

EFECTO DE LA PENICILINA Y ESTREPTOMICINA SOBRE CULTIVOS INICIADORES UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN DEL QUESO TIPO PALMITA VENEZOLANO

Effect of Penicillin and Streptomycin on Starter Cultures used in the Manufacture of Pasteurized Palmita-Type Venezuelan cheese

Lilibeth Cabrera Salas, Alexis Ferrer Ocando, Graciela Ojeda de Rodríguez y Betzabé Sulbarán de Ferrer

Laboratorio de Alimentos, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia
Apartado postal 526. Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. E-mail: cabrera@solidos.ciens.luz.ve

RESUMEN

Se estudió a nivel de planta piloto el efecto de diferentes concentraciones de penicilina y estreptomycin sobre la producción de ácido de once cepas de *Enterococcus faecalis* y siete cepas de *Lactobacillus casei* usadas como cultivos iniciadores en la manufactura de queso tipo Palmita con leche pasteurizada. Los microorganismos fueron cultivados en leche descremada reconstituida estéril, libre de antibióticos y conteniendo concentraciones conocidas de penicilina desde 0,008 a 1000 U.I./ml y 0,007 a 1 mg/ml de estreptomycin. La actividad de los cultivos fue medida en términos de acidez titulable después de una incubación a 35°C durante 18 h. Los resultados mostraron que el 18,2% de los cultivos con *E. faecalis* resultaron resistentes a concentraciones de 20 U.I./ml de penicilina, mientras que resultaron inhibidos a concentraciones de 40 U.I./ml; el 63,6% de los mismos cultivos fueron resistentes a concentraciones de 0,07 mg/ml de estreptomycin, mientras que fueron inhibidas por 0.1 mg/ml. El 28,6% de los cultivos con *L. casei* fueron resistentes a 10 U.I./ml de penicilina y el 42,9% fueron resistentes a 0.05 mg/ml de estreptomycin. Los cultivos con *L. casei* fueron más susceptibles a la penicilina y estreptomycin que los cultivos con *E. faecalis*. Sin embargo, hubo cepas de enterococos y lactobacilos que fueron muy susceptibles a ambos antibióticos, 5 U.I./ml y 0,5 U.I./ml de penicilina para los enterococos y lactobacilos, respectivamente, y 0,5 mg/ml y 0,03 mg/ml de estreptomycin para enterococos y lactobacilos, respectivamente. Se observaron variaciones entre especies y entre cepas de la misma especie. Las cepas de *E. faecalis* Ef8 y Ef9 y las cepas de *L. casei* L1 y L3, constituyen las cepas más recomendables en cultivos iniciadores en la

elaboración de queso tipo Palmita debido a su característica de mayor resistencia a los antibióticos analizados.

Palabras clave: Penicilina, estreptomycin, susceptibilidad, cultivos iniciadores, queso.

ABSTRACT

The effect of different concentrations of penicillin and streptomycin on the acid production of eleven strains of *Enterococcus faecalis* and seven strains of *Lactobacillus casei* used as starters in the manufacture of pasteurized Palmita-type cheese at a pilot plant scale, were studied. All microorganisms were cultured on reconstituted sterile skim milk free of antibiotics and containing known dilutions of penicillin from 0.008 to 1,000 I.U./ml and from 0.007 to 1 mg/ml of streptomycin. The activity of the cultures was measured in terms of titratable acidity after incubation at 35°C for 18 h. A total of 18.2% of the *E. faecalis* cultures were resistant to concentrations up to 20 I.U./ml of penicillin, being inhibited by 40 I.U./ml, and 63.6% were resistant to concentrations up to 0.07 mg/ml of streptomycin, being inhibited by 0.1 mg/ml. A total of 28.6% of *L. casei* cultures were resistant to 10 I.U./ml of penicillin, and 42.9% were resistant to 0.05 mg/ml of streptomycin. Lactobacilli were inhibited at lower concentrations than enterococci for both antibiotics. However, some strains of enterococci and lactobacilli were very susceptible to penicillin and streptomycin, 5 I.U./ml and 0.5 I.U./ml of penicillin for enterococci and lactobacilli, respectively, and 0.5 mg/ml and 0.03 mg/ml of streptomycin for enterococci and lactobacilli, respectively. Variations among species and among strains of the same species were noted. The *E. faecalis* strains Ef8 and Ef9, and the *L. casei* strains, L1 and L3, are considered the most appropriate to be used as starters

for Palmita-type cheese due to their resistance to the antibiotics studied in this work.

Key word: Penicillin, streptomycin, susceptibility, starter, cheese.

INTRODUCCIÓN

La presencia de residuos de antibióticos en la leche y en productos lácteos aparte de ser indeseable para el consumidor debido a que pueden provocar reacciones alérgicas y de resistencia [6], representa uno de los mayores problemas que afronta la Industria Láctea dado que dichos residuos pueden afectar la fermentación láctica por parte de los cultivos iniciadores utilizados en la fabricación de productos tales como queso, leche fermentada, yogurt y mantequilla [1, 11, 12, 14], lo que se traduce en una disminución de la acidez y un producto de calidad organoléptica no deseable [3]. La significación de la disminución de acidez en productos lácteos por presencia de antibióticos, ha sido reportada por numerosos autores [1, 12, 13] así como la ausencia de sabor y aroma [1, 15] como consecuencia de los mismos.

Entre los numerosos antibióticos, la penicilina y la estreptomycin son los más frecuentemente utilizados como terapéuticos veterinarios para el control de la mastitis [16], y si no hay un control sobre el ordeño de vacas tratadas, la leche cruda destinada a la elaboración de productos lácteos puede llegar a contener residuos de antibióticos. La penicilina y la estreptomycin, así como otros antibióticos han sido empleados con frecuencia en el estudio de microorganismos lácteos, con el objeto de evaluar el grado de resistencia. En este particular, Erkinyan y col. [8] mencionan la sensibilidad de cultivos en leche descremada con cepas de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactococcus lactis* frente a concentraciones de 0,1 U.I./ml de penicilina, lo cual causa disminución de la producción de acidez por parte de dichas bacterias. Ramakrishna y col. [15] resalta la sensibilidad que muestran los lactobacilos frente a la estreptomycin, aún en concentraciones de 0,5 µg/ml causando alteraciones en la actividad fermentativa de dichos microorganismos en cultivos iniciadores. Los efectos de la presencia de penicilina sobre la actividad de cultivos iniciadores con estreptococos y lactobacilos pueden ser más drásticos que aquellos causados por la estreptomycin. Se ha llevado a cabo una serie de investigaciones acerca de los controles a seguir para minimizar el efecto de los antibióticos en la leche. Uno de ellos es el uso de cultivos con cepas resistentes. El presente trabajo tiene como objetivo conocer el efecto de diferentes concentraciones de penicilina y estreptomycin sobre la actividad fermentativa de cepas de *Enterococcus faecalis* y *Lactobacillus casei* utilizadas como cultivos iniciadores en la elaboración del queso pasteurizado venezolano tipo Palmita. El resultado de esta investigación contribuirá con el desarrollo de la tecnología de la producción de dicho

queso, mediante el uso de cultivos iniciadores múltiples con cepas resistentes, que garantice la actividad fermentativa de los mismos durante el proceso de elaboración de dicho queso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos bacterianos

Once cepas de *Enterococcus faecalis* (Ef) y siete cepas de *Lactobacillus casei* (L), aisladas en otros estudios 4, 9, se cultivaron en leche descremada reconstituida estéril (LDRE con 10% sólidos, esterilizada a 112°C por 12 min) y se incubaron durante 18 h a 35°C y se mantuvieron como cultivos madres hasta el momento de su uso. El porcentaje de inóculo para ambas especies fue del 2%.

Resistencia a los antibióticos

Este ensayo se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Harrigan y Mc. Cance [11]. Para ello se utilizaron soluciones base de 10.000 U.I. de penicilina G/ml (Fischer) y de 400 mg de sulfato de estreptomycin/ml (Fischer), preparadas con agua destilada estéril. Los antibióticos fueron añadidos a 10 ml de LDRE con 10% sólidos, a las concentraciones siguientes: desde 1.000 U.I. hasta 0,008 U.I. de penicilina/ml, y desde 1 mg hasta 0,007 mg de estreptomycin/ml. Luego cada tubo fue inoculado con 2% de las cepas bacterianas (cultivos madres) e incubados a 35°C por 18 h. Como controles se utilizaron tubos con leche descremada y cepa bacteriana y tubos con leche descremada sin antibiótico y sin cepa bacteriana. Todas las muestras se hicieron por duplicado. La actividad de los cultivos se evaluó en base a la producción de acidez titulable. Los valores se graficaron como concentraciones del antibiótico (U.I. o mg/ml) contra acidez titulable (ml NaOH 0,1 N/100 ml).

Acidez titulable

Se determinó por titulación de 10 ml de un cultivo en LDRE con NaOH 0,1 N y 1 ml del indicador fenolftaleína al 0,5%. El resultado se reportó como ml de NaOH gastados por 100 ml de cultivo [11].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las FIGS. 1a y 1b, muestran el efecto de varias concentraciones de penicilina sobre la producción de ácidos de cultivos con *E. faecalis*. En ellas se observa que los enterococos resultaron inhibidos en su crecimiento a 5, 10, 20 y 40 U.I./ml de penicilina, donde el valor de acidez titulable fue comparable con la acidez de 14 que presentó el cultivo control de leche descremada sin antibiótico y sin cepa bacteriana. Este valor proviene de la titulación de los iones hidronios libres y de los hidronios potencialmente libres asociados a grupos carboxilos de ácidos (ácido láctico) y aminoácidos de las proteínas y pre-

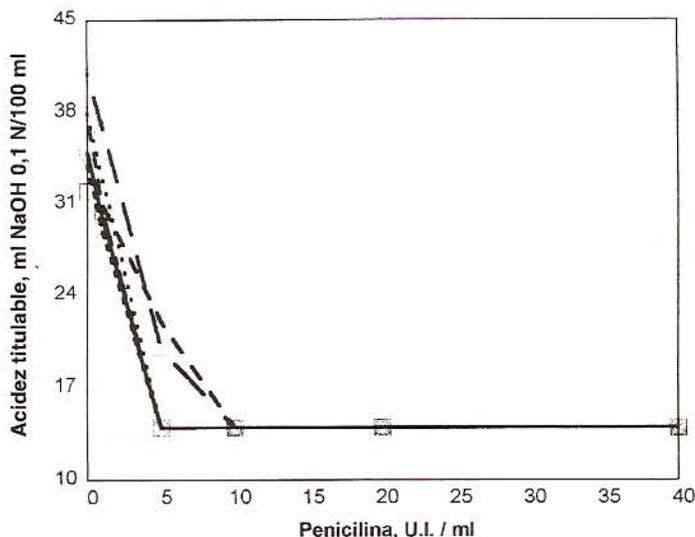


FIGURA 1A. EFECTO DE PENICILINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE CULTIVOS INICIADORES CONTENIENDO CEPAS DE *Enterococcus faecalis*. CEPAS INHIBIDAS A 5 ó 10 U.I./ml: Ef1 (O), Ef2 (□), Ef3 (◇), Ef5 (X), Ef7 (+) Y Ef10 (△).

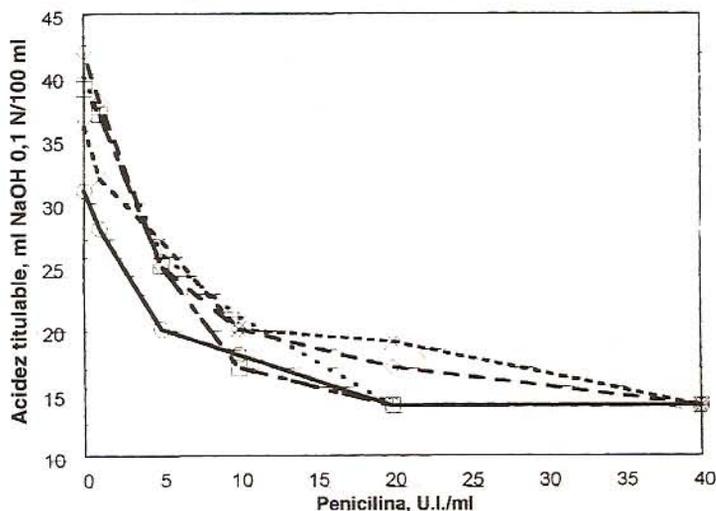


FIGURA 1B. EFECTO DE PENICILINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE CULTIVOS INICIADORES CONTENIENDO CEPAS DE *Enterococcus faecalis*. CEPAS INHIBIDAS A 20 ó 40 U.I./ml: Ef4 (O), Ef6 (□), Ef8 (◇), Ef9 (X), Ef11 (+).

sentó un valor típico [5]. El cultivo control con las cepas de *E. faecalis* mostró un valor promedio de acidez titulable de 37, el cual fue disminuyendo a medida que el crecimiento era afectado por el antibiótico. Las cepas de *E. faecalis* que mostraron mayor resistencia fueron Ef8 y Ef9, FIG.1b, lo que representa el 18,2%, resultando ser inhibidas en su crecimiento a concentraciones de penicilina de 40 U.I./ml. En dichas cepas además se observó que la velocidad de inhibición del crecimiento fue gradual en comparación con el resto de las cepas, a medida que se incrementaba la concentración de penicilina. En el caso de las cepas Ef4, Ef6 y Ef11 que resultaron sensibles a concentraciones de 20 U.I./ml de penicilina, se observa en la FIG. 1b que la línea de producción de acidez se hace más pronunciada a valores menores de penicilina, sobre todo por parte de la cepa Ef11. La concentración más baja que logró inhibir el

crecimiento de enterococos fue 5 U.I./ml de penicilina lo que representa el 36% de cepas sensibles. Resultados de sensibilidad a la penicilina de enterococos han sido reportados por otros autores. Según Garg y Mital [10] la mayoría de las especies del género *Enterococcus* resultan inhibidas por niveles de bencilpenicilina entre 50 y 1000 U.I./ml siendo su efecto bactericida. Por otro lado, Sonne y Jawetz [17], reportan la alta resistencia de cepas de *Enterococcus* a valores de 40 U.I./ml de penicilina. Batish y col. [2] mencionan también la alta resistencia a la penicilina de 51 cepas de *E. faecalis* var. *faecalis*, *E. faecalis* var. *zymogenes* y *E. faecium*, de un total de 59 cepas previamente aisladas de leche, queso, leche infantil, leche condensada y helado. La resistencia que pueden mostrar los enterococos frente a la penicilina, resulta debida a la actividad de la penicilinasas presente en estos microorganismos [10].

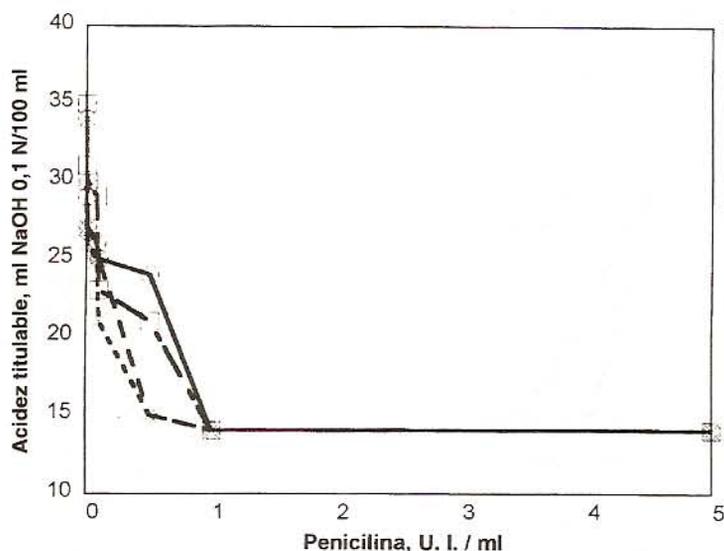


FIGURA 2A. EFECTO DE PENICILINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE CULTIVOS INICIADORES CONTENIENDO CEPAS DE *Lactobacillus casei*. CEPAS INHIBIDAS A 0,5 ó 1,0 U.I./ml: L2 (O), L4 (□), L6 (◇), Y L7(X).

En las FIGS. 2a y 2b, se observan los valores de acidez titulable obtenidos en cultivos con *L. casei*, por efecto de diferentes concentraciones de penicilina. Allí se observa que de las siete cepas estudiadas, L1 y L3, FIG. 2b, fueron las más resistentes, resultando inhibidas por concentraciones de 20 U.I./ml. Para las cepas de *L. casei*, el valor promedio de acidez titulable del control con la bacteria fue de 35. A diferencia de los enterococos, la concentración más baja de penicilina que logró inhibir a los lactobacilos fue 0,5 U.I./ml, FIG. 2a, lo que representa un 28,6% de cepas de *L. casei* sensibles. En general se observa que las cepas de *L. casei* resultaron más sensibles a la penicilina que las cepas de *E. faecalis*. En un estudio de sensibilidad a varios antibióticos entre los que estuvo la penicilina, cepas de *L. casei* resultaron sensibles a concentraciones de 0,1 U.I./ml de penicilina [8], es decir, niveles más bajos que los empleados en el presente trabajo.

Con respecto a los niveles de estreptomocina que resultaron inhibidores de la producción de ácidos por parte de cultivos con cepas de *E. faecalis*, se observa en las FIGS. 3a y 3b que siete de las once cepas (Ef2, Ef4, Ef5, Ef7, Ef8, Ef9 y Ef10) resultaron afectadas en su crecimiento por concentraciones de 0,1 mg/ml de estreptomocina. En este caso dichas cepas (63,6%) fueron las más resistentes. La concentración más baja de estreptomocina ensayada que logró inhibir el crecimiento de los enterococos fue 0,03 mg/ml y en este caso la cepa fue Ef1. Los resultados en general, difieren de lo reportado por Garg y Mital [10] los cuales mencionan que niveles de 0,02 mg/ml no resulta inhibitorio de los enterococos. Cabe señalar que para especies lácticas como los *Streptococcus* niveles de 1 mg/ml de estreptomocina puede incidir sobre la actividad fermentativa de dichos microorganismos en cultivos iniciadores [15]. En general, los enterococos analizados en este estudio, resultaron sensibles a concentraciones menores de

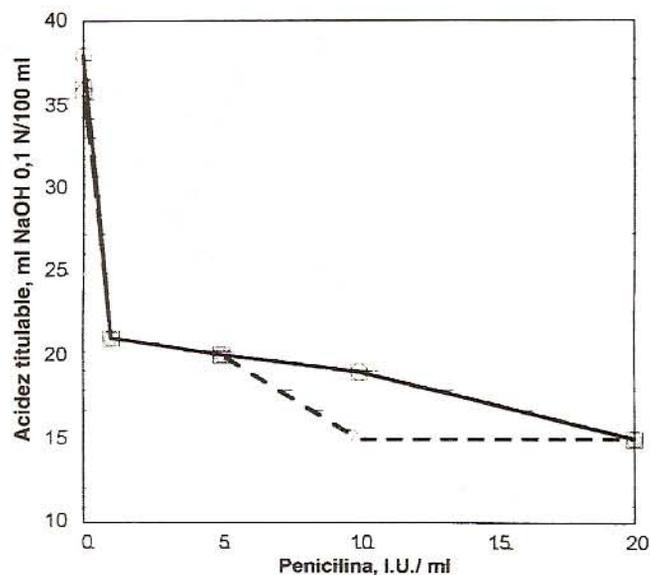


FIGURA 2B. EFECTO DE PENICILINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE CULTIVOS INICIADORES CONTENIENDO CEPAS DE *Lactobacillus casei*. CEPAS INHIBIDAS A 10 ó 20 U.I./ml: L1 (O), L3 (□), L5 (◇).

estreptomocina que las reportadas en la literatura. Batish y col. [2] resaltan la resistencia de los enterococos no solo a la estreptomocina sino a la penicilina e indican que existe una correlación entre tal resistencia con la actividad termonucleásica, alta resistencia al calor y producción de enterocinas.

La FIG. 4 muestra los resultados de la influencia de diferentes concentraciones de estreptomocina sobre cultivos con cepas de *L. casei*. En este caso, los lactobacilos analizados resultaron más sensibles que los enterococos, ya que un nivel

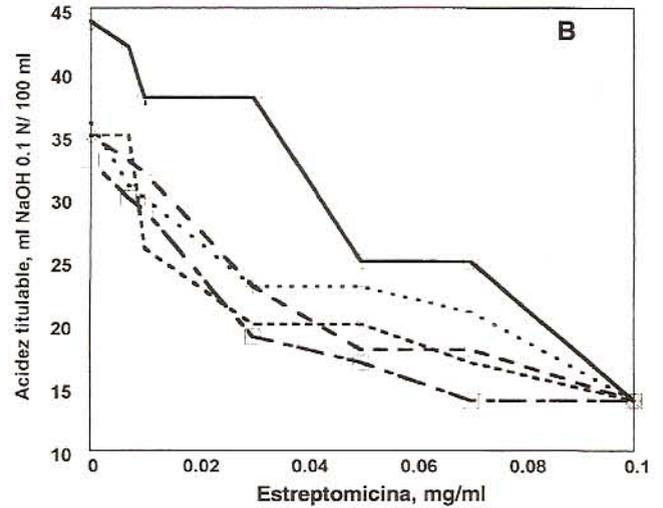
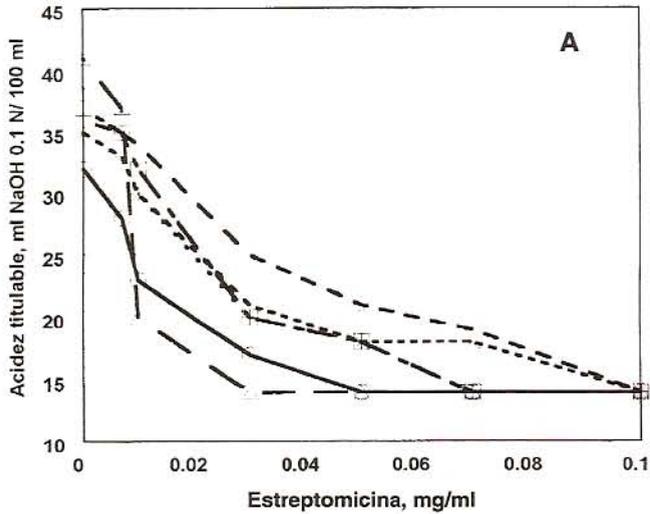


FIGURA 3. EFECTO DE ESTREPTOMICINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE CULTIVOS INICIADORES CONTENIENDO CEPAS DE *Enterococcus faecalis*.
(A) CEPAS INHIBIDAS A 0,03; 0,05; 0,07 ó 0,1 mg/ml: Ef1 (O), Ef3 (□), Ef4 (◊), Ef5 (X), Ef6 (+) Y Ef11 (Δ).
(B) CEPAS INHIBIDAS A 0,1 mg/ml: Ef2 (O), Ef7 (□), Ef8 (◊), Ef9 (X), Ef10 (+).

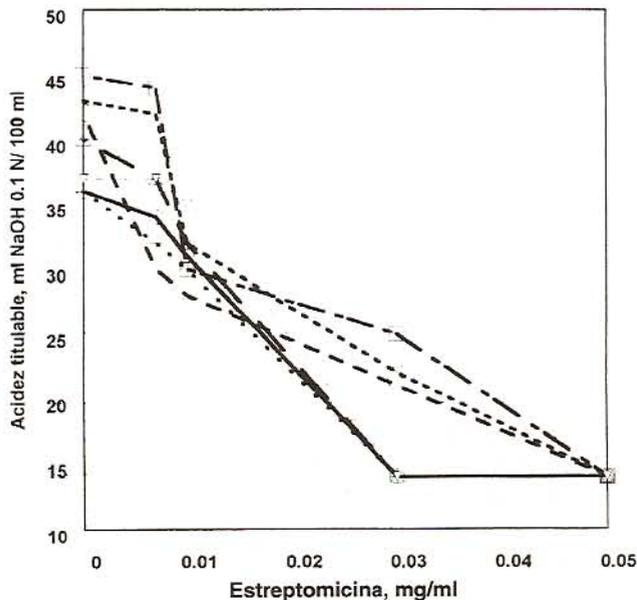


FIGURA 4. EFECTO DE ESTREPTOMICINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE CULTIVOS INICIADORES CONTENIENDO CEPAS DE *Lactobacillus casei*. CEPAS INHIBIDAS A 0,03 ó 0,05 mg/ml: L1 (O), L2 (□), L3 (◊), L4 (X), L5 (+), L6 (Δ) Y L7 (∇).

de 0,05 mg/ml logró inhibir completamente la actividad del 42,9% de los cultivos. El resto de las cepas fueron inhibidas a una concentración de 0,03 mg/ml. Estos resultados difieren de los reportados por Erkinlyan y col. [8] los cuales resaltan la sensibilidad de cepas de *L. casei* frente a concentraciones de 0,006 mg/ml de estreptomicina. Por otro lado, especies rela-

cionadas como *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus* también resultan afectadas en su producción de ácidos a concentraciones similares cuyo rango va de 0,001 a 0,005 mg/ml [15].

El conocimiento de los niveles de sensibilidad que presentan los cultivos iniciadores lácticos resultan de gran importancia [12] ya que facilitan la práctica de selección de cepas que mantengan la actividad fermentativa aún en presencia de niveles de antibióticos en la leche. En este sentido hay autores que mencionan niveles de 0,002 U.I. de penicilina por ml de leche y de 0,004-0,005 mg/ml de estreptomicina por ml de leche [6] Sin embargo, niveles mayores de estos dos antibióticos han podido ser detectados en leche de vaca utilizada en la elaboración de quesos [11], lo que trae como consecuencia fallas en el crecimiento normal de cultivos iniciadores utilizados en la industria de productos lácteos. Cogan [7] reporta la inhibición de la actividad fermentativa de cultivos iniciadores lácticos utilizados en la elaboración de yogurt y queso por presencia de niveles de estreptomicina de $3,5 \times 10^{-4}$ a 0,012 mg/ml en la leche destinada para la elaboración de dichos productos.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio indican que tanto la penicilina como la estreptomicina, a una determinada concentración, pueden tener efectos inhibitorios sobre la actividad fermentativa de especies lácticas utilizadas como cultivos iniciadores que puede afectar la velocidad de producción de compuestos, como ácidos orgánicos, relacionados con las características organolépticas de un alimento fermentado. El conocimiento de los niveles de sensibilidad antibiótica de los cultivos iniciadores favo-

rece la selección de aquellos cultivos con mayores niveles de resistencia que puedan asegurar un producto final con las características organolépticas deseables y así evitar grandes pérdidas económicas. En base a estas consideraciones las cepas Ef8, Ef9, L1 y L3 resultan las más adecuadas para este fin.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) por el soporte financiero recibido, al Personal del Laboratorio de Alimentos del Departamento de Química de la Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia por la contribución con equipos necesarios, y a Luis Jiménez Segura & Asociados, Ingenieros Consultores C.A., Maracaibo, por su colaboración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BABU, K.S.; SINGH, R.S.; CHANDER, H. Effect of antibiotic resistance on the flavour profile of lactic acid bacteria. **J. Dairy Res.** 56:155-157. 1989.
- [2] BASTISH, V.K.; CHANDER, H.; RANGANATHAN, B. Heat resistance and other characteristics of deoxyribonuclease positive Enterococci isolated from milk and milk products. **J. Food Sci.** 50: 834-835. 1985.
- [3] BRITO, C. Cultivos lácticos. Su influencia sobre la calidad físico-organoléptica de los quesos. **Aliment.** 15:61-65. 1990.
- [4] CABRERA, L.; FERRER, A. Evaluación de cepas de *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Enterobacter* como cultivos iniciadores para la elaboración de queso tipo Palmita Venezolano con leche pasteurizada. **Revista Científica, FCV-LUZ** Vol. IV, Nº 2: 73-78. 1994.
- [5] CABRERA, L.; FERRER, A. Contenido de acidez en leche descremada inoculada con cepas de *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae*. **Revista Científica, FCV/LUZ** Vol. VI, Nº1: 37-43. 1996.
- [6] CHAGONDA, L.S.; NDIKUWERA, J. Antibiotic residues in milk supplies in Zimbabwe. **J. Food Prot.** 52: 731-732. 1989.
- [7] COGAN, T.M. Susceptibility of cheese and yoghurt starter bacteria to antibiotics. **Appl. Microbiol.** 5: 960-961. 1972.
- [8] ERZINKYAN, L.A.; NIKOLOV, N.M.; PARKHLEVANYAN, M.SH.; CHARYAN, L.M. Effect of antibiotics and chemotherapeutic and antiseptic preparations on morphological properties of lactic acid bacteria from cheese starters. **Biol. Zhurnal Armenii.** 27:10-16. 1974.
- [9] FERRER, A.; URDANETA, D.; RINCÓN, Z.; CABRERA, L.; BASANTA, Y. Microflora isolated from Venezuelan "Palmita-type" cheese. **J. Food Prot.** 54: 856-860. 1991.
- [10] GARG, S.K.; MITAL, B.K. Enterococci in milk and milk products. **Critical Rev. Microbiol.** 18:15-45. 1991.
- [11] HARRIGAN, W.F.; McCANCE, M.E. **Métodos de Laboratorio en Microbiología de Alimentos y Productos Lácteos.** Academia León. España. 420 pp. 1987.
- [12] HSU, H.Y.; JEWETT, F.F.; CHARM, S.E. What is killing the bugs in your starter culture? **Cult. Dairy Prod. J.** 22: 20-21. 1987.
- [13] HEAP, H.A. Sensivity of starter cultures to penicillin and streptomycin en bulk-starter milk. **N. Z. J. Dairy Sci. Technol.** 17: 81-86. 1982.
- [14] LEONARD, C.; HUNTER, A.C.; FENLON, D.R. Transfer of antibiotics between the udder quarters of dairy cows treated for clinical mastitis. **J. Soc. Dairy Technol.** 41: 8-9. 1988.
- [15] RAMAKRISHNA, Y.; SINGH, R.S.; ANAND, S.K. Effect of streptomycin on lactic cultures. **Cult. Dairy Prod. J.** 20:12-13. 1985.
- [16] RODRÍGUES, R.; CARVALHO, F.D.; ANDRADE, M.A. Mastite bovina: sensibilidade de agentes etiológicos a antibióticos e quimioterápicos. **Arias Esc. Agron. Vet.** 14, 15 y 16: 69-78. 1986.
- [17] SONNE, M.; JAWETZ, F. Comparison of the action of ampicillin and benzympenicillin on enterococci in vitro. **Appl. Microbiol.** 16: 645-646. 1968.