

**Efecto de Penicilinas y Tetraciclinas en Leche
sobre el Crecimiento de *Lactococcus lactis*,
Lactococcus cremoris y *Streptococcus
thermophilus***

Luis Alonso Alfaro Sanabria

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2007

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA

**Efecto de Penicilinas y Tetraciclinas en
Leche sobre el Crecimiento de *Lactococcus
lactis*, *Lactococcus cremoris* y *Streptococcus
thermophilus***

Proyecto de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por:

Luis Alonso Alfaro Sanabria

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

El autor concede a Zamorano
permiso para reproducir y distribuir copias
de este trabajo para fines educativos. Para otras
personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor

Luis Alonso Alfaro Sanabria

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

**Efecto de Penicilinas y Tetraciclinas en Leche sobre el
Crecimiento de *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris* y
*Streptococcus thermophilus***

Presentado por:

Luis Alonso Alfaro Sanabria

Aprobado:

Wilfredo Domínguez, M.Sc.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Carrera Agroindustria Alimentaria

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A Dios, el cual se merece toda la honra y gloria por todos los siglos.

A mis padres, Luis Rivera y Corina Sanabria.

A mis hermanos, Esaú (Q.D.D.G.), Aarón, Leví, Dina, Lucy y Delcia.

A mis sobrinos.

A mis amigos Jairo, Marvin, Harland, Sharon y Keren.

A mis maestros.

A mis amigos y amigas zamoranos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso por todo lo que me ha dado y por guiar mis pasos todo el tiempo.

A mis amados padres Corina Sanabria y Luis Rivera, por todas sus oraciones e inolvidables consejos.

Al Ing. Jose Antenor Romero por sus consejos y apoyo invaluable.

A mis asesores por su tiempo, paciencia y apoyo.

A mis wifes en Zamorano por su amistad.

A don Rigoberto Rubio y Rigoberto Silva por su ayuda prestada en la planta de lácteos.

A Axel Morales por su ayuda en la realización del experimento.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

Al Sr. Frederick Falk por su apoyo financiero durante mis cuatro años de estudio.

A la Secretaría de Agricultura y Ganadería (SAG) por su apoyo financiero durante mis cuatro años de estudio.

Al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) por su apoyo financiero en mi tercer año.

Al Ing. Antenor Romero por su apoyo financiero durante mi primer año de estudio.

RESUMEN

Alfaro, L. 2007. Efecto de penicilinas y tetraciclinas en leche sobre el crecimiento de *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris* y *Streptococcus thermophilus*. Proyecto de Graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria. Zamorano, Honduras. 37 p.

Dos de los antibióticos más utilizados por los productores pecuarios son las penicilinas y tetraciclinas. Existe un problema en cuanto a la residualidad que tienen estos antibióticos en la leche ya que afectan la calidad de la misma al ser utilizada en procesos que requieren su fermentación. El objetivo principal del estudio fue evaluar el efecto de penicilinas y tetraciclinas en el crecimiento de *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* y *Lactococcus cremoris*. Se hicieron inoculaciones de las bacterias contenidas en un sobre de inoculación directa de bacterias en proporción de 1×10^2 en comparación con concentraciones conocidas de penicilinas y tetraciclinas: 0.000, 0.025, 0.050, 0.075 y 0.100 ppm por cada antibiótico. La técnica de siembra utilizada fue el vertido. Para el análisis estadístico se utilizó un diseño completo al azar con arreglo factorial de 5×5 . La interacción de la mezcla de los dos antibióticos no fue significativa ($P > 0.05$). Se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) en el crecimiento bacteriano a partir de una concentración de 0.050 ppm por cada antibiótico. También se generaron dos modelos de regresión, uno de penicilina ($Y = -7.0955X + 1.9347$, $R^2 = 0.99$) y otro de tetraciclina ($Y = -5.5776X + 1.9592$, $R^2 = 0.98$). Se encontró que no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) entre el efecto de los dos antibióticos en el crecimiento de las bacterias. También se realizaron pruebas de la presencia de éstos antibióticos en el proceso de queso Cabaña, en donde se observó que afectaron en las horas de acidificación y rendimiento final.

Palabras claves: Antibióticos, rendimientos, ATECAL, BAL.

Wilfredo Domínguez, M.Sc.

CONTENIDO

Portadilla.....		i
Autoría.....		ii
Página de firmas.....		iii
Dedicatoria.....		iv
Agradecimientos.....		v
Agradecimientos a patrocinadores.....		vi
Resumen.....		vii
Contenido.....		ix
Índice de cuadros.....		x
Índice de figuras.....		xi
Índice de anexos.....		xii
1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	2
1.2	ANTECEDENTES.....	2
1.3	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	3
1.4	LÍMITES DEL ESTUDIO.....	3
1.5	OBJETIVOS.....	4
1.5.1	Objetivo general.....	4
1.5.2	Objetivos específicos.....	4
2.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1	BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	5
2.2	PENICILINAS.....	5
2.2.1	Origen.....	5
2.2.2	Mecanismo de acción.....	5
2.3	TETRACICLINAS.....	6
2.3.1	Origen.....	6
2.3.2	Mecanismo de acción.....	6
2.4	DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS.....	6
2.5	LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS.....	7
2.6	IMPORTANCIA DE LOS ANTIBIÓTICOS EN SALUD PÚBLICA.....	7
2.7	ESTUDIOS ANTERIORES.....	8
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1	LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO.....	9
3.2	MATERIALES Y EQUIPO.....	9
3.2.1	Materiales e insumos.....	9
3.2.2	Equipo.....	9

3.3	METODOLOGÍA.....	10
3.3.1	Preparación de solución madre de bacterias.....	10
3.3.2	Solución madre de tetraciclina (para 0.1 ppm).....	10
3.3.3	Solución madre de penicilina (para 0.1 ppm).....	11
3.3.4	Inculación.....	11
3.3.5	Análisis de rendimiento y horas de acidificación en queso cabaña.....	12
3.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	14
3.4.1	Diseño experimental.....	14
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1	ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS ANTIBIÓTICOS EN EL CRECIMIENTO DE <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> , <i>LACTOCOCCUS</i> <i>CREMORIS</i> Y <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i>	16
4.2	ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE ANTIBIÓTICOS.....	17
4.3	ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE CONCENTRACIONES DE LOS ANTIBIÓTICOS.....	17
4.4	MODELOS DE REGRESIÓN.....	18
4.5	ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS ANTIBIÓTICOS EN EL PROCESO DE QUESO CABAÑA (COTTAGE CHEESE).....	19
5.	CONCLUSIONES.....	21
6.	RECOMENDACIONES.....	22
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	23
8.	ANEXOS.....	25

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Efecto de antibióticos en procesos industriales.....	2
2.	Bacterias ácido lácticas importantes tecnológicamente.....	5
3.	Límite de detección de residuos empleando microorganismos.....	6
4.	Límites máximos de residuos.....	7
5.	Cuadro utilizado para hacer las inoculaciones en platos petri.....	12
6.	Diseño experimental (diseño completo al azar con arreglo factorial de 5x5).....	15
7.	Crecimiento en Log UFC/ml de <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactococcus cremoris</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> en respuesta de antibióticos presentes en el medio.....	16
8.	Valores D de penicilinas y tetraciclinas.....	17
9.	Comparación de medias de conteos de las bacterias con el efecto de penicilinas.....	17
10.	Comparación de medias de conteos de las bacterias con el efecto de tetraciclinas.....	18
11.	Efecto de penicilinas en tiempo de acidificación y rendimiento final en queso Cabaña.....	20
12.	Efecto de penicilinas en tiempo de acidificación y rendimiento final en queso Cabaña.....	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Flujo de proceso de queso cabaña.....	13
2.	Relación de crecimiento de UFC/ml (unidades formadoras de colonia) de <i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. cremoris</i> y <i>Strp. thermophilus</i> y concentraciones de penicilina.....	18
3.	Relación de crecimiento de UFC/ml (unidades formadoras de colonia) de <i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. cremoris</i> y <i>Strp. thermophilus</i> y concentraciones de tetraciclina.....	19

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1.	Análisis de varianza en SAS® para conteos de bacterias ácido lácticas con el efecto de penicilinas.....	26
2.	Análisis de varianza en SAS® para conteos de bacterias ácido lácticas con el efecto de tetraciclinas.....	26
3.	Análisis del efecto Penicilina*Tetraciclina en SAS®.....	26
4.	Prueba T para evaluar diferencias entre el efecto de penicilinas y el efecto de tetraciclinas en SAS®.....	27

1. INTRODUCCIÓN

Según Cercos (1957), los antibióticos son sustancias químicas producidas por organismos vivos, que actuando en bajas concentraciones poseen propiedades proteolíticas inhibitoras o letales y son selectivas sobre otros organismos vivos. El uso de los antibióticos es ampliamente difundido en la industria agrícola para diezmar o inactivar algunas bacterias patógenas que pueden afectar a plantas y animales. En el ganado lechero es común usar antibióticos como penicilinas, tetracilinas y sulfamidas para el tratamiento veterinario de enfermedades de origen bacteriano como la mastitis. El problema de tratar con antibióticos la enfermedad de la mastitis en el ganado, radica en la posible residualidad que tengan estos compuestos y sus efectos posteriores en la calidad de la leche.

Mariños (2000), sustenta que la cantidad de antibióticos que llega a la leche depende del tipo de preparado (componente activo y vehículo), dosis, forma de aplicación, producción de leche del animal tratado, tipo y grado de infección mamaria además del intervalo de tiempo que pasa entre el tratamiento y el ordeño. El uso de antibióticos en el ganado lechero ya sea oral, intramuscular o intravenosa, tiene menos importancia desde el punto de vista de higiene de leche que la aplicación por vía intramamaria. Esta última es la más utilizada para el tratamiento de la mastitis y está en contacto directo con los alvéolos de la ubre en la vaca.

Según Loor y Jones (2001), existen tres importantes consecuencias en uso de leche con antibióticos por las plantas procesadoras de leche:

1. Existe un bajo porcentaje de personas que son extremadamente sensitivas a los antibióticos (2%), lo que significa que dosis muy bajas pueden ser fatales. Algunas personas también son sensitivas a bajas concentraciones de medicamentos y pueden causar leves reacciones disconfortantes.
2. El continuado consumo de antibióticos en bajos niveles proveniente de alimentos contaminados, puede resultar en un incremento en el número de microorganismos resistentes a dichos antibióticos dentro del organismo humano y principalmente en aquellos individuos que no son alérgicos a estos antibióticos.
3. Los antibióticos interfieren con el crecimiento de los cultivos iniciadores que se utilizan en la fabricación de productos fermentados.

1.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Existen muchos problemas asociados con los residuos de antibióticos en la leche de vaca que se utiliza para consumo humano y para la elaboración de otros derivados lácteos como los productos fermentados con cultivos de bacterias ácido lácticas (BAL). La presencia de antibióticos en la leche que va a ser fermentada, baja el rendimiento de las bacterias fermentativas que son susceptibles a estos compuestos químicos y pueden detener su crecimiento. Disminuye la acidificación del producto, que es una característica importante en estos alimentos, por consiguiente tenemos un deterioro en la calidad y rendimientos de productos como quesos, cremas, yogurt y otros productos ácidos.

1.2 ANTECEDENTES

Estudios realizados por: Krack y Tolle (1967), han demostrado que las principales bacterias utilizadas en la industria láctea son susceptibles de manera total o parcial a ciertas concentraciones de antibióticos en la leche, en la siguiente tabla se muestra la inhibición de algunas bacterias causada por antibióticos.

Cuadro 1. Efecto de antibióticos en procesos industriales.

CULTIVO	INHIBICION POR ANTIBIÓTICOS					
	PENICILINA		ESTEPTOMICINA		CLORTETRACICLINA	
	u.i./ml		gamas/ml		gamas/ml	
	parcial	total	parcial	total	parcial	total
<i>Strp. Cremoris</i>	0.05-0.17	0.1-0.5	-	-	-	-
<i>Strp. Lactis</i>	-	-	-	-	-	0.5
<i>Strp. Thermophilus</i>	0.0017-0.17	0.025-0.05	0.5-5.0	-	0.001-0.01	0.3
<i>Lb. Acidophilus</i>	0.3-0.6	0.1-0.3	-	-	-	0.3-0.5
<i>Lb. Casei</i>	0.3-0.6	0.05-5.0	-	-	-	0.05
<i>Lb. helveticus</i>	0.3	-	0.1-0.5	-	-	-
<i>Lb. lactis</i>	-	0.05-0.3	-	-	-	0.3-3.0
Cultivo	0.017	-	0.1-0.2	-	0.01	-
mantequilla	0.17	-	-	-	0.1	-
Cultivo inicial	0.2	0.02	0.04	-	0.02	-
para quesos	0.05	0.5	-	-	0.025	-

Ref.: Krack y Tolle, 1967.

Según Mariños (2000), las bacterias que producen yogurt, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* son dos de los cultivos más sensibles a los antibióticos. Estas bacterias, por efecto de los antibióticos, presentan cambios morfológicos y puede darse el caso de que cultivos iniciadores sean reemplazados por otros microorganismos indeseables.

Los cambios más importantes que se dan con bajos niveles de antibióticos en la leche, causan diferentes tipos de defectos en los quesos: productos sin sabor, textura desigual, formación desigual de la cuajada y tienden a presentar una fermentación ácido butírica. En productos de leches fermentadas, el efecto de antibióticos es una inhibición de la formación de ácido y consecuentemente una disminución de la formación de aroma. (Salmínen y Wright, 1998).

1.3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La importancia de conocer el efecto de los antibióticos en el desarrollo y crecimiento de cultivos de bacterias ácido lácticas, radica en la cantidad de productos alimenticios que son elaborados a base de la fermentación que éstas bacterias realizan. Existen regulaciones impuestas sobre los Límites Máximos de Residuos (LMR) de los diferentes antibióticos que se encuentran en la leche que nos dicen las concentraciones máximas que pueden ser aceptadas para el consumo humano. La mayoría de las pruebas rápidas hechas en plantas procesadoras, consisten en métodos rápidos cualitativos de antibióticos, sin embargo no se cuantifican los antibióticos que contiene la leche, por lo tanto no tienen forma de saber cuánto y cómo les afectarán concentraciones leves de antibióticos a la hora de elaborar productos fermentados. El presente análisis ayudará a las plantas procesadoras de leche, principalmente a aquellas que se dedican a la elaboración de productos fermentados utilizando bacterias ácido lácticas para este propósito.

1.4 LÍMITES DEL ESTUDIO

- El experimento se limitó a evaluar el efecto de dos antibióticos solamente.
- Solamente se evaluó un cultivo específico de bacterias ácido lácticas.
- Solo fue posible evaluar rendimiento en un tipo específico de queso.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de cinco concentraciones de penicilinas y tetraciclinas sobre el crecimiento de *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris* y *Streptococcus thermophilus*.

1.5.2 Objetivos específicos

- Determinar si existen diferencias significativas entre el efecto de penicilinas y el efecto de tetraciclinas en el crecimiento de las bacterias.
- Determinar el efecto de la interacción de los dos antibióticos sobre el crecimiento de las bacterias.
- Determinar a que concentración de penicilinas y tetraciclinas se obtienen reducciones significativas en el crecimiento de UFC/ml (unidades formadoras de colonia) de *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris* y *Streptococcus thermophilus*.
- Formular un modelo de regresión para predecir el crecimiento microbiano de estas bacterias en (UFC/ ml) para el efecto de penicilinas y para el efecto de tetraciclinas.
- Determinar el efecto de los antibióticos en la leche sobre el rendimiento y horas de acidificación en queso Cabaña.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Según Cobo (2001), las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) son un grupo de bacterias gram positivas, las cuales secretan ácido láctico como un producto principal de fermentación en su medio. Estas son divididas en grupo homofermentativo y grupo heterofermentativo. Las especies homofermentativas rompen la glucosa a través de la ruta de la fructosa difosfato (glicólisis) casi exclusivamente a ácido láctico. Las bacterias ácido lácticas heterofermentativas rompen la glucosa a través de la ruta de la pentosa fosfato. Los productos finales, además del ácido láctico, son el ácido acético, el dióxido de carbono y el etanol (UNAL, 2005).

Cuadro 2. Bacterias ácido lácticas importantes tecnológicamente.

Familia	Género
Lactobacillaceae	Lactobacillus
Streptococcaceae	Streptococcus
	Pediococcus
	Leuconostoc
Actinomyceataceae	Bifidobacterium

Fuente: Kandler, 1983

2.2 PENICILINAS

2.2.1 Origen

Según Cobiella (1997), ésta fue descubierta por Alexander Fleming al observar accidentalmente como en un cultivo que realizaba, las bacterias desaparecían por el efecto del *Penicillium notatum*.

2.2.2 Mecanismo de acción

Según Patiño (1992), la penicilina impide la síntesis de la pared de los microorganismos al inhibir la enzima transpeptidasa, acción que evita la formación del peptidoglucano, y por lo tanto el entrecruzamiento de éste, que da rigidez y fuerza a la pared de la bacteria.

2.3 TETRACICLINAS

2.3.1 Origen

Las primeras tetraciclinas fueron desarrolladas a finales de la década de los años cuarenta, éstas fueron obtenidas a partir de microorganismos (*Streptomyces*) presentes en muestras de suelos recogidos en diferentes partes del mundo (González y Rodríguez, 1997).

2.3.2 Mecanismo de acción

Según Piñera (1998), las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas y son bacteriostáticas para muchas bacterias gram positivas y gram negativas. Actúan a nivel del ribosoma bacteriano, pero para que las mismas tengan acceso a éste es necesario su difusión pasiva por la membrana celular exterior a través de los poros hidrófilos, en el caso de la doxiciclina y la minociclina, que son más lipofílicas, pasan directamente por la doble capa de lípidos, pero en todos los casos se requiere de un segundo proceso dependiente de energía que transporta activamente todas las tetraciclinas a través de la membrana citoplasmática interna. Una vez en el interior de la célula bacteriana inhiben la síntesis de proteínas y se ligan a la subunidad 30S de los ribosomas, impiden el acceso del aminoacil RNAt al sitio aceptor del complejo RNAm ribosoma, y esto tiene como consecuencia la no adición de aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento.

2.4 DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

Según Camberos (1986), las pruebas realizadas para cuantificar antibióticos en leche determinan la presencia de éstos a ciertos niveles de concentración, en la siguiente tabla se muestran los límites de detección de residuos utilizando diferentes métodos.

Cuadro 3. Límite de detección de residuos empleando microorganismos.

ANTIBIÓTICOS	LIMITE DE DETECCIÓN	METODO EMPLEADO
Penicilinas	0.005 ppm	Galeslout, Delvotest
Cloxaciclina	0.03 ppm	Galeslout, Delvotest
Ampicilina	0.01 ppm	<i>Micrococcus luteus</i>
Oxitetraciclina	0.30 ppm	Galeslout, Delvotest
Cloranfenicol	0.50 ppm	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Estreptomina	0.30 ppm	<i>Bacillus subtilis</i>
Espiramicina	0.40 ppm	<i>Micrococcus luteus</i>
Bacitracina	0.05 UI	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Gentamicina	0.10 ppm	<i>Bacillus subtilis</i>

Ref.: Camberos, 1986

2.5 LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS

El codex alimentarius ha establecido los límites máximos de residuos de antibióticos en leche y su ingesta diaria aceptada (IDA), los cuales se encuentran en el siguiente cuadro:

Cuadro 4. Límites máximos de residuos.

Droga antimicrobial	Test de detección nivel/rango (µg/kg)		LMRs (µg/kg)		CODEX IDA (µg/kg) peso corporal
	EU	US	EU	US	
	Zulfametazina	10-50	-	100 ^a	
Gentamicina	30-100	-	100	-	20
Tilosina	40	-	50	-	-
Tetraciclinas					
Clortetraciclina	-	225-275	-	300	30
Oxitetraciclina	150-300	125-175	100 ^b	300	30
Tetraciclina	-	50-70	-	300	30
β-lactámicas					
Cepaspirina	-	13.7	-	20	-
Cetiofur	-	46	-	50	50
Ampicilina	-	8.5	-	10	-
Amoxicilina	-	5.6	-	10	-
Penicilina G	3-4	3.6	4	5	30 µg/día

Recursos: adaptado por Charm Sciences Inc., USA y website de la comisión del Codex Alimentarius

^aDrogas totales de sulfas

^bDrogas totales de tetraciclinas

2.6 IMPORTANCIA DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LA SALUD PÚBLICA

Según la OEA (2003), los antibióticos presentes en la leche pueden provocar los siguientes efectos en el consumidor:

- Alteración de la flora intestinal
- Estimulación de bacterias antibiótico-resistentes
- Desarrollo de microorganismos patógenos
- Reducción de la síntesis de vitaminas

2.7 ESTUDIOS ANTERIORES

Anteriormente ha habido estudios en los cuales se ha identificado la presencia de diversos antibióticos y su concentración en la leche. Según el estudio de Díaz (2004), en la que cuantificó la cantidad de tetraciclinas (TC) y oxitetraciclinas (OTC) de los proveedores de la planta de lácteos de Zamorano, demostró que el 40% de las muestras analizadas de tetraciclinas (TC) y 13.75% de las muestras de oxitetraciclinas (OTC) arrojaban concentraciones mayores a los Límites Máximos de Residuos (LMR).

La Organización de los Estados Americanos (OEA, 2003), afirma que la producción de productos fermentados es la más afectada en la industria cuando en la leche recibida están presentes residuos de antibióticos, provocando grandes pérdidas en calidad y, por ende, económicas. La presencia de antibióticos ocasiona los siguientes problemas en los productos fermentados:

Queso y productos fermentados

- Demora en la acidificación
- Demora en la coagulación
- Coagulación deficiente
- Disminución de la retención de agua
- Desarrollo de microorganismos indeseables
- Alteración de las características normales del producto:
 - cuerpo débil
 - textura blanda
 - sabor amargo (excesiva acción del cuajo)
 - consistencia arenosa (yogurt)
- Interferencia en la formación de aroma en mantequilla fermentada

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio bacteriológico se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. La toma de muestras de leche descremada y las pruebas pertinentes a la medición de rendimientos de quesos se realizaron en la Planta de Lácteos de Zamorano.

3.2 MATERIALES Y EQUIPO

3.2.1 Materiales e insumos

- Cultivo de bacterias ácido lácticas CHOOZIT RA 22 LYO 250 DCU (DVS). Composición: *Lc. lactis*, *Lc. cremoris* y *St. thermophilus*. lote 4470 359 631. Fabricante: Danisco, Francia
- Medio de Cultivo (LB Agar)
- Antibióticos:
 - Tetraciclina Overbiotic L.A.
 - Penicilina G Benzatina Unicil L-A 2, 400,000 UI
- Agua destilada estéril
- Agua peptonada
- Leche descremada al 0.5%
- Cloruro de calcio CAL-SOL[®]. Fabricante: Chr. Hansen. Lote #120706CC
- Cuajo láctico CHY-MAX[®]. Fabricante: Chr. Hansen. Lote #2693082
- Sorbato de potasio. Fabricante: PRIMA S.A. Costa Rica. Lote #20051118
- Crema ácida
- Sal refinada

3.2.2 Equipo

- Balanza electrónica Acculab VIC-711. Fabricante: Sartorius Group.
- Platos Petri
- Tubos de ensayo
- Erlenmeyers
- Micro pipetas
- Liras

- Balón de 500 y 1000 ml
- Marmita NATL. Modelo: MKDT-20T. No. de serie: 6147-7H-01. Cleveland Range Ltd.
- Termómetro InfraPro[®]. Fabricante: Oakton. No de serie: 90050301

3.3 METODOLOGÍA

El experimento consistió en establecer una relación entre el crecimiento de un cultivo iniciador de bacterias ácido lácticas (*Lc. lactis*, *Lc. cremoris* y *Strp. thermophilus*) y concentraciones de diferentes antibióticos. Para realizar el experimento se inocularon, utilizando la técnica de siembra vertido (*Pour Plate*), cultivos iniciadores de bacterias ácido lácticas contenidos en un sobre de DVS (Direct Vat Set) diluidos en una proporción de 1:10², en diferentes medios de agar no selectivo (LB agar) y concentraciones conocidas de los antibióticos (tetraciclinas, penicilinas). Para evaluar el crecimiento de las bacterias se hicieron conteos de las mismas 48 horas después de la siembra. Para la realización del experimento se preparó una solución madre de las bacterias ácido lácticas y una solución madre de cada uno de los antibióticos.

3.3.1 Preparación de solución madre de las bacterias:

- a) Se tomó 1 gr. del cultivo y se colocó en 100 ml de caldo LB. Luego se incubó por 24 hr. a 38 °C. (Solución “1”, 10⁸ UFC/ml).
- b) Después se hicieron tres diluciones:
 - 1) Primera dilución (10⁶ UFC/ml): Se transfirió 1 ml del cultivo de bacterias previamente incubado (solución “1”) a un erlenmeyer con 99 ml de agua peptona. (Solución “2”).
 - 2) Segunda dilución (10⁴ UFC/ml): Se transfirió 1 ml de la solución “2” a un erlenmeyer con 99 ml de agua peptona. (Solución “3”).
 - 3) Tercera dilución (10² UFC/ml): Se transfirió 1 ml de la solución “3” a un erlenmeyer con 99 ml de agua peptona, esta es la solución madre.

3.3.2 Solución madre de tetraciclina (para 0.1 ppm)

- a) Primer dilución (2x10⁻³ g/ml): Se obtuvo 1 ml del frasco de tetraciclinas (0.2 g/ml) y se transfirió a un erlenmeyer con 99 ml de agua destilada estéril (solución “1”).
- b) Segunda dilución (2x10⁻⁵ g/ml): Se obtuvo 1 ml de la solución “1” y se transfirió a un erlenmeyer con 99 ml de agua destilada estéril (solución “2”).
- c) Tercera dilución (2x10⁻⁶ g/ml): Se obtuvo 1 ml de la solución “2” y se transfirió a un erlenmeyer con 9 ml de agua destilada estéril, esta es la solución madre.
- d) Para obtener 0.1 ppm, se extrajo 1 ml de la solución madre y se agregó 18 ml de medio LB (para que sumase 20mL con todo y muestra).
- e) Para las demás concentraciones se hizo una regla simple directa para obtener la cantidad requerida de antibiótico por concentración:
 - Para obtener 0.025 ppm = se agregó 0.25 ml de antibiótico
 - Para obtener 0.05 ppm = se agregó 0.5 ml de antibiótico

-Para obtener 0.075 ppm = se agregó 0.75 ml de antibiótico

3.3.3 Solución madre de penicilina (para 0.1 ppm)

- a) Primer dilución (2.5×10^{-3} g/ml): Se obtuvo 1 ml del frasco de penicilinas (0.25 g/ml) y se transfirió a un erlenmeyer con 99 ml de agua destilada estéril (solución "1").
- b) Segunda dilución (2.5×10^{-5} g/ml): Se obtuvo 1 ml de la solución "1" y se transfirió a un erlenmeyer con 99 ml de agua destilada estéril (solución "2").
- c) Tercera dilución (2×10^{-6} g/ml): Se obtuvo 1 ml de la solución "2" y se transfirió a un erlenmeyer con 9 ml de agua destilada estéril, esta es la solución madre.
- d) Para obtener 0.1 ppm, se extrajo 0.8 ml de la solución madre y se agregó 18.2 ml de medio LB (para que sumase 20 mL con todo y muestra).
- e) Para las demás concentraciones se hizo una regla simple directa para obtener la cantidad requerida de antibiótico por concentración:
 - Para obtener 0.025 ppm = se agregó 0.2 ml de antibiótico
 - Para obtener 0.05 ppm = se agregó 0.4 ml de antibiótico
 - Para obtener 0.075 ppm = se agregó 0.6 ml de antibiótico

3.3.4 Inoculación:

El método de siembra utilizado fue el vertido (*Pour Plate*), primero se sembraron las bacterias (1 ml / cada plato), al sembrar las bacterias se tuvo el cuidado de homogenizar bien la solución madre. Luego se colocaron los antibióticos, cuya cantidad varió de acuerdo a la concentración requerida (ver pasos 3.3.2 d y 3.3.3 d).

Después se colocó el medio (LB agar), al igual que los antibióticos la cantidad varió de acuerdo a la concentración de antibiótico a la que se necesitó llegar. Por último se homogenizaron bien las muestras. Para facilitar la siembra se diseñó el siguiente cuadro de siembras, en donde aparece especificado la cantidad en ml de bacterias, de antibiótico y de medio LB por cada tratamiento:

Cuadro 5. Cuadro utilizado para hacer las inoculaciones en platos petri.

		PENICILINAS PPM				
		*0	0.025	0.05	0.075	0.1
TETRACICLINAS PPM	*0	¹ 1	1	1	1	1
		² 0	0.2	0.4	0.6	0.8
		³ 19	18.8	18.6	18.4	18.2
	0.025	1	1	1	1	1
		0.25	0.45	0.65	0.85	1.05
		18.75	18.55	18.35	18.15	17.95
	0.050	1	1	1	1	1
		0.5	0.7	0.9	1.1	1.3
		18.5	18.3	18.1	17.9	17.7
	0.075	1	1	1	1	1
		0.75	0.95	1.15	1.35	1.55
		18.25	18.05	17.85	17.65	17.45
	0.1	1	1	1	1	1
		1	1.2	1.4	1.6	1.8
		18	17.8	17.6	17.4	17.2

* Concentración de penicilinas y tetraciclinas según tratamiento

¹ ml de solución madre de bacterias por cada tratamiento

² ml de solución madre de penicilinas y tetraciclinas según tratamiento

³ ml de medio (LB agar)

3.3.5 Análisis de horas de acidificación y rendimiento en queso Cabaña (Cottage cheese)

Se hicieron pruebas de rendimiento de queso Cabaña en las cuales se evaluaron 3 tratamientos por antibiótico: 0 (control), 0.025 y 0.05 ppm de penicilina y tetraciclina. Se hicieron 10 lt. de leche por tratamiento, a la leche utilizada se le hizo la prueba de Delvotest SP® (AOAC performance tested method, 930703) para verificar que no tuviera presencia de antibióticos. Durante el tiempo de incubación se midió la acidez titulable expresada como ácido láctico (ATECAL) cada dos horas, además se midió el tiempo total para alcanzar acidez (0.60 ATECAL) y Kg. finales de queso obtenido.

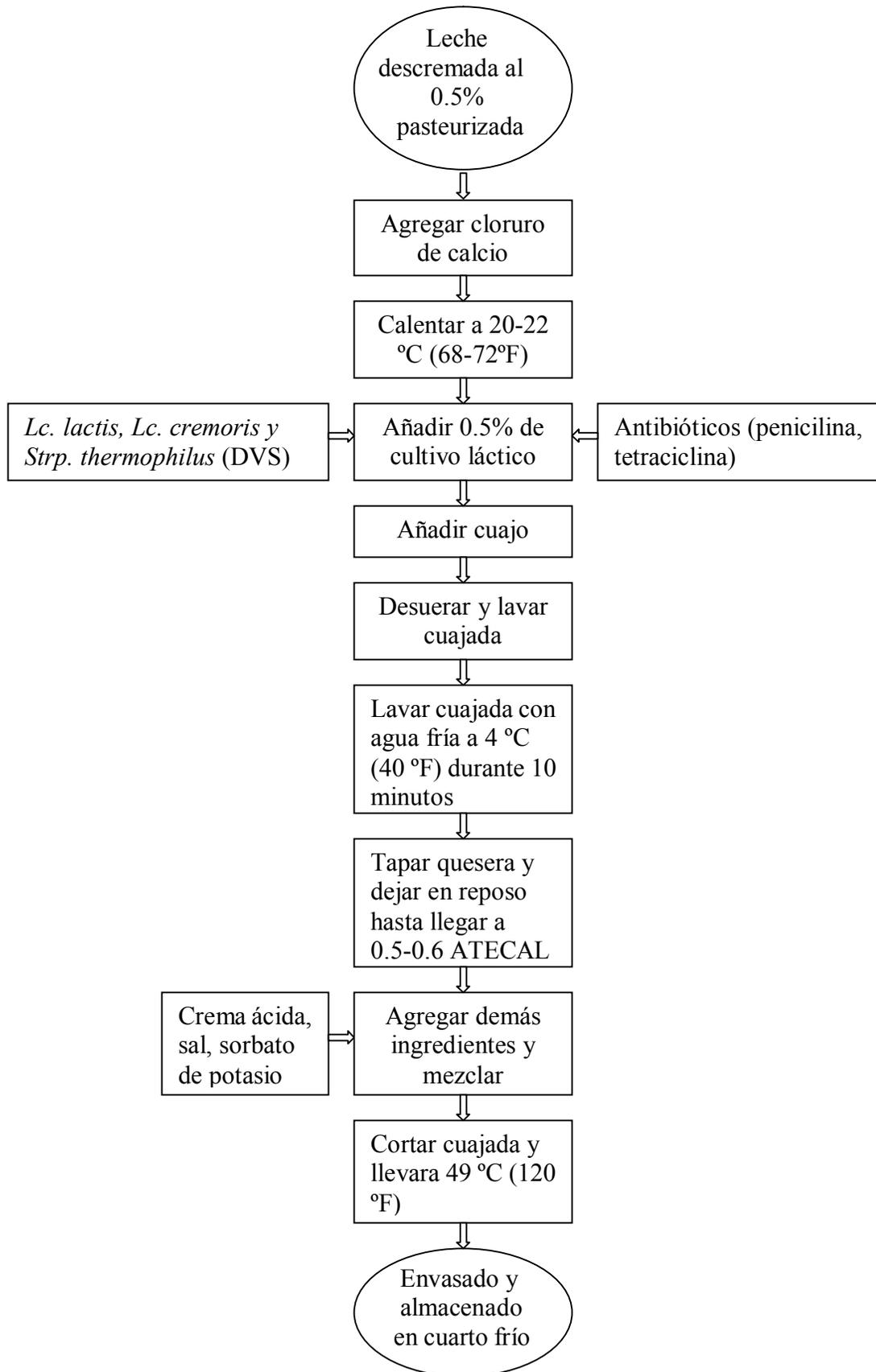


Figura 1. Flujo de proceso de queso Cabaña.

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron con el programa estadístico SAS® con un nivel de confianza de 95%, el diseño estadístico utilizado fue el de Diseño Completamente al Azar (DCA) con un arreglo factorial de 5X5. Para evaluar diferencias entre el efecto de las penicilinas y el efecto de tetraciclinas se realizó una prueba T en la cual se comparó el valor D de penicilina y el valor D de tetraciclina.

Cálculo del valor D

En esterilización el valor D es el tiempo requerido para reducir la población microbiana en un logaritmo, por lo cual en el caso de este estudio, se hizo una homología del valor D. En este caso ese valor es la concentración de penicilinas o tetraciclinas para reducir la población de bacterias en un logaritmo. El valor D es el inverso del negativo de la pendiente (P) de la recta que se forma al graficar Log (N/N₀) versus las concentraciones de los antibióticos:

$$\begin{aligned} -1/D &= P \\ D &= -1/P \end{aligned}$$

Además se realizaron dos regresiones utilizando la herramienta Microsoft Excel®, en donde X = concentración del antibiótico (penicilinas y tetraciclinas) y Y = Log UFC/mL de Bacterias Acido Lácticas.

Modelo de Regresión: $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1$

Donde:

β_0 = Intercepto

β_1 = Antibiótico (penicilina o tetraciclina)

X = Concentración de antibiótico (penicilinas o tetraciclinas) en ppm

Y = Crecimiento de las bacterias ácido lácticas en Log UFC/ml

3.4.1 Diseño experimental

El estudio llevado a cabo fue medir el efecto de dos tipos de antibióticos (tetraciclinas y penicilinas) con cinco niveles de concentraciones en el crecimiento de UFC/ml (unidades formadoras de colonia) de *Lc. lactis*, *Lc. cremoris* y *Streptococcus thermophilus*. Se obtuvieron 25 tratamientos y se realizaron tres repeticiones por cada uno, dando un total de 75 unidades experimentales.

Cuadro 6. Diseño experimental (diseño completo al azar con arreglo factorial de 5x5).

		PENICILINAS PPM				
		0 (control)	0.025	0.05	0.075	0.1
TETRACICLINAS PPM	0 (control)	T1	T2	T3	T4	T5
		R1	R1	R1	R1	R1
		R2	R2	R2	R2	R2
	R3	R3	R3	R3	R3	
	0.025	T6	T10	T11	T12	T13
		R1	R1	R1	R1	R1
		R2	R2	R2	R2	R2
	R3	R3	R3	R3	R3	
	0.05	T7	T14	T15	T16	T17
		R1	R1	R1	R1	R1
		R2	R2	R2	R2	R2
	R3	R3	R3	R3	R3	
	0.075	T8	T18	T19	T20	T21
		R1	R1	R1	R1	R1
		R2	R2	R2	R2	R2
R3	R3	R3	R3	R3		
0.1	T9	T22	T23	T24	T25	
	R1	R1	R1	R1	R1	
	R2	R2	R2	R2	R2	
R3	R3	R3	R3	R3		

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS ANTIBIÓTICOS EN EL CRECIMIENTO DE *LACTOCOCCUS LACTIS*, *LACTOCOCCUS CREMORIS* Y *STREPTOCOCCUS TERMOPHILUS*

El efecto de la interacción de los dos antibióticos no fue significativo ($P>0.05$), por lo cual solo se tomó en cuenta el efecto de la penicilina y tetraciclina por separado. Esta interacción no fue significativa debido a que existe un antagonismo entre la penicilina y la tetraciclina cuando se mezclan. Según Jackson, Reyes y Cordiés (1998), el ejemplo de antagonismo más frecuente entre 2 antibióticos se refiere a la combinación de un bactericida activo en la pared celular (penicilina) con un bacteriostático potente que inhiba la síntesis proteica (tetraciclina), porque para que los medicamentos tipo penicilinas ejerzan su efecto mortal, es necesario que las células estén en crecimiento.

En el cuadro 7 se puede observar que con el efecto de penicilina se obtuvieron 0.70 reducciones logarítmicas de las bacterias al ir aumentando las concentraciones desde 0 hasta 0.1 ppm, mientras que con el efecto de tetraciclina se obtuvieron 0.53 reducciones logarítmicas a medida aumentaron las concentraciones de tetraciclina desde 0 hasta 0.1 ppm. Se obtuvieron menores conteos con el tratamiento de penicilina y ausencia de tetraciclina que con el tratamiento de tetraciclina y ausencia de penicilina.

Cuadro 7. Crecimiento de Log¹UFC/ml de *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris* y *Streptococcus thermophilus* en respuesta de antibióticos presentes en el medio (Agar Luria-Bertani).

*Tetraciclinas ppm	*Penicilinas ppm				
	0.000	0.025	0.050	0.075	0.100
0.000	² 1.93 ± 0.67	1.77 ± 0.74	1.56 ± 0.65	1.40 ± 0.59	1.23 ± 0.70
0.025	1.85 ± 0.76	1.24 ± 0.79	1.22 ± 0.75	1.24 ± 1.07	1.39 ± 0.79
0.050	1.70 ± 0.62	1.47 ± 0.75	1.41 ± 0.82	1.48 ± 0.62	1.36 ± 0.77
0.075	1.52 ± 0.61	1.32 ± 0.43	1.43 ± 0.56	1.16 ± 0.79	1.23 ± 0.51
0.100	1.40 ± 0.66	1.43 ± 0.42	1.34 ± 0.75	1.28 ± 0.70	0.94 ± 0.82

*Concentración de antibiótico

¹Unidades formadoras de colonia

²Conteo de bacterias (Log UFC/ml) promedio de tres repeticiones y desviación estándar.

4.2 ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE ANTIBIÓTICOS

Para analizar la diferencia entre el efecto de la penicilina y el efecto de la tetraciclina en el crecimiento de las bacterias se realizó un cálculo del valor D (concentración de antibiótico necesaria para reducir la población de bacterias en 1 Log) para el efecto de penicilinas y tetraciclinas individualmente para cada repetición.

Cuadro 8. Valores D de penicilinas y tetraciclinas.

Antibiótico	¹Valor D
Penicilina	² 0.14±0.024
Tetraciclina	0.19±0.004

¹Concentración de antibiótico necesaria para reducir la población de bacterias 1 Log

²Promedio y desviación estándar

Con estos datos se realizó una prueba T cuyo resultado fue que no hubo diferencia significativa (P=0.0556) entre los valores D de penicilina y los valores D de tetraciclina.

4.3 ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE CONCENTRACIONES DE LOS ANTIBIÓTICOS

Se hizo una separación de medias Tukey para evaluar las diferencias entre los tratamientos analizados para cada antibiótico.

Cuadro 9. Comparación de medias de conteos de bacterias (*Lc. lactis*, *Lc. cremoris* y *Strp. thermophilus*) con el efecto de Penicilina.

Concentración Penicilina (ppm)	¹Medias de conteos de bacterias (Log ²UFC/ml)
0.000	1.93449a
0.025	1.77158a
0.050	1.56090b
0.075	1.39840bc
0.100	1.23414c

¹Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (P>0.05)

²Unidades formadoras de colonia

En cuanto a la penicilina, como se observa en el cuadro 9, a partir de una concentración de 0.05 ppm se observan reducciones significativas en el crecimiento de las bacterias ácido lácticas comparando con el control (0.000 ppm).

Cuadro 10. Comparación de medias de conteos de bacterias (*Lc. lactis*, *Lc. cremoris* y *Strp. thermophilus*) con el efecto de Tetraciclina.

Concentración Tetraciclina (ppm)	¹ Medias de conteos de bacterias (Log ² UFC/ml)
0.000	1.93449a
0.025	1.84627ab
0.050	1.70057b
0.075	1.51925c
0.100	1.40079c

¹Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (P>0.05)

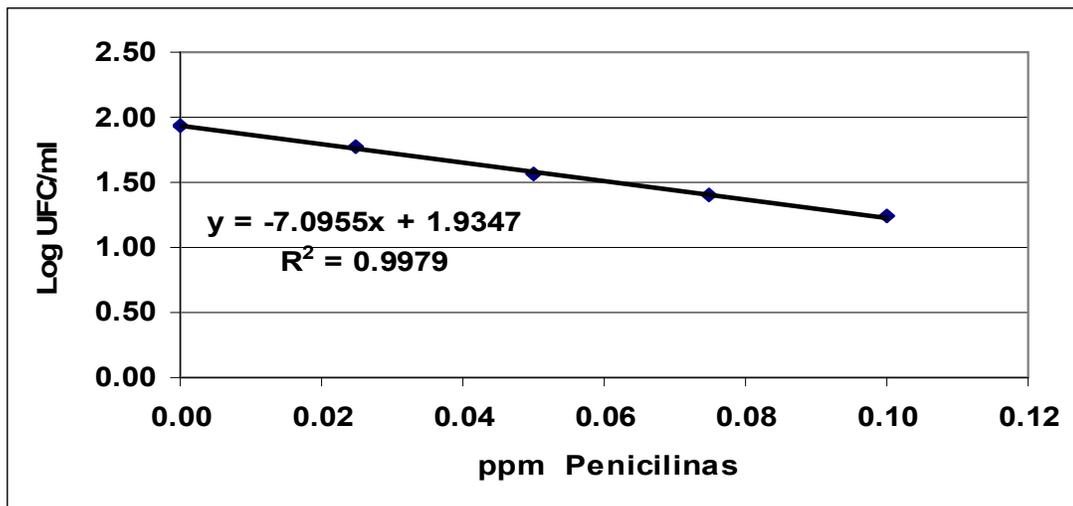
²Unidades formadoras de colonia

Al igual que las penicilinas el efecto de tetraciclinas, como se observa en el cuadro 10, presenta reducciones significativas en el crecimiento de las bacterias a partir de 0.05 ppm comparado con el control (0.000 ppm), por lo cual se concluye que no hubo diferencia entre el efecto de los dos antibióticos.

4.4 MODELOS DE REGRESIÓN

Se hicieron dos modelos de regresión, uno para el efecto de penicilina y otro para el efecto de tetraciclina.

Figura 2. Relación de crecimiento de UFC/ml (unidades formadoras de colonia) de *Lc. lactis*, *Lc. cremoris* y *Strp. thermophilus* y concentraciones de penicilina.

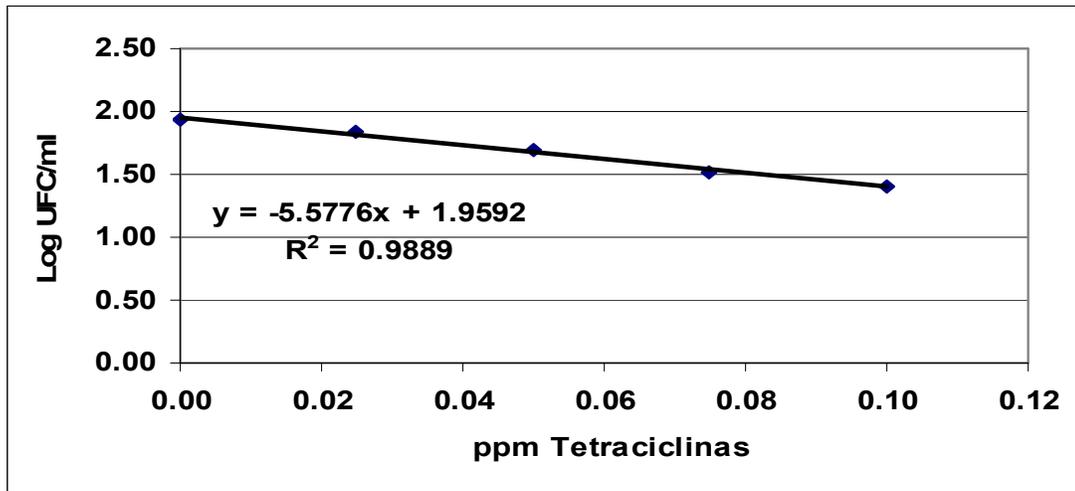


Se analizaron concentraciones conocidas de penicilina entre 0 y 0.1 ppm, en la figura 2 se puede observar que por cada ppm de penicilina en el medio se obtiene una reducción logarítmica de 7.09.

La ecuación obtenida para predecir el crecimiento de las bacterias es:

$$Y = -7.0955X + 1.9347$$

Figura 3. Relación de crecimiento de UFC/ml (unidades formadoras de colonia) de *Lc. lactis*, *Lc. cremoris* y *Streptococcus thermophilus* y concentraciones de tetraciclina.



Al igual que con penicilina, se analizaron 5 diferentes concentraciones conocidas de tetraciclina entre 0 y 0.1 ppm. Según la figura 3, por cada ppm de tetraciclina en el medio se obtiene una reducción logarítmica de 5.57 de las bacterias.

La ecuación obtenida mediante el análisis es la siguiente:

$$Y = -5.5776X + 1.9592$$

4.5 ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS ANTIBIÓTICOS EN EL PROCESO DE QUESO CABAÑA

Según los resultados obtenidos, se puede observar que los antibióticos tuvieron un efecto directo aumentando el tiempo para alcanzar acidez, además afectaron en el rendimiento ya que las bacterias ácido lácticas al no crecer adecuadamente no producen la acidez necesaria y se produce una coagulación deficiente. También se afectó la textura final del queso ya que con la presencia de antibióticos se obtuvieron quesos con textura muy blanda.

Estudios hechos por la OEA (2003) argumentan que los antibióticos tienen efectos muy fuertes en el desarrollo de quesos y productos fermentados, éstos causan demoras en acidificación, coagulación deficiente y una disminución en la retención de agua, lo que interfiere con las características normales del producto.

En los cuadros 11 y 12 se puede observar que las penicilinas tuvieron un mayor efecto que las tetraciclinas, ya que con el efecto de las penicilinas se aumentaron las horas para llegar a acidez adecuada (0.6 ATECAL) y se obtuvieron rendimientos menores.

Cuadro 11. Efecto de penicilinas en tiempo de acidificación y rendimiento final en queso Cabaña.

Penicilina (ppm)	¹ATECAL	²Total horas	³Rendimiento
*0.00	0.60	16.00	2.00 Kg. (20%)
0.025	0.60	19.00	1.20 Kg. (12%)
0.050	0.60	21.00	1.00 Kg. (10%)

*Control

¹Acidez titulable expresada como ácido láctico (ATECAL)

²Horas para llegar a acidez adecuada para este tipo de queso (0.60 ATECAL)

³Rendimiento obtenido de queso Cabaña

Cuadro 12. Efecto de tetraciclinas en tiempo de acidificación y rendimiento final en queso Cabaña.

Tetraciclina (ppm)	¹ATECAL	²Total horas	³Rendimiento
*0.00	0.60	16.00	2.10 Kg. (21%)
0.025	0.60	17.00	1.30 Kg. (13%)
0.050	0.60	19.00	1.20 Kg. (12%)

*Control

¹Acidez titulable expresada como ácido láctico (ATECAL)

²Horas para llegar a acidez adecuada para este tipo de queso (0.60 ATECAL)

³Rendimiento obtenido de queso Cabaña

5. CONCLUSIONES

- Se observó una tendencia que a mayor concentración de antibióticos hay un menor crecimiento de las bacterias (*Lc. lactis*, *Lc. cremoris* y *Strp. thermophilus*).
- No se encontró diferencia significativa ($P = 0.0556$) entre el efecto de las penicilinas y tetraciclinas sobre el crecimiento de las bacterias del estudio.
- El efecto de la interacción de los dos antibióticos no fue significativo ($P > 0.05$).
- Ambos antibióticos mostraron una reducción significativa en el crecimiento de las bacterias del estudio a partir de 0.05 ppm.
- El modelo de regresión calculado para determinar el crecimiento de *Lc. lactis*, *Lc. cremoris* y *Strp. thermophilus* relacionado a concentraciones de penicilina en el medio fue: $Y = -7.0955X + 1.9347$, en donde X = concentración de penicilina y Y = crecimiento de bacterias.
- El modelo de regresión calculado para determinar el crecimiento de *Lc. lactis*, *Lc. cremoris* y *Strp. thermophilus* relacionado a concentraciones de tetraciclina en el medio fue: $Y = -5.5776X + 1.9592$, en donde X = concentración de tetraciclinas y Y = crecimiento de bacterias.
- Al haber estos antibióticos en el proceso de queso Cabaña Zamorano, se aumentaron las horas para lograr acidez (0.6 ATECAL) y se obtuvieron rendimientos menores.

6. RECOMENDACIONES

- Analizar el efecto de los antibióticos del estudio sobre otros cultivos de bacterias ácido lácticas para observar su comportamiento.
- Realizar estudios con otros antibióticos para evaluar su efecto en las bacterias ácido lácticas.
- Analizar el efecto de los antibióticos estudiados en este estudio en otros productos fermentados como yogurt o crema ácida.
- Realizar el estudio con más repeticiones para determinar si existen o no diferencias significativas en el efecto de los antibióticos del estudio sobre el crecimiento de las bacterias.
- Realizar la validación de las ecuaciones generadas para predecir crecimiento de las bacterias con diferentes concentraciones de antibióticos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Camberos, L. 1986. Residuos de fármacos en productos de origen animal (en línea). Consultado el 8 de septiembre de 2007. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/bovinotecnia/BtRgClig011>
- Cercos, A. 1957. Los antibióticos y sus aplicaciones agropecuarias. Barcelona, ES, Salvat. 475 p.
- Cobiella, N. 1996. La penicilina (en línea). Consultado el 10 de agosto de 2007. Disponible en: <http://www.educar.org/inventos/Penicilina.asp>
- Cobo, J. 2001. Bacterias saludables (en línea). Consultado el 8 de septiembre de 2007. Disponible en: http://www.sedca.es/publicaciones/revista_marzo_02/VCongreso_publicaciones/Conferencias/Monografia%20Danone
- Codex Alimentarius. 2007. Residuos de medicamentos veterinarios en alimentos (en línea). Consultado el 2 de septiembre de 2007. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/mrls/vetdrugs/jsp/vetd_q-s.jsp
- Díaz, F. 2004. Análisis de Residuos de Tetraciclinas y Oxitetraciclinas en la Leche Cruda de Proveedores de la Planta de Lácteos de Zamorano. Tesis Ing. Agr. Zamorano, HN, Zamorano. 38p.
- Gonzalez, J.; Rodríguez, M. 1998. Tetraciclinas (en línea). Consultado el 10 de agosto de 2007. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act11198.htm
- Jackson, L.; Reyes, L.; Cordiés, M. 1998. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana (en línea). Consultado el 21 de septiembre de 2007. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act03198.htm
- Krack, W.; Tolle, L. 1967. Contaminación de la leche por antibióticos (en línea). Consultado el 10 de agosto de 2007. Disponible en: http://www.science.oas.org/OEA_GTZ/LIBROS/LA_LECHE/leche_all
- Loor, J; Jones, G. 2001. Prevención de Los Residuos de Medicamentos en La Leche y Vacas de Entresaque. Virginia Cooperative Extension. publication w 404-403

- Mariños, H. 2000. Producción higiénica de la leche cruda. Guatemala, GT, Producción y servicios incorporados. 95p.
- OEA. 2003. Contaminación de leche por antibióticos (en línea). Consultado el 12 de septiembre de 2007. Disponible en: http://www.science.oas.org/OEA_GTZ/LIBROS/LA_LECHE/le_html/cap6_leche.htm
- Patiño, N. 1992. Actualidades farmacológicas: Penicilina. México, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM. 2 p
- Piñera, J. 1998. Tetraciclinas (en línea). Consultado el 8 de septiembre de 2007. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act11198.htm
- Salminen, S.; Wright, A. 1998. Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. New York, US, Marcel Dekker, 2 ed. 617 p.
- UNAL, 2005. Ciencia y tecnología de productos cárnicos y madurados (en línea). Consultado el 20 de agosto de 2007. Disponible en: http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronoma/2001819/lecciones/cap06/cap06_03.html

8. ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza en SAS[®] para conteos de bacterias con el efecto de penicilinas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-valor	Pr > F
Modelo	6	5.29635947	0.88272658	160.37	<.0001
Error	8	0.04403494	0.00550437		
Total correcto	14	5.34039441			
R-cuadrado	Coefficiente de variación	Raíz MSE	Log UFC media		
0.991754	4.695952	0.074191	1.579902		

Anexo 2. Análisis de varianza en SAS[®] para conteos de bacterias con el efecto de tetraciclinas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-valor	Pr > F
Modelo	6	5.07512665	0.84585444	251.08	<.0001
Error	8	0.02695136	0.00336892		
Total correcto	14	5.10207801			
R-cuadrado	Coefficiente de variación	Raíz MSE	Log UFC media		
0.994718	3.454345	0.058042	1.680272		

Anexo 3. Análisis del efecto Penicilina*Tetraciclina en SAS[®]

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
REP	2	22.81233341	11.40616670	259.07	<.0001
PENIC	4	1.42879902	0.35719976	8.11	<.0001
TETRA	4	1.04809977	0.26202494	5.95	0.0006
PENIC*TETRA	16	0.91979047	0.05748690	1.31	0.2327

Anexo 4. Prueba T para evaluar diferencias entre el efecto de penicilinas y el efecto de tetraciclinas en SAS[®]

The MEANS Procedure

Analysis Variable: DIF

Mean	Std Dev	t value	Pr > t
-0.0468	0.01995	-4.06	0.0556