y M. PÉREZ, 1978, Estabilidad de residuos de diferentes antibióticos en leche, *Reunión Anual de Investigación en Medicina Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias*, SARH.
- VELÁZQUEZ, Q.F., M. PÉREZ y R. GONZÁLEZ, 1979, Frecuencia y proporción en que se encuentran antibióticos residuales en leche que se consume en el área Metropolitana, *Reunión Anual del Area Médica del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias*, SARH, Dic. 22.
- VELÁZQUEZ, Q.F., M. PÉREZ y R. GONZÁLEZ, 1980a, Antibióticos residuales en leche, frecuencia y proporción en que se encuentran en leche que se consume en el área Metropolitana, *VII Reunión de Provincia de Microbiología de la Sociedad Mexicana de Microbiología y la Asociación Oaxaqueña de Microbiología y Química*, Oaxaca, 20.
- VELÁZQUEZ, Q.F., M. PÉREZ, R. GONZÁLEZ, 1980b, Investigación de residuos de antibióticos en leche pasteurizada y envasada que se consume en el área Metropolitana, *Salud Pública de México*, 22(1):91.