

**DISTRIBUCION DE ANTIBIOTICOS, AGREGADOS
EXPERIMENTALMENTE A LA LECHE, EN LOS DERIVADOS
CREMA, CASEINA Y SUERO**

FRANCISCO VELÁZQUEZ Q.¹
MARCELO PÉREZ D.²

Recientemente Velázquez, Pérez y González (1980) realizaron la detección de residuos de antibióticos en la leche pasteurizada que se consume en el área metropolitana del D.F. Estos autores encontraron que todas las muestras analizadas contenían por lo menos uno de los tres antibióticos en estudio, Penicilina, Estreptomina y Tetraciclina, lo que constituye un peligro potencial para la salud pública, ya que puede ocasionar sensibilidades y reacciones alérgicas, además de la aparición de cepas patógenas resistentes a los antibióticos. De aquí surgió la idea de hacer un muestreo semejante de los derivados de la leche: crema, mantequilla y queso.

El objetivo de este trabajo fue conocer de qué manera se distribuye en estos derivados el antibiótico contenido en la leche, agregado experimentalmente, como paso previo al muestreo que se propone realizar.

Se trabajó con leche libre de antibióticos, obtenida de vacas no tratadas con antibióticos y analizada previamente por las mismas técnicas que se siguieron en este trabajo, y que más adelante se describen, a

Recibido para su publicación el 20 de enero de 1982.

¹ Departamento de Bacteriología y Micología, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (INIP), Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH), Apdo. Postal 41-652, Palo Alto, 05110, México, D.F.

² Departamento de Ruminología Básica, INIP-SARH, Apdo. Postal 41-652, Palo Alto, 05110, México, D.F.

la que se agregaron por cada 100 ml de leche:

- 1) 10 UI de Penicilina G Procaína (0.1 UI/ml)
- 2) 100 mg de Estreptomina (1.0 mg/ml)
- 3) 40 mg de Tetraciclina (0.4 mg/ml)

Para la separación de las fracciones crema, caseína y suero, se empleó el siguiente procedimiento:

CREMA: Se centrifugaron 100 ml de leche medida y pesada en frasco de centrifuga tarado, a 4 000 rpm durante 20 minutos, a 4C, se decantó la leche descremada y se pesó la crema en el frasco tarado.

CASEINA: La leche descremada se decantó en frasco de centrifuga tarado, se pesó y se le agregaron 4 ml de agua destilada que contenían 15 mg de cuajo y 0.05 ml de CaCl₂ al 1% (Kosikowski y Mocquot, 1958). Se dejó el frasco en baño maría a 37C durante 2 horas. Se dejó enfriar 15 minutos a la temperatura ambiente y se cortó la cuajada; se centrifugó a 3 000 rpm durante 10 minutos, a 4C. Se decantó el suero en un vaso tarado; se pesó la caseína en el frasco tarado en el que se cuajó.

SUERO: Se pesó.

La preparación de las diferentes fracciones obtenidas de la leche para la valoración

ción de los residuos de antibióticos que contenían, se hizo siguiendo la metodología descrita por Kramer *et al.* (1968):

I. Preparación de la crema para determinar su contenido de:

a) Penicilina. A la crema pesada se le agregó dos veces su peso de solución amortiguadora de fosfatos N° 1, al 1%, con pH 6.0 y se homogeneizó la mezcla (Factor de dilución, F = 3).

b) Estreptomina. A la crema pesada se le agregó dos veces su peso de solución amortiguadora de fosfatos N° 3, 0.1 M, de pH 8.0 y se homogeneizó la mezcla (Factor de dilución, F = 3).

c) Tetraciclina. A la crema pesada se le agregó 2 veces su peso de solución amortiguadora de fosfatos N° 4, 0.1 M, de pH 4.5 y se homogeneizó la mezcla (Factor de dilución, F = 3).

II. Preparación de la caseína para determinar su contenido de:

a) Penicilina. Se pesó una alícuota de 5 g de caseína y se le agregaron 20 g de solución amortiguadora de fosfatos N° 1 al 1% de pH 6.0, se molió el material en mortero estéril y se centrifugó a 3 000 rpm durante 10 minutos; se empleó el sobrenadante para el análisis (Factor de dilución, F = 5).

b) Estreptomina. A una alícuota de 5 g de caseína se le agregaron 20 g de solución amortiguadora de fosfatos N° 3, 0.1 M, de pH 8.0; el material se molió en mortero estéril y se centrifugó a 3 000 rpm durante 10 minutos; se empleó el sobrenadante para el análisis (Factor de dilución, F = 5).

c) Tetraciclina. A una alícuota de 5 g de caseína se le agregaron 20 g de solución amortiguadora de fosfatos N° 4, 0.1 M, de pH 4.5; el material se molió en mortero y se centrifugó a 3 000 rpm durante 10 minutos. Se empleó el sobrenadante para el análisis (Factor de dilución, F = 5).

III. Preparación del suero para determinar su contenido de:

a) Penicilina. Se empleó el suero sin modificación.

b) Estreptomina. En una alícuota del suero se ajustó el pH a 8.0, con solución 1N de NaOH (se consideró la muestra sin dilución debido al poco volumen empleado de NaOH).

c) Tetraciclina. A una alícuota de 5 g de suero se le agregaron 10 g de solución amortiguadora de fosfatos N° 4, 0.1 M, de pH 4.5; se homogeneizó la mezcla (Factor de dilución, F = 3).

Las formulaciones de las soluciones amortiguadoras de fosfatos se encuentran en Kramer *et al.* (1968).

Los análisis de residuos de antibióticos se efectuaron con las técnicas microbiológicas de cilindro en placa establecidas en este laboratorio, basadas en la descripción de Kramer *et al.* (1968). Se hicieron 40 repeticiones por cada antibiótico.

A continuación se resumen las técnicas microbiológicas de cilindro en placa para el análisis de residuos de los antibióticos Penicilina, Estreptomina y Tetraciclina empleadas en este trabajo.

I. Penicilina. En caja Petri de 100 × 20 mm se vaciaron 10 ml de medio base N° 1, de pH 6.6, mantenido fluido en baño maría a 48-50C; se dejó solidificar el medio y se agregaron 4 ml de medio inóculo de *Sarcina lutea* ATCC-9341, mantenido fluido en baño maría a 48-50C. Se colocaron 6 cilindros equidistantes en un radio de 2.8 cm. En tres cilindros alternos se vaciaron 250 ml de solución estándar de referencia de Penicilina, con 0.05 UI/ml; en los 3 cilindros alternos restantes se vaciaron 250 ml de la muestra preparada. Se incubó a 30C durante 18 horas y se midió el diámetro de las zonas de inhibición.

II. Estreptomina. En caja Petri de 100 × 20 mm se vaciaron 10 ml de medio

base N° 34, de pH 8.0, mantenido fluido en baño maría a 48-50C; se dejó solidificar el medio y se agregaron 4 ml de medio inóculo de *Bacillus subtilis* ATCC-6633, mantenido fluido en baño maría a 48-50C. Se colocaron 6 cilindros equidistantes en un radio de 2.8 cm. En 3 cilindros alternos se vaciaron 250 ml de solución estándar de referencia de Estreptomicina en leche, con 0.5 mg/ml; en los 3 cilindros alternos restantes se vaciaron 250 ml de la muestra preparada. Se incubó a 37C durante 18 horas y se midió el diámetro de las zonas de inhibición.

- III. Tetraciclina. En caja de 100×20 mm se vaciaron 10 ml de medio base N° 8, de pH 5.8, mantenido fluido en baño maría a 48-50C; se dejó solidificar y se agregaron 4 ml de medio inóculo de *Bacillus cereus mycoides* ATCC-11778, mantenido fluido

en baño maría a 48-50C. Se colocaron 6 cilindros equidistantes en un radio de 2.8 cm. En 3 cilindros alternos se vaciaron 250 ml de solución estándar de referencia de Tetraciclina, con 0.2 mg/ml; en los 3 cilindros alternos restantes se vaciaron 250 ml de la muestra preparada. Se incubó a 30C durante 18 horas y se midió el diámetro de las zonas de inhibición.

Las formulaciones de los medios de cultivo se encuentran en Kramer *et al.* (1968).

Los resultados se presentan en el Cuadro 1, en el que se expresan el valor medio de 40 repeticiones en UI/ml y en mg/ml y el error estándar; estos mismos valores en %, la razón porcentual entre el porciento de antibiótico valorado y el porciento de la fracción de la leche en que fue valorado; en la última columna está la recuperación total de cada antibiótico, in-

CUADRO 1

Distribución de Penicilina, Estreptomicina y Tetraciclina en crema, caseína y suero provenientes de leche adicionada por separado con 10 UI de Penicilina, 100 mg de Estreptomicina y 40 mg de Tetraciclina por 100 ml

	Crema		Caseína		Suero		Recuperación total
	Prom. ¹	Error Est.	Prom. ¹	Error Est.	Prom. ¹	Error Est.	
Penicilina UI/ml	0.134	0.04	0.24	0.06	0.07	0.05	
%	8.72	2.24	41.17	3.16	50.13	4.88	100.02
% Penicilina							
% Fracc. leche	1.22		2.21		0.72		
Estreptomicina Mg/ml	1.40	0.21	2.42	0.39	0.61	0.11	
%	8.47	3.00	38.55	12.30	49.39	5.38	96.41
% Estreptomicina							
% Fracc. leche	1.42		2.50		0.64		
Tetraciclina Mg/ml	0.75	0.41	1.75	1.68	0.20	0.16	
%	10.66	2.43	45.64	11.05	43.74	9.86	100.04
% Tetraciclina							
% Fracc. leche	1.68		2.87		0.56		

¹ Promedio de 40 repeticiones.

La crema constituyó el 6.17%, la caseína el 16.49% y el suero el 77.28%, en promedio de la leche.

tgrado por la suma de la recuperación del antibiótico en cada fracción de la leche.

La proporción promedio de cada fracción de la leche en el total de 120 separaciones fue la siguiente: crema, 6.17%; caseína, 16.49%; suero, 77.28%.

Las observaciones sobresalientes en este cuadro de resultados son:

La recuperación de Penicilina y Tetraciclina fue casi 100%, la recuperación de Estreptomycin fue casi 96%.

Considerando la razón porcentual del porcentaje de antibiótico valorado entre el porcentaje de la fracción de la leche en que se valoró, se puede notar que aproximadamente la mitad de cada antibiótico es retenido por la caseína, en tanto que aproximadamente la tercera parte había quedado en la crema. Probablemente la caseína retiene mayor cantidad de antibióticos por la dificultad de ellos para salir de la estructura molecular de la caseína.

Por los resultados obtenidos resalta el interés que tiene muestrear los derivados de la leche: crema, mantequilla y quesos, para establecer la proporción de residuos de antibióticos que contienen, como primer paso para que se llegue a ejercer mejor control sobre estos productos.

Summary

In order to evaluate Penicillin, Streptomycin and Tetracycline residues in dairy

Literatura citada

- KOSIKOWSKI, F.V., MOCQUOT, G., 1958, Recientes Progresos en Tecnología de Quesos, *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*.
- KRAMER, J., G.C. CARTER, B. ARRET, J. WILNER, N.W. WRIGHT and A. KIRSBAUM, 1968, Antibiotic Residues in Milk, Dairy Products and Animal Tissues: Methods Reports and Proto-

products such as cream, butter and cheese, a preliminar partition experiment was carried out. The purpose of this first step was to find out how much of each added antibiotic to milk remains in cream, casein and whey.

Milk cream was obtained by centrifugation, casein was obtained by coagulation with rennet and CaCl_2 at 37C for 2 hrs, centrifuged, decanted and weighted. Decantation and weight were used for whey.

Microbiological cilinder plate methods were carried out in the evaluation of Penicillin, Streptomycin and Tetracycline. 40 repetitions for each antibiotic were made.

Results are presented in Table 1 showing mean values in IU/ml, Ug/ml and percentage.

Antibiotic residues rate (%) on milk fraction (%) and total recuperation of each antibiotic also appear in Table 1.

Mean proportion of the different milk fractions are mentioned according to 120 separations each: 6.17% cream, 16.49% casein and 77.28% whey.

From these data the authors conclude that Penicillin, Streptomycin and Tetracycline were recuperated almost totally (100%) from the three separated fractions of milk for each antibiotic.

In general, casein retained almost half the total of antibiotic added while cream had retained one third of the added antibiotic.

- cols, *Department of Health, Education and Welfare*, Washington, D.C., 20204, U.S.A.
- VELÁZQUEZ, Q.F., M. PÉREZ D. y R. GONZÁLEZ S., 1960, Investigación de residuos de antibióticos en leche pasteurizada y envasada que se consume en el área metropolitana, *Sal. Publ. Méx.*, XXII, 91.