

081022577

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL ^L

PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS
DE STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS Y LACTOBACILLUS
BULGARICUS AISLADAS DE YOGURT COMERCIAL

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

MARIO ALBERTO CHAVEZ GOMEZ

GENERACION 1985 - 1989

C A L E N D A R I O - A

GUADALAJARA, JAL.,

1992



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección
 Expediente
 Número

842/91

C. MARIO A. CHAVEZ GOMEZ
 P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTI-BIOTICOS EN CEPAS DE Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus AISLADAS DE YOGURT COMERCIAL" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el Dr. Agustín Ramírez Alvarez.

A T E N T A M E N T E
 " PIENSA Y TRABAJA "
 ASO "LIC. JOSE GUADALUPE ZUNO HERNANDEZ"
 Guadalajara, Jal., 13 Noviembre de 1991.
 EL DIRECTOR



FACULTAD DE
 CIENCIAS BIOLÓGICAS

M. EN C. CARLOS BEAS ZARATE

EL SECRETARIO

M. EN C. MARTIN PEDRO TENA MEZA

c.c.p.- M.en C. Agustín Ramírez Álvarez; Director de Tesis, Pte.
 c.c.p.- El expediente del alumno.

Al contestar este oficio cifrese fecha y número



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Sección

Expediente

Número

M. en C. CARLOS BEAS ARZATE
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E . -

Por este conducto me dirijo a usted de la manera mas atenta para solicitar la autorización de impresión de la tesis del Pasante de Licenciatura en Biología MARIO A. CHAVEZ GOMEZ, que lleva por título: "PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTI-BIOTICOS EN CEPAS DE L. bulgaricus y S. thermophilus AISLADOS DE YOGURT COMERCIAL"

Sin mas por el momento, agradezco de antemano su consideración.

A T E N T A M E N T E
Guadalajara, Jal., Marzo 6 de 1992

DR. M. V. Z. AGUSTÍN RAMÍREZ ALVAREZ
DIRECTOR DE TESIS

Por ser las columnas en mi formación como profesionalista, a mis maestros, a mi Facultad de Ciencias Biológicas y a la Universidad de Guadalajara, Gracias.

INDICE :

	pag.
Introducción.....	1
Hipótesis.....	13
Objetivos.....	14
Materiales y método.....	15
Metodología.....	18
Resultados.....	20
Discusión.....	26
Conclusión.....	29
Bibliografía.....	30

INTRODUCCION

Los antibióticos son los fármacos que más han aumentado la esperanza de vida en la segunda mitad del siglo XX, por ello se les vincula con una gran cantidad de beneficios, tanto en el uso médico como - en el no médico. Pero por esto se ha traído también el uso irracional de estas drogas, dejando una gran alteración de tipo ecológico y médico con repercusiones en la salud tanto humana como animal.

Estos problemas de salud por el uso indiscriminado de los antibióticos aparecen como toxicidad, reacciones alérgicas, modificaciones de la ecología microbiana de los organismos humanos y animales, - así como de su ambiente donde se desenvuelven. Otro punto es la aparición y transmisión de resistencia, tema de gran interés y aun no dilucidado del todo. (5)

Ya que los antibióticos no solo se usan con fines terapéuticos - en medicina humana y veterinaria es importante tomar en cuenta el uso no médico de dichos fármacos como promotores de crecimiento en animales de granja y domésticos. (11)

Solo en E.E.U.U. en 1970 se produjeron 3,600 toneladas de antibióticos para la adición de alimentos (en ese año se produjeron 4,700 tns. para usos medicinales). Se tiene calculado que en México se usan de esta forma 100 tns. anuales de antibiótico (400 millones de cápsulas de 250mg). (7) Ahora si aunamos esto a la multitud de vestigios de drogas que entran a nuestros alimentos nos daremos cuenta del enorme potencial para la aparición y transmisión de cepas resistentes. Residuos de antibióticos que llegan a los alimentos por utilizarse estos como promotores de crecimiento en alimentos industrializados para animales de granja y domésticos. Se piensa que el agregar cantidades subterapéuticas a la dieta de los animales estaría más rápidamente en condiciones de ser utilizado. La eficiencia del método no es del todo satisfactorio pero lo que si es concluyente es que el tubo digestivo de los animales de esta forma alimentados se convierte en un aparato de selección de cepas resistentes que son depositados en el ambiente junto con las excretas. (79)

Los alimentos de mayor valor biológico lo constituyen los de origen animal, leche, carne, huevo, pescado, miel, etc. y los derivados de estos, pero además de ser los de mayor importancia nutricional son al mismo tiempo los de mayor riesgo potencial en la producción de enfermedades. (35)

Desde hace varias décadas se sabe de la presencia de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal, pero haremos énfasis en la mención de residuos de antibióticos en leche y derivados por razones obvias.

La presencia de residuos de antibióticos en leche, ya sea por vía intravenosa, intramuscular, intrauterina u oral, va acompañada de una eliminación parcial del medicamento por la glándula mamaria. No obstante dichos tratamientos representan niveles "insignificantes" de antibióticos comparándolos con lo que aporta la aplicación intracis--ternal de estos preparados (acuoso, oleoso, unguentos) en el trata--miento de mastitis bovina.

Los antibióticos de mayor uso en bovinos lecheros son: La Penicilina, La Tetraciclina, Estreptomina, Cloranfenicol entre otros.

Existe la creencia errónea de que tratamientos térmicos a que se somete la leche destruyen las sustancias inhibitorias y en forma particular los antibióticos. Sin embargo el informe de la Federación Internacional de la leche (IDF) 1967, señala que la penicilina pierde solo el 8% de su actividad luego de la Pasterización. (18)

TERMOESTABILIDAD DE LOS ANTIBIOTICOS

Antibiótico	% de Destrucción según el Tratamiento		
	Pasteurización	90°C/30 min.	100°C/30 min.
Penicilina	8%	20%	50%
Estreptomina	-----	-----	88%
Neomicina	-----	-----	66%
Cloranfenicol	-----	-----	90%
Oxitetraciclina	-----	-----	90%
Cloranfenicol	-----	-----	-----

El tiempo mínimo de excreción de antibiótico en leche en vacas - después de la infusión intramamaria, son dos días para penicilina en solución líquida, 4 días para penicilina en solución oleosa, suspensión; 6 días para Clortetraciclina y 4 días para Estreptomina. Con inyección intramuscular la Penicilina ha sido excretada dentro de un día. (4) Recomienda la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO) - la exclusión del mercado la leche proveniente de vacas que han recibido antibiótico, por un mínimo de 72 horas.

El problema de contaminación de la leche con antibiótico está -- presente tanto en países del tercer mundo como en los países desarrollados. Prueba de ello es Inglaterra y Wales, donde granjas lecheras son examinadas con regularidad para la detección de vestigios de antibiótico desde 1965. La detección por el organismo probado fué de 0.02 U.I./mL de penicilina o equivalente hasta el cambio a 0.01 U.I./mL en enero de 1986. 7,500.000 lts de leche contaminada con antibiótico provenientes de las granjas lecheras de Inglaterra y Wales fué retenida en el año entre septiembre de 1985. (9)

En la Federación Internacional de la Leche (IDF) se han discutido diferentes procedimientos como pruebas de Acidificación, Bioluminiscencia, Prueba del Inhibidor del Yogurt para el control rutinario de residuos de antibióticos en leche y subproductos. (8)

En otro estudio, de una muestra de leche cruda se aislaron bacterias resistentes a siete antibióticos: Penicilina, Ampicilina, Cloran

fenicol, Sulfato de Neomicina, Sulfato de Polimixina B, Tetraciclina, y Sulfato de Estreptomina. Tres de 42 gram positivas aisladas fueron capaces de transmitir resistencia a antibióticos a E. coli. La Inspección de las Granjas indica una relación entre la práctica de granjas y el uso de antibióticos en el forraje y/o uso terapéutico y número de bacterias antibiótico-resistentes en leche cruda. (23)

En particular, se cree pertinente inspeccionar de forma periódica la resistencia de cultivos seleccionados para la preparación del Yogurt, ya que se sabe de intentos de desarrollar cultivos antibiótico-resistentes de lactobacilos y estreptococos para la producción de Yogurt.

En un estudio hecho por Tomaso Sozzi y Col. (40), 29 cepas de *L. bulgaricus* y 15 cepas de *S. thermophilus* son probados para medir su resistencia ante 35 antimicrobianos usados comercialmente en la práctica veterinaria. Aproximadamente el 35% de las muestras aisladas tienen un patrón de resistencia como característica única. Los resultados obtenidos en este estudio son comparados con los resultados reportados por Reinhold y Reddy (36) y Marth y Ellickson. (32)

Ya desde hace varios años existen datos sobre los niveles Inhibitorios mínimos de algunos antibióticos como la penicilina y la auromicina para los cultivos lácticos comunes. (37)

Cultivo	Penicilina U./mL	Auromicina mcg/mL
<i>L. bulgaricus</i> 488	0.10	3.0
" " 444	0.10	5.0
" " R	0.37	3.0
" " V71	0.2	2.0
" " V12	0.05	0.3
Cultivo Comercial		
<i>L. lactis y bulgaricus</i>	1.0	10.
<i>S. thermophilus</i> H	0.05	0.3
" " T	0.05	0.05

Por otra parte encontraron que la presencia de .05 - 0.15 U.I. - de Penicilina, 1 - 3 mcg de Clortetraciclina, y 5 - 7 mcg de Estreptomina por mL de leche inhibían el crecimiento de los cultivos del Yogurt. (4)

La FAO reporta la inhibición parcial y total de microorganismos por antibiótico en cultivos lácticos. (18)

Cultivo	Penicilina		Estreptomina		Cloranfenicol	
	U.I./mL		Gammas/mL		Gammas/mL	
	Parc.-----Tot.		Parc.-----Tot.		Parc.-----Tot.	
<i>S. thermoph.</i>	0,0017	0,025	0,5-5.0	---	0,001	0,3
" "	0,017	0,05	---	---	0,01	---
<i>L. bulg.</i>	0,3-0,6	0,1-0,3	---	---	---	0,3-0,5

No obstante, a pesar de que se utilizan técnicas muy sensibles, como las de la Federación Internacional de la Leche (IDF) para la detección de antimicrobianos en leche, asumen que muchas formas de residuos pueden ser diluidos por debajo de los límites de detección. (1)

En la mayoría de los países la legislación restringe la venta de leche que contenga antibiótico. Tal como lo recomienda la OMS/FAO. En nuestro país tenemos el reglamento de la ley general en materia de -- Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios que nos protege legalmente al respecto, mediante sus artículos - 37, 34, 35, 37, 247, 248. (15)

Para poder entender mejor los riesgos potenciales en salud pública que puede traer consigo el uso indiscriminado de los antimicrobianos, es necesario mencionar los mecanismos de resistencia bacteriana, las alergias y la toxicidad.

Mecanismos de Resistencia a los Antibióticos: (14,77)

Las bacterias para sobrevivir en presencia de los antimicrobianos reaccionan de diversas maneras:

1. Inactivan (detoxificación) el antibiótico enzimáticamente dentro

de ellas mismas o en su entorno.

- Acción del Acetil-Transferasa sobre el Cloranfenicol.
- Actividad de las enzimas modificadoras e inactivación de aminogluco-
sidos (Fosfotransferasas y Nucleotidil-Transferasas).

2. Cambios metabólicos.

- Hiperproducción de reductasa de Hidrofolato, sensible a trimetoprim
- Producción elevada de ácido P-aminobenzoico (PABA) que antagoniza -
la actividad antimicrobiana de las sulfas.
- Síntesis de reductasa de hidrofolato-codificada por plasmidos que -
no es inhibido por trimetoprim.
- Activación de una ruta metabólica alterna que permite a las cepas -
mutantes que requieren de tiamina, evitar la actividad del trimeto--
prim.

3. Permeabilidad Alterada.

- Cambios en las proteínas de membrana que intervienen con la absor--
ción de tetraciclinas.

4. Alteración en el Blanco.

- Alteración de la girasa ADN que impide la unión con novobiocina.
- Cambio con la proteína ribosomal S-12, con la que se evita la acti-
vidad inhibitoria de la estreptomycin.
- Dimetilación de una adenina del ADN ribosomal, que protege contra -
la acción de la eritromicina.

La explicación que se dió a la aparición de variedades --
resistentes fue la de que se habían originado por mutaciones espon--
táneas. En efecto en condiciones normales, aproximadamente una bacte-
ria de cada millón (10^6) muta y se convierte en resistente a un anti-
biótico. En el caso simultáneo de dos antibióticos, una bacteria de -
cada billón (10^{12}) es resistente. Observese como decrece la posibili-
dad de resistencia a la acción de 4 a 8 antibióticos por tanto es vir-
tualmente imposible por este mecanismo. (10)

Actualmente se considera que en la mayoría de variedades resis--
tentes, fue adquirida dicha resistencia por información genética adi-
cional, en molécula de DNA extracromosómico denominados plasmidos. En
1959 Akiba propuso que estos plasmidos de resistencia podían transmi-
tirse de una bacteria a otra de manera no específica, incluso dentro

del intestino humano por eventos conjugativos. Surgen así los plasmidos R, para los que poseen genes de resistencia y un 'Factor de Transferencia de Resistencia' (por conjugación), y 'r' para los que solo codifican resistencia. (3,13)

Otros mecanismos en los que el material Genético y los Plasmidos pueden ser transferidos de un microorganismo a otro, son los siguientes:

1. Transposición: (Hodges y Jacob, 1974). Por medio de este una secuencia especial de una molécula de DNA denominada Transposon, pueden insertar una copia de si misma en otra molécula vecina, de este modo secuencias diversas pueden transponerse de un plasmido al cromosoma y viceversa.
2. Transducción: El DNA del plasmido esta guardado en un virus bacteriano y es transferido por el virus a otra bacteria de la misma especie.
3. Transformación: El DNA desnudo pasa de una célula de una especie a otra célula alterando el genotipo de esta última. Esto puede ocurrir espontáneamente o a través de su manipulación en el laboratorio.

Resistencia Cruzada

Los microorganismos resistentes a ciertos medicamentos pueden -- tambien ser resistentes a otros medicamentos que comparten un mecanismo de acción o adherencia. Tales relaciones existen principalmente entre agentes que están íntimamente emparentados desde el punto de vista químico, (ejem.: Floximina B-Colistina; Eritromicina-Oleandomicina Neomicina-Kanamicina), pero tambien pueden existir entre sustancias químicas no relacionadas (Eritromicina-Lincomicina). En ciertas clases de medicamentos, el núcleo activo del agente químico es tan semejante entre tantos congéneros (por ejemplo: las Tetraciclinas) que se puede esperar la resistencia cruzada. (75)

Consecuencias de las Resistencias.

La primera consecuencia catastrófica en México fue la epidemia de tifoides que ocurrió en la zona central en los primeros años de la década de los 70s, la morbilidad fue de gran magnitud (un mínimo de 10,000 casos desde inicios de 1972 hasta mediados de 1973), y la mor-

talidad (de 12%) se debió a que *Salmonella typhi* era resistente al antibiótico de primera elección, el cloranfenicol, así como a las sulfonamidas, la tetraciclina y la estreptomycinina.

Kuperszotoch-Pertonoy, en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), aisló cepas de *E. coli* de niños con diarrea, internados en el Hospital Infantil. Menos de 1% resultó sensible a los 14 antimicrobianos que se probaron, 1,5% fué monorresistente y 97% multirresistente. La resistencia a siete antibióticos fué el patrón más frecuente (31,4%). (3)

López-Alvarez, de la F. de M.V.Z. de la UNAM, informó que 94% de las cepas de *E. coli* aisladas de charcos de la ciudad de México y 86% de las cepas enteropatógenas de lechones fueron multi resistentes. -- Además 82% de la *E. coli* de aves normales fueron resistentes a las sulfunamidas, fármacos que se adicionan con fines profilácticos a los alimentos de las aves. (29)

Alergias.

Nos concierne esta área sobre la concentración de penicilina y la posibilidad de exposición en leche, pudiendo crear una u otra hipersensibilidad o estimulación alérgica, siendo ésta una respuesta individual. (1)

40 U.I. (0.024mg) de penicilina pueden ser suficientes para causar reacciones en una persona sensible. (Shahani, 1958).

Toxicidad.

Los agentes quimioterapéuticos usados en la clínica médica y veterinaria, son primordialmente tóxicos para las bacterias, sin embargo en ciertos casos de ellos pueden tener reacciones peligrosas en el animal huésped.

Estos efectos pueden ocurrir directamente sobre los túbulos renales los cuales son expuestos a niveles altos considerables como ningún otro en el organismo, o sobre el VIII nervio craneal en el caso de aminoglucosidos, o sobre la médula espinal en el caso del Cloran-

fenicol. (7) Alternativamente la toxicidad puede resultar de una forma indirecta por destrucción de la flora simbiótica del tracto gastrointestinal.

En nuestro caso, siendo las bacterias productoras de Yogurt, el objeto de estudio, nos extenderemos a mencionar algunas de sus propiedades.

La FAO/OMS y la Codex Alimentarios afirman que 'el Yogurt es una coagulación de la leche producto obtenido de la fermentación del ácido láctico a través de la acción de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, estos microorganismos en el producto final son viables y abundantes.

S. thermophilus: (38) Células inmóviles, esféricas y ovoides, de 0,7-0,9 micras de diámetro, apareciendo en pares o cadenas, gram positivo. La morfología de este microorganismo se ve influenciado por el sustrato y la temperatura de crecimiento, en leche a 45°C forma generalmente cadenas cortas, en tanto a 30°C muchas cepas aparecen como diplococos. A altos niveles de acidez en leche tiene tendencia a formar cadenas largas. En medios sólidos, las células ocurren en forma muy irregular (turgescen y en forma de bastón).

Las colonias en medios sólidos se caracterizan por ser pequeñas y puntiformes como cabezas de alfiler. Tiene un amplio rango de temperatura con un óptimo de 40-45°C, mínimo de 20°C y máxima de 50°C (no crece a 53°C). Es termodurico, llegando algunas cepas a sobrevivir -- hasta tratamientos de 80°C/15min. o incluso 85°C/20-30min. Se diferencia de *S. lactis* en que no produce amonio a partir de arginina y no crece en caldo con 2% de NaCl. Es un anaerobio facultativo. Es muy -- sensible frente a la presencia de sustancias inhibitorias, particularmente antibióticos. Es inhibido por 0.01 U.I. de penicilina o 5mcg de estreptomocina/ml de leche. No obstante varía este aspecto en diferentes cepas. Es considerada una bacteria típica de la leche, siendo este su mejor medio de crecimiento.

Es una bacteria láctica homofermentativa, produciendo ácido lác-

tico a partir de azúcares en niveles de 85-98% y pequeñas cantidades de otros productos como ácido fórmico, acético, propiónico, butírico, isovalérico y caproico, acetoina y pequeñas cantidades de acetaldehído, acetona, etanol y 2-butanona. En leche produce 0,7-0,8% de ácido láctico L(+). Algunas cepas hasta 1%.

Muestra una actividad proteolítica muy débil, algunas cepas son antagónicas a otros organismos, es una bacteria catalasa(-). Fermenta la glucosa, fructosa, lactosa, manosa, sucrosa y debilmente la galactosa. (16,24,41)

No tiene grupo específico de antígeno. La estructura del peptido-glucan es idéntica a la de *S. faecalis* (Schaefer y Kandler, 1967)

Se propone recientemente que *S. thermophilus* se reclasifique como *S. salivarius*, subespecie *thermophilus* (Farrow y Collins, 1984). - Estas recomendaciones son basadas en estudios de hibridación de ácido nucleico y cadenas largas de perfiles de ácido graso (Garvie y Farrow, 1981, Kilpper-Balz, et-al, 1982, Farrow y Collins, 1984).

L. bulgaricus (Orla-Jensen, 1919), (38,24) células inmóviles, en forma de bastones, individual o en cadenas, de 0,8 a 1,0 por 4 a 6 micras gram positivos. Al ser teñidas con azul de metileno, los bacilos presentan granulos de volutina, no apareciendo estos en estado joven. La temperatura óptima es de 40-45°C la máxima 52°C la mínima 22°C. En leche a 22°C crece en largos filamentos (ocasionalmente hasta 600 micras) y en forma irregular. También pueden aparecer bastones irregulares debido a un enfriamiento demasiado temprano del cultivo. La presencia de antibióticos e higienizantes afectan marcadamente la morfología de esta bacteria. En los lactobacilos se pueden observar colonias de dos tipos:

- Tipo S ('smooth'): pequeñas colonias lenticulares.
- Tipo R ('Rough'): grandes colonias arborescentes.

A diferencia de *L. acidophilus*, la mayoría de las cepas no crecen en caldo con 2% de NaCl y no crece en presencia de sales biliares. Muchas cepas se desarrollan en presencia de 0,4% de fenol. Debido a -

que esta sustancia es un producto de procesos fermentativos en el intestino delgado, la resistencia a este producto puede ser usada como índice de sobrevivencia de los cultivos en el intestino.

Su resistencia frente a antibióticos es mayor que la de *S. thermophilus*. Es inhibido por 0,3-0,6 U.I. penicilina/mL de leche, variando esto en diferentes cepas. Es una bacteria típica de la leche. Es una bacteria anaerobia facultativa, homofermentativa, produciendo hasta 1,7% D(-) ácido láctico en leche. Pequeñas cantidades de compuestos carbonílicos, etanol y ácidos volátiles. Entre los componentes carbonílicos el más importante es acetaldehído, seguido por acetona, 2 butanona, y trazas de acetoina. Entre los ácidos grasos es el acético, propiónico, butírico, isovalérico, caproico, caprílico y ácido caprícos. Posee una actividad proteolítica media, llevando a una relativamente alta acumulación de aminoácidos libres. Produce peróxido de hidrógeno por la acción de la NAD oxidasa. Es un organismo catalasa (-). Posee débil actividad lipolítica. Fermenta pocos carbohidratos, el principal la lactosa, glucosa, fructosa y algunas cepas la manosa. Muchas cepas exhiben un efecto antagónico contra microorganismos saprofitos y patógenos. (16).

Simbiosis, se caracteriza por lo siguiente: (20,31)

- Se reduce el tiempo de coagulación de la leche de 2-3 hrs. a 45°C - en lugar de varias horas.
- El crecimiento de *S. thermophilus* se ve favorecido por la liberación de aminoácidos, liberados de la cascina por el *L. bulgaricus* reduciéndose el tiempo de generación de las células y aumentándose en número. Después de las primeras horas existe una relación cocobacilo de 3-4:1.
- Es reducido el tiempo de crecimiento de los estreptococos por el efecto adverso del ácido láctico y la relación de microorganismos cambia aumentando los lactobacilos.
- La producción de ácido en la primera parte es por la acción de estreptococo después por el lactobacilo.
- El lactobacilo es estimulado por el ácido fórmico producido por el estreptococo.

Impacto del Yogurt en la Salud.

- Flora viva del Yogurt. *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, ninguno forma parte de la flora normal del tubo digestivo humano.
- Intervienen los microorganismos del Yogurt combatiendo de diversas maneras a las bacterias patógenas.
- Producción de acidez.
- Inhiben la transferencia de plasmidos R y con ello la propagación - de resistencia a antibióticos.
- Proteólisis, digestión, absorción de proteínas.
- Digestión de grasas.
- Lipólisis y liberación de ácido grasos volátiles.

HIPOTESIS

Debido al constante uso de los antimicrobianos en la terapéutica, y la adición en el pienso del ganado lechero y consecuentemente los vestigios de estos fármacos que son eliminados en la secreción láctea, se espera encontrar cepas de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* antibiótico - resistentes de las diferentes marcas comerciales de Yogurt de consumo en Guadalajara Jal.

OBJETIVOS :

- 1.- Determinar la Susceptibilidad -
de las Cepas Aisladas de las di
ferentes marcas comerciales de
Yogurt ante 15 Antimicrobianos
Comúnmente Utilizados en la --
Práctica Veterinaria.

MATERIALES Y METODO

MATERIAL DE CRISTALERIA

MATERIAL ELECTRICO

- Microscopio Optico
- Agitador para tubo
- Baño María
- Báscula Digital
- Balanza Analitica
- Estufa Incubadora
- Horno
- Refrigerador
- Autoclave

MATERIAL BIOLOGICO

- Cultivos Puros de cepas de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* aisladas de muestras de Yogurt Comercial.
- Leche de Vaca Pasteurizada.

MEDIOS DE CULTIVO BACTERIOLOGICOS

- Agar Láctico, de Composición: g/1000mL de Agua Destilada.

Triptona (peptona de Caseina)-----	20.0 g
Extracto de Levadura-----	5.0 g
Gelatina-----	2.5 g
Glucosa-----	5.0 g
Lactosa-----	12.8 g
Sacarosa-----	5.0 g
Cloruro de Sodio-----	4.0 g
Acetato de Sodio-----	1.5 g
Acido Ascorbico-----	0.5 g
Agar-----	15.0 g

pH Final ajustado a 6.5. Esterilizar a 121°C/15 min.
- Medio HJ, de Composición: g/1000mL de Agua Destilada.

Triptona (peptona de Caseina)-----	30.0 g
Extracto de levadura-----	5.0 g
Extracto de Carne-----	2.0 g

Lactosa-----	5.0 g
KH ₂ PO ₄ -----	5.0 g
Agar*-----	15.0 g

* Para medio Sólido.

pH Final ajustar a 6.5. Esterilizar a 121°C/15 min.

- Agar Mueller-Hinton.

REACTIVOS, COLORANTES, INDICADORES Y OTROS

- Equipo para Tinción de Gram
- Azul de Metileno
- Alcohol al 70%
- Agua Oxigenada
- Agua Destilada
- Soporte Universal con aro metálico y tela de asbesto
- Pinzas
- Mechero Bunsen
- Mechero Fisher
- Gradilla Metálica
- Tijeras
- Asas Bacteriológicas
- Algodón y Gasa
- Hisopos de Madera
- Reloj de Laboratorio
- Regla o Vernier
- Espátula
- Sensidiscos con los siguientes antibióticos.**

<i>ANTIBIOTICO</i>	<i>CONCENTRACION*</i>
Ampicilina-----	10 mcg.
Penicilina G*-----	10 U.I.
Cloranfenicol*-----	30 mcg.
Tetraciclina*-----	30 mcg.
Eritromicina-----	15 mcg.
Estreptomicina*-----	10 mcg.
Neomicina*-----	30 mcg.
Bacitracina*-----	5 U.I.
Polimixina B*-----	300 U.I.

<i>ANTIBIOTICO</i>	<i>CONCENTRACION+</i>
Kanamicina-----	30 mcg.
Gentamicina-----	10 mcg.
Lincomicina-----	2 mcg.
Trimetoprim--Sulfametoxazol-----	25 mcg.
Novobiocina-----	30 mcg.
Cefalotina-----	30 mcg.

* Antibióticos Utilizados en Terapia de Mastitis Bovina.

+ Se utilizarán las concentraciones de los discos de "Alto Poder". --
(21,28)

**Sensidiscos Elaborados Comercialmente.

METODOLOGIA

Se recolectaron muestras de yogurt comercial no caducadas. Las marcas comerciales del producto son las que se consumen en esta región de Guadalajara Jal.

Teniendo ya las muestras se procede a aislar de cada una, cepas de *S. thermophilus* y de *L. bulgaricus* mediante técnicas microbiológicas ya conocidas(2,12,17)

Para el aislamiento de *L. bulgaricus* se utilizó el agar Láctico (19) así para *S. thermophilus* se utilizó el medio HJ, ambos medios ya descritos.

Cuando se obtuvieron los cultivos puros (previamente identificados mediante pruebas ópticas y bioquímicas) (30,38) se pudo medir su susceptibilidad a algunos antibióticos comunmente usados en medicina veterinaria, algunos especialmente en terapia de mastitis bovina y -- otras enfermedades infecciosas. (34,39)

Las observaciones ópticas y pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de los microorganismos aislados fueron:

- Tinción de Gram.
- con azul de metileno.
- Prueba de la catalasa.
- Reducción de nitratos.

MANEJO DEL MEDIO

Se manejó en esta prueba de susceptibilidad el medio Mueller Hinton en *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, agregando .5% de Lactosa.

Una vez solidificado el medio de pasaron a refrigeración a 2-8°C Antes de usarse las cajas se incubaron a 35°C con la tapa entreabierta para eliminar el exceso de humedad de la superficie durante 10-20 minutos.

Las cajas que tenían gotas de humedad en el medio o en la tapa se deshecharon.

MANEJO DE LOS DISCOS

Los discos de papel filtro estuvieron almacenados en refrigeración a 2-8°C o en congelación a -14°C en distintos recipientes.

Los discos de Penicilina y Cefalosporina se congelaron para asegurar su potencia. Si se utilizaban antes de una semana se podían mantener a 2-8°C.

INOCULACION

Con una asada se tocaron de 4 a 5 colonias del cultivo puro y se inocularon en 4 a 5 mL del medio de cultivo HJ o Láctico, según el medio sólido que se haya utilizado para el cultivo puro. Se incubaron a 40-45°C hasta que aparecía la turbidez (usualmente 16-20 hrs).

La turbidez se ajustó con caldo láctico o HJ estéril usando la referencia del tubo de 1.0 de la escala de MAC. FARLAND. (28)

La suspensión ajustada del inóculo no permanecía más de 15 a 20 min. antes de sembrarla en la caja de petri.

Para inocular el agar se utilizó un hisopo el cual se humedecía con la suspensión, se quitaba el exceso presionando y girando el hisopo sobre la pared interna del tubo. Se estrió el medio en tres direcciones para obtener un inóculo uniforme. Se efectuó un último barrido del hisopo sobre el reborde de la caja de petri y el agar.

Se dejaron reposar de 3 a 5 min. para que secase el inóculo, pero no más de 5 min. y entonces se colocaban los discos.

COLOCACION DE LOS DISCOS

Los discos se colocaron antes de 15 min. después de haber inoculado la placa. Se presionaron los discos sobre el agar para asegurar un contacto completo con la superficie. Los discos se colocaron con pinzas estériles.

La distribución espacial de los discos fue de 4 a 5 en cajas de 100 mm

Cepa No.	7	-----	66%	
'	'	13	-----	33%
'	'	18	-----	30%

S. thermophilus

Cepa No.	2	-----	26%	
'	'	7	-----	56%
'	'	11	-----	30%
'	'	13	-----	30%
'	'	16	-----	33%
'	'	18	-----	40%

Los antibióticos que mostraron mayor actividad biológica respecto a las cepas estudiadas fueron:

En *L. bulgaricus*

GENTAMICINA	-----	83%
CEFALOTINA	-----	100%
TETRACICLINA	-----	83%
CLORANFENICOL	-----	83%
ERITROMICINA	-----	100%

En *S. thermophilus*

AMPICILINA	-----	83%
GENTAMICINA	-----	83%
CEFALOTINA	-----	100%
CLORANFENICOL	-----	90%
ERITROMICINA	-----	90%

En cuanto a los antimicrobianos que menor actividad biológica -- presentaron respecto a las cepas probadas fueron:

En *L. bulgaricus*

RACITRACINA	-----	39%
LINCOMICINA	-----	62%
FOLIMIXINA B	-----	34%
TRIM. - SULFAM.	-----	67%

En *S. thermophilus*

RACITRACINA	-----	22%
LINCOMICINA	-----	45%

POLIMIXINA B	-----	17%
KANAMICINA	-----	39%
TRIM. - SULFAM.	-----	50%

Durante la investigación se presentaron algunas eventualidades - como:

- . Problemas con el aislamiento de las cepas.
- . Manejo del medio.
- . Ajuste del inóculo.

En las muestras números 6, 12 y 14 no fue posible aislar la cepa que se suponía presente de *S. thermophilus*.

Los resultados para cada una de las cepas aisladas, se encuentran tabulados en las tablas 1 y 2 para *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* respectivamente.

TABLA No. 1 SENSIBILIDAD DE LAS CEPAS DE *L. bulgaricus* AISLADAS.

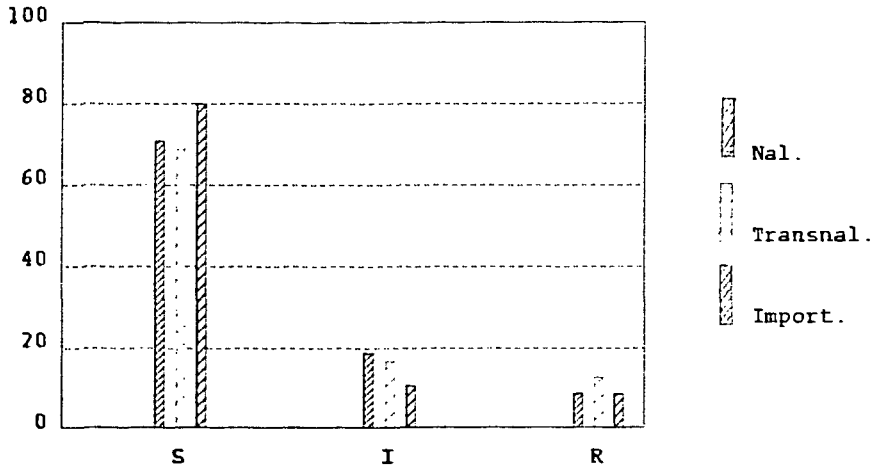
ESPECTRO ANTIBACTERIANO	ANTIBIOTICO	CONCENT. EN DISCO	(A)										(B)				(C)		
			2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
GRAM POSITIVOS	PENICILINA	110 U.I.	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	
	BACITRACINA	5 U.I.	R	I	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	I	S	R	I	
	LINCOMICINA	2 mcg.	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	I	R	I	S	S	
GRAM NEGATIVOS	NOVOBIOICINA	5 mcg.	S	I	S	I	S	I	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	
	AMFICILINA	110 mcg.	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	
	POLIMIINA B	300 U.I.	R	S	R	S	S	R	I	S	I	I	I	I	R	S	S	I	
GRAM NEGATIVOS Y ALBUNGS	ESTREPTOMICINA	110 mcg.	S	S	I	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	
	NEOMICINA	30 mcg.	S	S	I	I	S	R	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	
	KANAMICINA	30 mcg.	S	S	I	I	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	
GRAM POSITIVOS Y NEGATIVOS	GENTAMICINA	10 mcg.	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
	CEFALOTINA	30 mcg.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
	TETRACICLINA	30 mcg.	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	
GRAM POSITIVOS Y NEGATIVOS	CLORAFENICOL	30 mcg.	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	
	ERITROMICINA	115 mcg.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
	TRIMET.-SULFANET	25 mcg.	S	S	S	S	R	S	I	S	R	S	S	I	R	S	S	I	

TABLA No. 2. SENSIBILIDAD DE LAS CEPAS DE *S.thermophilus* AISLADAS.

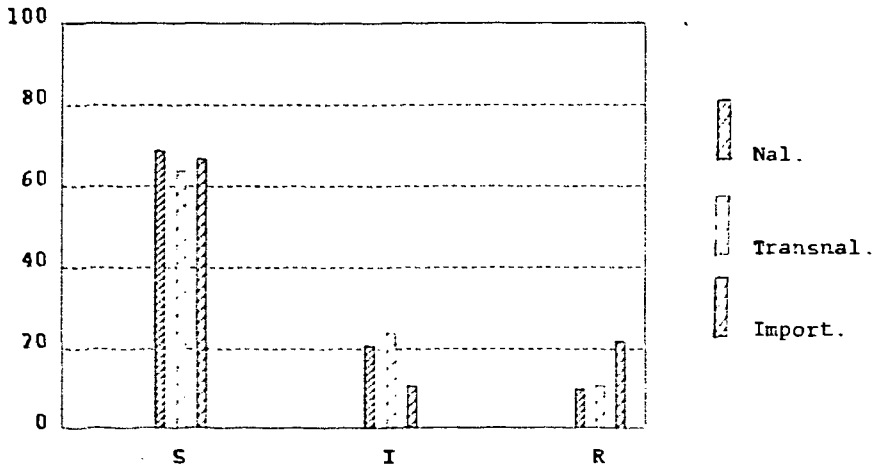
ESPECTRO ANTIBACTERIANO:	ANTIBIOTICO:	CONCENT. EN DISCO:	(A)										(B)				(C)				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
GRAM POSITIVOS	PENICILINA	10 U.I.	S	S	S	I	S	-	I	S	S	S	S	S	-	R	-	S	S	S	R
	BACITRACINA	5 U.I.	I	I	I	I	R	-	R	I	S	S	I	I	-	R	-	S	R	S	R
	LINCOMICINA	2 mcg.	I	I	S	I	S	-	I	S	S	S	S	S	-	I	-	S	S	R	R
	NOVOBIOICINA	5 mcg.	S	S	S	I	S	-	S	S	S	S	S	I	-	I	-	S	S	S	I
GRAM NEGATIVOS	AMFICILINA	10 mcg.	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	-	I	-	S	S	S	R
	POLIMIIXINA B	300 U.I.	I	I	I	R	R	-	R	I	S	I	I	R	-	I	-	R	R	S	R
GRAM NEGATIVOS Y ALGUNOS POSITIVOS	ESTREPTOMICINA	10 mcg.	S	S	S	S	S	-	I	S	I	S	S	S	-	S	-	S	I	S	S
	NEOMICINA	30 mcg.	R	R	S	S	I	-	R	S	S	S	S	I	-	S	-	S	S	S	I
	KANAMICINA	30 mcg.	I	I	S	I	I	-	R	I	S	S	S	I	-	S	-	S	R	S	S
GRAM NEGATIVOS Y AMPLIO ESPECTRO EN GRAM POSITIVOS	GENTAMICINA	10 mcg.	I	I	S	S	S	-	R	S	S	S	S	S	-	S	-	S	S	S	S
	CEFALOTINA	30 mcg.	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	-	S	-	S	S	S	S
GRAM NEGATIVOS Y AMPLIO ESPECTRO EN GRAM POSITIVOS	TETRACICLINA	30 mcg.	S	S	S	S	S	-	I	I	S	S	S	I	-	I	-	I	S	S	S
	CLORANFENICOL	30 mcg.	S	S	S	S	S	-	I	I	S	S	S	S	-	S	-	S	S	S	S
	ERITROMICINA	15 mcg.	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	-	S	-	S	I	I	S
GRAM NEGATIVOS Y AMPLIO ESPECTRO EN GRAM POSITIVOS	TRIMET.-SULFANET.	25 mcg.	I	I	S	S	S	-	R	R	S	S	S	I	R	-	S	-	S	R	S

En las siguientes gráficas se muestra la susceptibilidad de las cepas aisladas en relación al número de antibióticos utilizados y por grupo de procedencia.

1. Susceptibilidad de *L. bulgaricus*



2. Susceptibilidad de *S. thermophilus*



DISCUSION

Es bien conocida la alta sensibilidad de los microorganismos empleados en la elaboración de productos lácteos fermentados, en especial del yogurt, no obstante se aprecia en general por los resultados obtenidos una importante frecuencia de cepas antibiótico resistentes.

Es importante considerar en primer término tanto los patrones de resistencia natural de los tipos de microorganismos involucrados en este estudio, así como el espectro de acción de los fármacos antibacterianos empleados.

De acuerdo a la hipótesis planteada se observa en la tabla de resultados para *L. bulgaricus*, que de las 18 muestras probadas un total de 10 cepas resultaron resistentes a por lo menos un antibiótico, habiendo otros que fueron resistentes hasta 7 antimicrobianos. Así mismo en las cepas de *S. thermophilus* de 18 cepas 12 presentaron resistencia a por lo menos un antimicrobiano, presentandose en la cepa 12 resistencia a 7 antibacterianos.

La variación entre los patrones de sensibilidad, entre cepas de una misma especie microbiana pueden cambiar significativamente, en especial en relación a la presión de selección a que filogenéticamente han sido sometidos por la presencia de antimicrobianos en el ambiente de desarrollo.

Por esto son explicables diferencias de sensibilidad en diferentes cepas de una misma especie de lactobacilo, por ejemplo: La cepa de *L. bulgaricus* 488 es sensible a 0.10 U.I./mL de Penicilina y la cepa de la misma especie V12 es sensible a 0.05 U.I./mL de Penicilina.
(37)

La elevada sensibilidad de algunos microorganismos, como: *S. thermophilus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. stearothermophilus*, entre otros, han sido utilizados en las técnicas rutinarias para detección de residuos inhibitorios en leche. (8)

Sabiendo ya los efectos que traen los vestigios de antibióticos en la industria láctea se ha sugerido e intentado el desarrollar cepas de lactobacilos multirresistentes, para evitar las pérdidas por fallas en la coagulación de productos lácteos fermentados (Yogurt, queso, etc.). (11) En este sentido y por los resultados del presente trabajo, poseen estas características las cepas aisladas de las muestras No. 7 y 12 en *L. bulgaricus* y 12 y 16 en *S. thermophilus*, principalmente.

En relación al criterio sobre procedencia empleado para clasificar las muestras, no fue posible establecer una particularidad por grupo de muestra.

Las variaciones más evidentes se aprecian en relación a la cepa y al antibiótico.

El objetivo del estudio fue medir y establecer comparativamente la sensibilidad de las cepas aisladas a concentraciones únicas y constantes de sustancias antibacterianas, para comprobar con solo esta medida si existían diferencias importantes entre las cepas, lo que quedó evidenciado, con lo que se espera que la presencia de antibióticos en leche afecte de manera diferente el proceso de coagulación según la cepa involucrada, aunque lógicamente el tipo de medicamento presente y su concentración, además de inducir a la resistencia al fármaco de diferentes especies bacterianas.

Es importante considerar en términos generales que en teoría la resistencia de estas cepas es susceptible de ser transmitida a otras bacterias, incluso patógenas, en el tubo digestivo, por diferentes mecanismos. Esto tiene particular importancia cuando la resistencia se refiere a fármacos empleados en la terapéutica humana.

Por otro lado, cepas con resistencia a antibióticos en particular a β lactámicos y Estreptomycin, desde el punto de vista comercial serían deseables porque concentraciones residuales de estos medicamentos no afectarían en la fermentación y por tanto no producirían pérdidas en la industria láctea por fallas en la coagulación.

Respecto a las eventualidades presentes en el proceso metodológico, se tuvieron problemas en el aislamiento de las cepas a tratar, ya que en la mayoría de las muestras de Yogurt se presentaron una gran cantidad de contaminantes microbiológicos, sobre todo de levaduras.

Referente al medio, el Mueller Hinton se ajustó a pH 6.5 además se le adicionó 0.5% de lactosa ya que el almidón, carbohidrato propio del medio, al parecer no era fermentado por las bacterias lácticas -- del Yogurt.

Otro punto fue el ajuste del inóculo para la siembra en el M.H.. Se utilizó el inóculo 1.0 de la escala de Mc. Farland ya que con el inóculo 0.5 de la escala presentaba un crecimiento muy pobre, al parecer debido a que tanto *S. thermophilus* como *L. bulgaricus* son bacterias de difícil crecimiento en medios sólidos.

De las muestras 6, 12 y 14 donde no se pudo aislar a *S. thermophilus* a pesar de los repetidos muestreos, hipotéticamente se tienen dos puntos por la cual no aparecen estas cepas en el Yogurt.

1. Que las marcas comerciales correspondientes no estén manejando la cepa *S. thermophilus*, esto con fines económicos.
2. Que las marcas comerciales correspondientes estén manejando leche con residuos de antibióticos y por esta razón *S. thermophilus* por su alta sensibilidad a los antimicrobianos se inhiba su crecimiento.

CONCLUSION

La sensibilidad resultante, en relación a los 15 antimicrobianos utilizados, tanto de las cepas de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* de las 18 muestras seleccionadas de Yogurt comercial, vario desde un 26 a un 95%.

La actividad biológica que presentaron los 15 antibióticos usados en la prueba en relación a las cepas, fue desde un 100% en la Cefalotina hasta un 17 a 34% en la Polimixina B y un 22 a 39% en Bacitracina.

Los residuos de antibióticos en leche trae consecuentemente problemas múltiples de salud, entre alergias, toxicidad y resistencia bacteriana. Concretamente, solo en un derivado lácteo como lo es el Yogurt, el presente estudio demostro la presencia de cepas antibiótico-resistentes en diferentes muestras, cepas que nos hacen pensar en una posible transmisión de resistencia a otras bacterias que podrían ser patógenas. Otro punto de vista, que se debe considerar tambien es su repercusión económica.

Las modificaciones que se hicieron al método Kirby-Bauer fueron de acuerdo a los requerimientos de los microorganismos probados.

Se espera que el presente trabajo apoye otras investigaciones -- que se hacen referente a los vestigios de antibióticos y sus repercusiones, así como tener una mejor inspección y vigilancia sanitaria en nuestros productos alimenticios de consumo diario para mejorar la salud pública de nuestra población.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Allison J.R.D. (1985); Antibiotic Residues in Milk, Beecham Mastitis Series, British Veterinary Journal, 141-1, pp.9-16.
- 2.- Alvarez J.L. Barajas Rojas J.A., Manual de Laboratorio para Bacteriología y Micología Veterinaria, UNAM-FMVZ, México.
- 3.- Amaville Cuevas C.F. (1988), La Resistencia Bacteriana a los Antibióticos, Ciencia y Desarrollo, vol. may-jun, No.80, pp.57-68.
- 4.- Anifantakis M.E. (1982) Excretion Rates of Antibiotics in Milk - of Sheep an Their Effect on Yogurth Production, J. Dairy, S.C.I. pp.426-429.
- 5.- Animal Healt Institute (1985), Subtherapeutic Use of Antibiotics in Animal Feeds, pp.8-14.
- 6.- Anónimo (1985), El Estado Actual de los Antibióticos como Aditivos de los Alimentos, Rev. C.N.M.V.Z., pp.24-32.
- 7.- Austin, Francis H. (1977), A Rational Aproach to the Use of Antibiotics in Veterinary Practice, Iris Veterinary Journal, pp.28--32.
- 8.- Bolletin of International Dairy Federation (1987) Milk an Milk - Products Detection of Inhibitors, No. 220, pp.3-40.
- 9.- Booth J.M. and Harding F. (1986) Testin for Antibiotic Residues in Milk, The Veterinary Record, Dec. 6, pp.556-559.
- 10.- Bowman W.C., Rand M.J. (1985) Farmacología, Bases Bioquímicas y Patologías, Edit. Interamericana, México.
- 11.- Cercus A.P. (1985) Uso no Médico de los Antibióticos y Repercusión Sobre la Salud, Edit. Albatros, Argentina.

- 12.- Cottral G.E. (1986), Manual de Métodos Estandarizados en Microbiología Veterinaria, Ediciones Científicas La Prensa Médica Mexicana S.A. de C.V., México.
- 13.- Davis B.D., Delbeco R., y Col. (1985) Resistencia a los Antimicrobianos, Tratado de Microbiología, Edit. Salvat-España.
- 14.- De la Cruz González R. (1986) Resistencia a los Antibióticos Betalactámicos, Infectología, Año 6, No. 5, pp.160-161.
- 15.- Diario Oficial de la Federación (1988) Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos y Servicios, Secretaría de Salud, México D.F., -- Primera Sección.
- 16.- FAO, Equipo de Fomento y Capacitación en Lechería para América Latina (1981), Manual de Cultivos Lácticos y Cultivos Lácteos -- Fermentados.
- 17.- FAO, Equipo Regional de Fomento y Capacitación en Lechería para América Latina (1981), Manual de Métodos para Análisis Microbiológicos.
- 18.- FAO, Equipo Regional de Fomento y Capacitación en Lechería para América Latina (1983), Manual de Microbiología de la Leche.
- 19.- Fernández Escartin E. (1981), Microbiología Sanitaria, Agua y Alimentos, U de G Vol-1, México.
- 20.- García R. (1987), Yogurt y Leches Fermentadas, Memorias del tercer curso Regional sobre Higiene de la Leche y Productos Lácteos pp.135-161.
- 21.- Giono S. y Villa L. (1981) Pruebas de Sensibilidad a los Antibióticos utilizando discos de papel filtro, Memorias del XII Congreso Nacional de Microbiología, Asociación Mexicana de Microbiología.

- 22.- Goodman Gilman A., et. al, (1984) Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Edit. Médica Panamericana, México.
- 23.- Hankin-Lester, et. al (1979) Antibiotic-Resisten in Raw Milk and Ability of some to transter Antibiotic-Resistance to E. coli, -- Journal of food Protection, vol.42, No.12, pp.950-953.
- 24.- H. Jorgensen-Hansen, Microbiología de las Fermentaciones Indus-- triales, Edit. Acribia-España, s.f.
- 25.- Ketzung. B.G. (1986) Farmacología Básica y Clínica, Mecanismos - de Resistencia bacteriana, Edit. El Manual Moderno, México.
- 26.- Kingsbury D.T., Wagner G.E., Segal G.P. (1985) Microbiology, Wile- ley Medical, Publication. U.S.A.
- 27.- Koch A.L. (1981) Evolution of Antibiotic Resistance Gene Fuction Microbiology-Rev., 45, 335-378.
- 28.- Koneman - Allen - Bowell - Sommers (1989) Diagnóstico Microbioló- gico, Edit. Panamericana, México.
- 29.- López Alvarez (1981) "La Resistencia bacteriana a los Antibióti- cos Constituye un Problema muy serio de Salud Pública", MVZ Noti- cias, Vol.IV, No.10, pp.8-9.
- 30.- Mac Faddin J.F. (1984) Pruebas Bioquímicas para la Identifica-- ción de Bacterias de Importancia Clínica, Edit. Panamericana, Mé- xico.
- 31.- Manual para la Educación Agropecuaria (1988) Elaboración de Pro- ductos Lácteos, Area Industrias Rurales,, Edit. Trillas, México.
- 32.- Marth E.H. and Ellickson B.E. (1959) Problemas Created by the -- Precence of Antibiotics in Milks and Milks Products, J. Milk -- Food Technol, Vol.22, 266-272.

- 33.- Merck and Co., Inc. (1986) The Merck Veterinary Manual Edit. -- Board, U.S.A.
- 34.- Meyer Jones L., Booth N.H., Mc. Donald L.E. (1982), Farmacología y Terapéutica Veterinaria, Union Tipográfica Editorial Hispano-- Americana, U.S.A.
- 35.- Ramirez Alvarez A. (1987) Salud Pública Veterinaria, Memorias -- del tercer curso Regional sobre Higiene de la Leche y Productos Lácteos, pp.108-110.
- 36.- Reinbold G.W. and Redy (1974), Sensivity or Resistance Dairy -- Starter and Associated Microorganism to Selected Antibiotics, J. Milk Food Technool., Vol.37, pp.517-521.
- 37.- Shahani K.M., Harper W.J. (1958) Milk Products, J. Milk Food -- Technol, Vol.49, pp.53-54.
- 38.- Sneath - Mayr - Sharpe - Holt (1986), Bergey's Manual of Sistema tic Bacteriology, Vol.2, Edit. Board, Baltimore, U.S.A.
- 39.- Somano - Ocampo (1988), Farmacología Veterinaria, Edit. Mc. Wraw Hill, México.
- 40.- Sozzi T. and Smiley M.E. (1980) Antibiotic Resistences of Yogurt Starter Cultures Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus. Aplied Environmental Microbiology, Vol.40, No.5, -- pp.862-865.
- 41.- Staiver R.Y. Adelberg E.A. Ingraham J.L. (1986), Microbiología, Las bacterias del Acido Láctico, Edit. REPLA. S.A. México.