

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**MAESTRÍA EN AGRICULTURA ANDINA**



**TESIS**

**VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA BIOLÓGICA PARA DETECTAR RESIDUOS  
DE ANTIBIÓTICOS EN QUESO TIPO PARIA**

**PRESENTADA POR:**

**EUCLIDES TICONA CHAYÑA**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:**

**MAGISTER SCIENTIAE EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**PUNO, PERÚ**

**2017**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**MAESTRÍA EN AGRICULTURA ANDINA**

**TESIS**



**VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA BIOLÓGICA PARA DETECTAR RESIDUOS  
DE ANTIBIÓTICOS EN QUESO TIPO PARIÁ**

**PRESENTADA POR:**

**EUCLIDES TICONA CHAYÑA**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:**

**MAGISTER SCIENTIAE EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

APROBADA POR EL SIGUIENTE JURADO:

PRESIDENTE

M.Sc. FLORENTINO VICTOR CHOQUEHUANCA CÁCERES

PRIMER MIEMBRO

Dr. ALÍ WILLIAM CANAZA CAYO

SEGUNDO MIEMBRO

M.Sc. ABIGAIL TERESA PÉREZ DE LA CRUZ

ASESOR DE TESIS

Dr. ALBERTO CCAMA SULLCA

Puno, 22 de diciembre de 2017

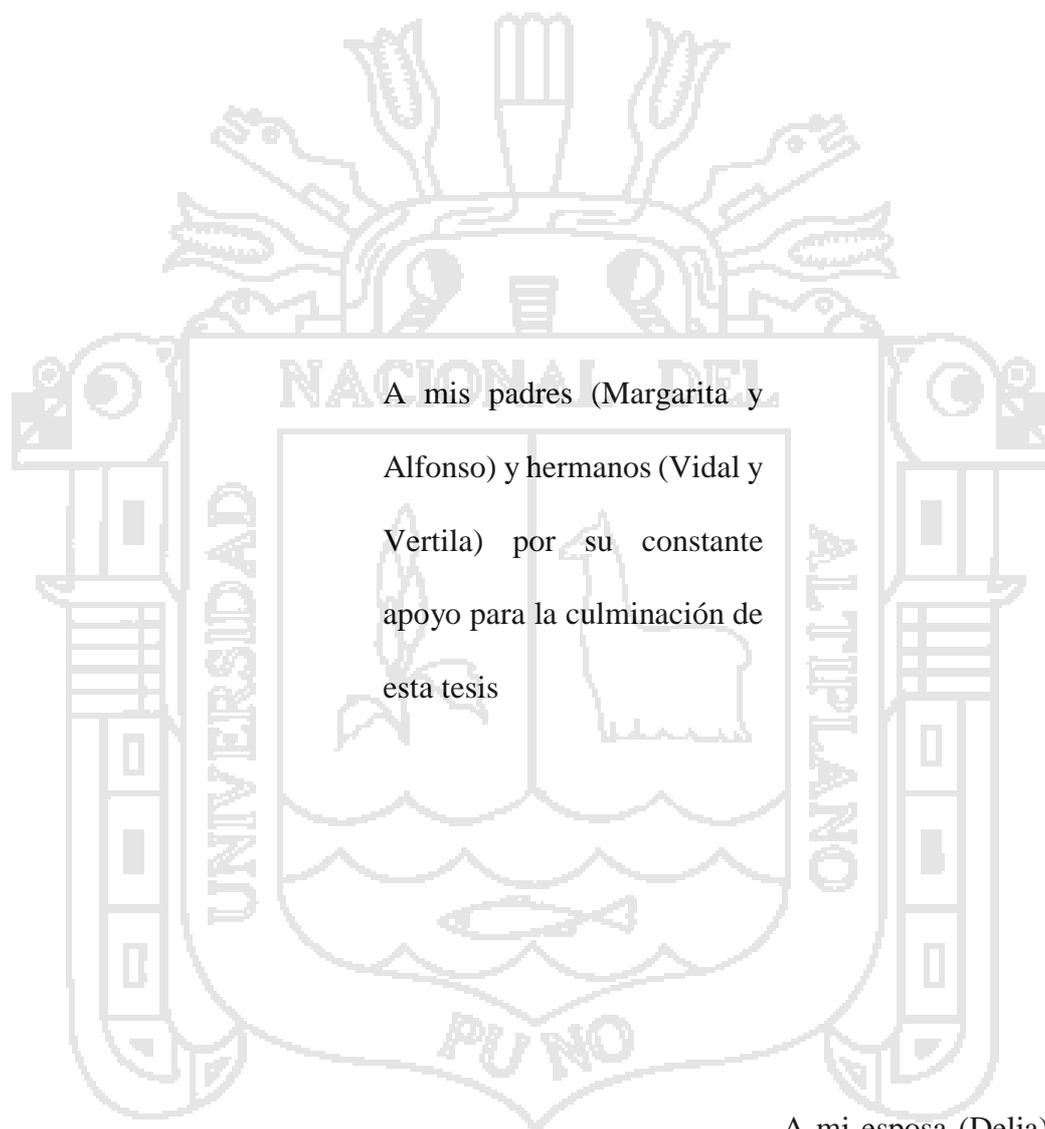
**ÁREA:** Ciencia y tecnología de alimentos.

**TEMA:** Validación de una prueba biológica para detectar residuos de antibióticos en queso tipo Paria

**LÍNEA:** Conservación de productos alimenticios.

**DEDICATORIA****A Dios.**

Por haberme dado salud  
para lograr mis objetivos.

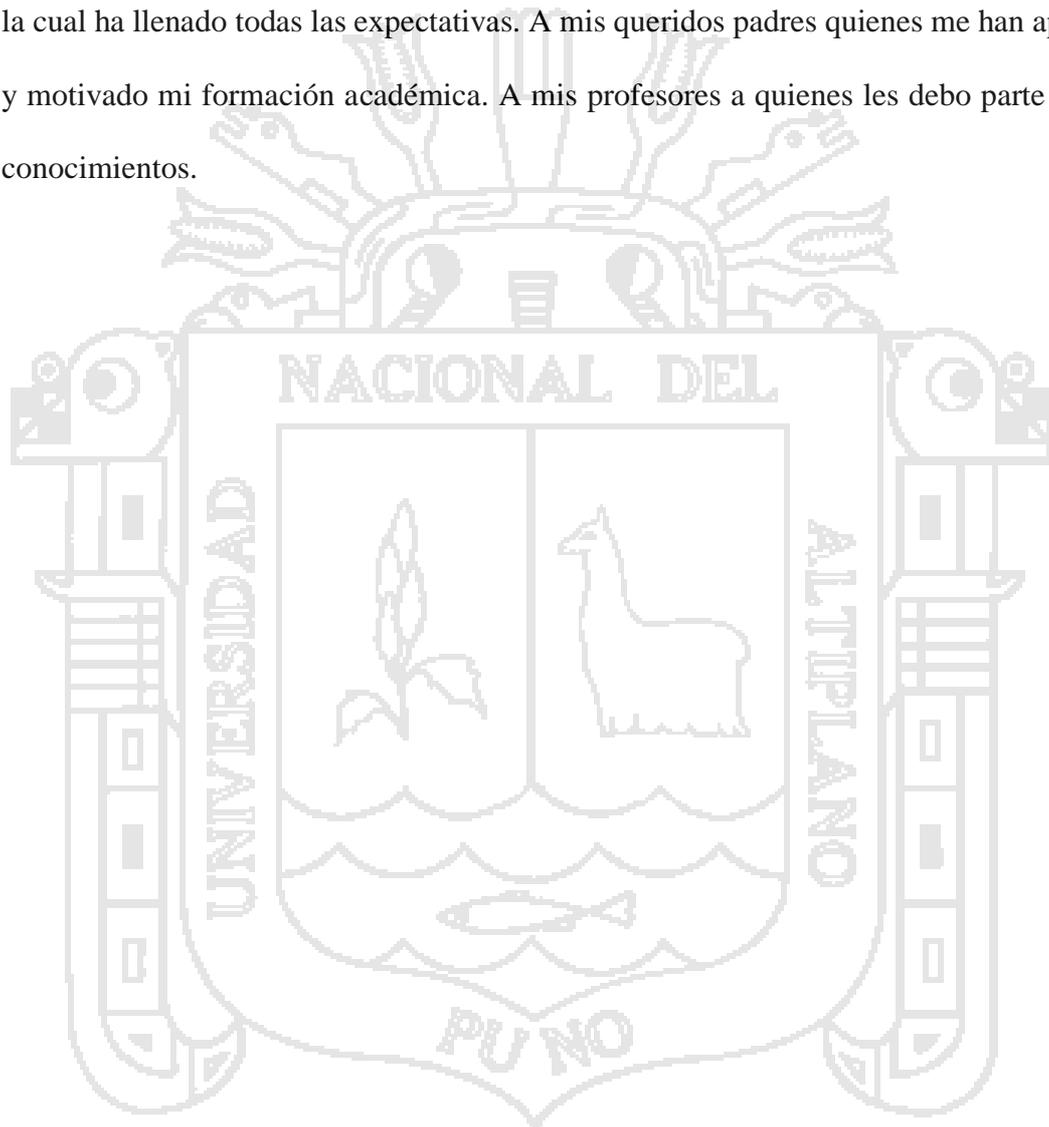


A mis padres (Margarita y  
Alfonso) y hermanos (Vidal y  
Vertila) por su constante  
apoyo para la culminación de  
esta tesis

A mi esposa (Delia) por su  
amor y apoyo incondicional  
y a mi bebé (Lynn) a quien  
adoro y llena mi vida de  
alegrías

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Altiplano por la formación profesional. El proyecto presentado es resultado del esfuerzo del grupo de trabajo. Agradezco al asesor de tesis, Dr. Alberto Ccama Sullca quien ha puesto sus conocimientos en el desarrollo de esta tesis la cual ha llenado todas las expectativas. A mis queridos padres quienes me han apoyado y motivado mi formación académica. A mis profesores a quienes les debo parte de mis conocimientos.



## ÍNDICE GENERAL

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| DEDICATORIA .....   | i           |
| AGRADECIMIENTOS .....   | ii          |
| ÍNDICE GENERAL .....  | iii         |
| ÍNDICE DE TABLAS .....  | vii         |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....   | viii        |
| ÍNDICE DE ANEXOS .....  | x           |
| RESUMEN .....   | xi          |
| ABSTRACT .....  | xii         |
| INTRODUCCIÓN .....  | 1           |
| <br><b>CAPÍTULO I</b><br><b>REVISIÓN DE LITERATURA</b><br><br>                  |             |
| 1.1 Marco teórico .....   | 3           |
| 1.1.1 Leche .....   | 4           |
| 1.1.1.1 Acidez de la leche .....  | 4           |
| 1.1.1.2 pH de la leche .....  | 4           |
| 1.1.1.3 Calidad de la leche .....   | 5           |
| 1.1.1.4 Valoración de la calidad composicional e higiénica de la<br>leche ..... | 6           |
| 1.1.1.5 Calidad de la leche para la producción del queso .....                  | 9           |
| 1.1.2 Mastitis .....  | 10          |
| 1.1.2.1 Tratamiento de mastitis .....   | 10          |
| 1.1.2.2 Antibióticos en leche .....   | 11          |
| 1.1.3 Antibióticos y salud pública .....  | 12          |
| 1.1.3.1 Penicilina .....  | 14          |
| 1.1.3.2 Oxitetraciclina .....   | 14          |
| 1.1.3.3 Tilosina .....  | 15          |
| 1.1.4 Queso .....   | 15          |
| 1.1.4.1 Queso tipo paria .....  | 16          |
| 1.1.4.2 Antibióticos en el queso .....  | 16          |
| 1.1.5 Métodos para detectar residuos de antibióticos .....                      | 17          |

|   |  |    |
|---|--|----|
| 1.1.5.1   | Preparación, esterilización de materiales y medios de cultivo .....      | 18 |
| 1.1.5.2   | Microorganismos indicadores de presencia de residuos antibióticos .....  | 18 |
| 1.1.5.2.1   | <i>Bacillus subtilis</i> .....   | 18 |
| 1.1.5.2.2   | <i>Lactobacillus bulgáricus</i> .....                                    | 19 |
| 1.1.5.2.3   | <i>Streptococcus thermophilus</i> .....                                  | 19 |
| 1.1.5.3   | Tipos de incubación .....  | 20 |
| 1.1.5.4   | Aislamiento de bacterias .....   | 20 |
| 1.1.5.5   | Preparación, fijación y coloración simple de frotis .....                | 21 |
| 1.1.5.6   | Métodos de inoculación y siembra de bacterias en medios de cultivo ..... | 22 |
| 1.1.5.7   | Medios de cultivo .....  | 23 |
| 1.1.5.8   | Medios selectivos .....  | 23 |
| 1.1.5.9   | Identificación bacteriana .....  | 23 |
| 1.1.6   | Valoración de pruebas diagnósticas .....                                 | 24 |
| 1.1.6.1   | Sensibilidad .....   | 24 |
| 1.1.6.2   | Especificidad .....  | 24 |
| 1.2   | Antecedentes .....   | 24 |
| <br><b>CAPÍTULO II</b><br><b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> |  |    |
| 2.1   | Identificación del problema .....  | 26 |
| 2.2   | Enunciados del problema .....  | 26 |
| 2.3   | Justificación .....  | 27 |
| 2.4   | Objetivos .....  | 28 |
| 2.4.1   | Objetivo general .....   | 28 |
| 2.4.2   | Objetivos específicos .....  | 28 |
| 2.5   | Hipótesis .....  | 28 |
| 2.5.1   | Hipótesis general .....  | 28 |
| 2.5.2   | Hipótesis específicos .....  | 28 |

**CAPÍTULO III****MATERIALES Y MÉTODOS**

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 3.1     | Lugar de estudio .....   | 29 |
| 3.2     | Población .....  | 29 |
| 3.3     | Muestra .....  | 29 |
| 3.4     | Método de investigación .....  | 30 |
| 3.4.1   | Procedimiento para determinar el pH del medio de cultivo, tiempo de incubación y el tipo de bacteria sensible .....          | 32 |
| 3.4.1.1 | Análisis estadístico para determinar el pH del medio de cultivo, tiempo de incubación y el tipo de bacteria sensible .....   | 34 |
| 3.4.1.2 | Determinar el punto óptimo del tratamiento en la bacteria más sensible .....   | 35 |
| 3.4.1.3 | Diseño experimental para determinar el punto óptimo del tratamiento en la bacteria más sensible .....                        | 36 |
| 3.4.2   | Procedimiento para determinar la concentración inhibitoria mínima de tres antibióticos en una bacteria sensible .....        | 36 |
| 3.4.2.1 | Análisis estadístico para determinar la concentración inhibitoria mínima de tres antibióticos en una bacteria sensible ..... | 37 |
| 3.4.3   | Metodología para determinar la especificidad y sensibilidad del método biológico .....                                       | 38 |
| 3.4.3.1 | Metodología para la elaboración del queso tipo paria .....   | 38 |
| 3.4.3.2 | Metodología para la elaboración del queso tipo paria con antibiótico .....   | 39 |
| 3.4.3.3 | Metodología para determinar antibiótico en el queso tipo paria .....   | 40 |

**CAPÍTULO IV****RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4.1   | pH del medio de cultivo, tiempo de incubación y el tipo de bacteria sensible ..... | 42 |
| 4.1.1 | Halo de inhibición de penicilina en diferentes bacterias .....                     | 42 |
| 4.1.2 | Halo de inhibición de oxitetraciclina en diferentes bacterias .....                | 48 |
| 4.1.3 | Halo de inhibición de tilosina en difentes bacterias .....                         | 54 |

|                       |  |    |
|-----------------------|--|----|
| 4.1.4                 | Punto óptimo del tratamiento en la bacteria más sensible .....   | 60 |
| 4.2                   | Concentración inhibitoria mínima de tres antibióticos .....  | 65 |
| 4.2.1                 | Concentración inhibitoria mínima para penicilina en tres bacterias <i>B. subtilis</i> , <i>L. bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i> .....      | 65 |
| 4.2.2                 | Concentración inhibitoria mínima para oxitetraciclina en tres bacterias <i>B. subtilis</i> , <i>L. bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i> ..... | 67 |
| 4.2.3                 | Concentración inhibitoria mínima para tilosina en tres bacterias <i>B. subtilis</i> , <i>L. bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i> .....        | 69 |
| 4.3                   | Especificidad y sensibilidad del método biológico .....  | 71 |
| 4.3.1                 | Especificidad del método biológico .....   | 71 |
| 4.3.2                 | Sensibilidad del método biológico .....  | 73 |
| 4.3.2.1               | Sensibilidad para penicilina .....   | 74 |
| 4.3.2.2               | Sensibilidad para oxitetraciclina .....  | 74 |
| 4.3.2.3               | Sensibilidad para tilosina .....   | 75 |
| 4.3.3                 | Residuos de antibióticos en queso tipo paria expandida en los mercados de la ciudad de Puno .....  | 75 |
| CONCLUSIONES .....    |  | 78 |
| RECOMENDACIONES ..... |  | 79 |
| BIBLIOGRAFÍA .....    |  | 80 |
| ANEXOS .....          |  | 90 |

**ÍNDICE DE TABLAS**

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| 1. Requisitos físico-químicos .....   | 7           |
| 2. Requisitos microbiológicos .....   | 8           |
| 3. Requisitos de calidad higiénica .....  | 8           |
| 4. Límites máximos de residuos de antimicrobianos para la leche de vaca .....   | 9           |
| 5. Niveles inhibidores de penicilina .....                                      | 12          |
| 6. Procesos para Tinción Gram .....   | 32          |
| 7. Especificidad y sensibilidad del método biológico .....                      | 38          |
| 8. Especificidad del método biológico .....                                     | 72          |
| 9. Sensibilidad del método biológico .....                                      | 73          |
| 10. Residuos de antibióticos en queso tipo paria expandida en la ciudad de Puno | 76          |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| 1. Técnica de aislamiento por estría en superficie .....  | 20          |
| 2. Aislamiento de bacterias por estrías y siembra de bacterias por inmersión ...                                | 31          |
| 3. Esquema de las mediciones del halo de inhibición .....   | 32          |
| 4. Diagrama de flujo para determinar el pH del medio de cultivo, tiempo de incubación y bacteria sensible ..... | 33          |
| 5. Diagrama de flujo para determinar el punto óptimo del tratamiento en la bacteria más sensible .....          | 35          |
| 6. Diagrama de flujo para determinar la concentración inhibitoria mínima .....                                  | 37          |
| 7. Diagrama de flujo para la elaboración de queso tipo paria .....  | 39          |
| 8. Diagrama de flujo para la elaboración de queso tipo paria con adición de antibióticos .....                  | 40          |
| 9. Diagrama de flujo para determinación de antibióticos en queso tipo paria ...                                 | 41          |
| 10. Halo de inhibición de penicilina en diferentes bacterias .....  | 43          |
| 11. Halo de inhibición de penicilina en diferentes pH .....   | 44          |
| 12. Halo de inhibición de penicilina en diferentes tiempos .....  | 44          |
| 13. Halo de inhibición de penicilina en diferentes bacterias y pH .....   | 45          |
| 14. Halo de inhibición de penicilina en diferentes bacterias y tiempos .....                                    | 46          |
| 15. Halo de inhibición de penicilina en diferentes tiempos y pH .....   | 46          |
| 16. Halo de inhibición de penicilina en diferentes bacterias, tiempos y pH .....                                | 47          |
| 17. Homogeneidad del experimento con el antibiótico penicilina .....  | 48          |
| 18. Halo de inhibición de oxitetraciclina en diferentes bacterias .....   | 49          |
| 19. Halo de inhibición de oxitetraciclina en diferentes pH .....  | 49          |
| 20. Halo de inhibición de oxitetraciclina en diferentes tiempos .....   | 50          |
| 21. Halo de inhibición de oxitetraciclina en diferentes bacterias y pH .....                                    | 51          |
| 22. Halo de inhibición de oxitetraciclina en diferentes bacterias y tiempos .....                               | 51          |
| 23. Halo de inhibición de oxitetraciclina en diferentes tiempos y pH .....                                      | 52          |
| 24. Halo de inhibición de oxitetraciclina en diferentes bacterias, tiempos y pH ..                              | 53          |
| 25. Homogeneidad del experimento con el antibiótico oxitetraciclina .....                                       | 54          |
| 26. Halo de inhibición de tilosina en diferentes bacterias .....  | 55          |
| 27. Halo de inhibición de tilosina en diferentes pH .....   | 55          |
| 28. Halo de inhibición de tilosina en diferentes tiempos .....  | 56          |

|  |    |
|--|----|
| 29. Halo de inhibición de tilosina en diferentes bacterias y pH .....  | 57 |
| 30. Halo de inhibición de tilosina en diferentes bacterias y tiempos .....   | 57 |
| 31. Halo de inhibición de tilosina en diferentes tiempos y pH .....  | 58 |
| 32. Halo de inhibición de tilosina en diferentes bacterias, tiempos y pH .....                                       | 59 |
| 33. Homogeneidad del experimento con el antibiótico tilosina .....   | 60 |
| 34. Evaluación de la curvatura de penicilina en <i>B. subtilis</i> .....   | 61 |
| 35. Evaluación de la curvatura de oxitetraciclina en <i>B. subtilis</i> .....  | 62 |
| 36. Evaluación de la curvatura de tilosina en <i>B. subtilis</i> .....   | 62 |
| 37. Determinación del rango óptimo del halo de inhibición de penicilina en la bacteria <i>B. subtilis</i> .....      | 63 |
| 38. Determinación del rango óptimo del halo de inhibición de oxitetraciclina en la bacteria <i>B. subtilis</i> ..... | 64 |
| 39. Determinación del rango óptimo del halo de inhibición de tilosina en la bacteria <i>B. subtilis</i> .....        | 64 |
| 40. Concentración inhibitoria mínima de penicilina en la bacteria <i>B. subtilis</i> .....                           | 66 |
| 41. Concentración inhibitoria mínima de penicilina en la bacteria <i>L. bulgaricus</i> .....                         | 66 |
| 42. Concentración inhibitoria mínima de penicilina en la bacteria <i>S. thermophilus</i> .....                       | 67 |
| 43. Concentración inhibitoria mínima de oxitetraciclina en la bacteria <i>B. subtilis</i> .....                      | 68 |
| 44. Concentración inhibitoria mínima de oxitetraciclina en la bacteria <i>L. bulgaricus</i> .....                    | 68 |
| 45. Concentración inhibitoria mínima de oxitetraciclina en la bacteria <i>S. thermophilus</i> .....                  | 69 |
| 46. Concentración inhibitoria mínima de tilosina en la bacteria <i>B. subtilis</i> .....                             | 70 |
| 47. Concentración inhibitoria mínima de tilosina en la bacteria <i>S. thermophilus</i> .....                         | 70 |
| 48. Concentración inhibitoria mínima de tilosina en la bacteria <i>L. bulgaricus</i> .....                           | 71 |

## ÍNDICE DE ANEXOS

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| 1. Especificaciones técnicas de Lyofast Y 456 B .....  | 91          |
| 2. Diámetro (mm) de halo de inhibición producido por la penicilina a diferentes<br>tratamientos .....  | 92          |
| 3. Análisis de varianza de halo de inhibición de penicilina a diferentes<br>tratamientos .....   | 93          |
| 4. Diámetro (mm) de halo de inhibición producido por la oxitetraciclina a<br>diferentes tratamientos .....   | 95          |
| 5. Análisis de varianza de halo de inhibición de oxitetraciclina a diferentes<br>tratamientos .....  | 96          |
| 6. Diámetro (mm) de halo de inhibición producido por la tilosina a diferentes<br>tratamientos .....  | 98          |
| 7. Análisis de varianza de halo de inhibición de tilosina a diferentes tratamientos  | 99          |
| 8. Evaluación de la curvatura del diseño factorial para <i>B. subtilis</i> .....   | 101         |
| 9. Diámetro (mm) de halo de inhibición producido por la penicilina,<br>oxitetraciclina y tilosina a diferentes tratamientos .....                              | 102         |
| 10. Análisis de varianza para determinar el rango óptimo del tratamiento para<br>penicilina .....  | 103         |
| 11. Análisis de varianza para determinar el rango óptimo del tratamiento para<br>oxitetraciclina .....   | 104         |
| 12. Análisis de varianza para determinar el rango óptimo del tratamiento para<br>tilosina .....  | 105         |
| 13. Concentración inhibitoria mínima para penicilina en tres bacterias <i>B. subtilis</i> ,<br><i>L. bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i> .....             | 106         |
| 14. Concentración inhibitoria mínima para oxitetraciclina en tres bacterias <i>B.</i><br><i>subtilis</i> , <i>L. bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i> ..... | 108         |
| 15. Concentración inhibitoria mínima para tilosina en tres bacterias <i>B. subtilis</i> , <i>L.</i><br><i>bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i> .....        | 110         |
| 16. Fotografías .....  | 112         |

## RESUMEN

En la investigación se validó una prueba biológica que servirá como prueba tamiz, para detectar residuos de antibióticos en queso tipo paria. Se determinó el pH óptimo del medio de cultivo, tiempo de incubación y el tipo de bacteria sensible, como también la concentración inhibitoria mínima de tres antibióticos y la especificidad y sensibilidad del método biológico. Las pruebas *in vitro* se ejecutaron en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno, utilizando cepas sensibles (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) a pH 6.0; 7.0 y 8.0, en tiempos de 18 y 24 horas, utilizando el método de los orificios, con tres antibacterianos (Penicilina, Oxitetraciclina y Tilosina) y en cada placa se realizaron perforaciones de 8 mm de diámetro en el sustrato de cultivo con una separación de 30 mm entre sí. Se determinó que la bacteria más sensible es *Bacillus subtilis* a un pH 7.0, temperatura 35°C y tiempo de 18 horas. La especificidad y sensibilidad de los tres antibióticos en el método biológico fue mayor al 90%. Mediante la prueba biológica se ha detectado presencia de residuos de antibióticos en promedio 7.40% en quesos tipo paria de los mercados de la ciudad de Puno. Por lo tanto la prueba biológica resulta adecuada para detectar presencia de residuos de antibacterianos.

**Palabras clave:** Cepas sensibles, prueba biológica, sensibilidad, pH, validación.

## ABSTRACT

The research validated a biological test that will serve as a screening test to detect antibiotic residues in pariah type cheese. The optimal pH of the culture medium, incubation time and the type of sensitive bacteria were determined, as well as the minimum inhibitory concentration of three antibiotics and the specificity and sensitivity of the biological method. The in vitro tests were carried out in the microbiology laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of the National University of Altiplano - Puno, using sensitive strains (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*) at pH 6.0; 7.0 and 8.0, in times of 18 and 24 hours, using the orifice method, with three antibacterials (Penicillin, Oxytetracycline and Tylosin) and in each plate 8 mm diameter perforations were made in the culture substrate with a separation of 30 mm each other. It was determined that the most sensitive bacterium is *Bacillus subtilis* at pH 7.0, temperature 35 °C and time of 18 hours. The specificity and sensitivity of the three antibiotics in the biological method was greater than 90%. Through the biological test, the presence of antibiotic residues has been detected on average 7.40% in pariah type cheeses from the markets of the city of Puno. Therefore, the biological test is adequate to detect the presence of antibacterial residues.

**Key words:** Sensitive strains, biological test, sensitivity, pH, validation.

## INTRODUCCIÓN

Cuando se observa las enfermedades transmitidas por alimentos, la sociedad exige alimentos sanos y seguros, sobre todo tratándose de productos de mayor consumo como los derivados lácteos, cuyos consumidores principales en su mayoría son niños, lo que constituye una población de alto riesgo (San Martín, Cañón, Quiróz, & Hernández, 2000).

Según MINAGRI (2015) refiere que en la región Puno a setiembre del año 2015 se produce aproximadamente 84,700 TM de leche. Por otro lado Flores (2015) indica que alrededor del 95% de la producción total de leche son destinados para la producción de Quesos de diferentes variedades y el Queso tipo paria es uno de los principales productos los que son producidos por pequeños productores o procesadores.

Según Monroy, Linares, & Ramírez (2015) refieren que los antibióticos ha permitido salvar la vida de millones de personas y animales, sin embargo Pardo & Almanza (2005) indica que la amplia utilización de antibióticos, involucren el riesgo de que lleguen estas sustancias extrañas e inhibidoras afectar la calidad de la leche y derivados. Por otro lado Denobile & Nascimento (2004) menciona que los antibacterianos son comúnmente utilizados en vacas de lechería para el tratamiento de mastitis y también como suplementos en su dieta lo cual contribuye a la existencia de poblaciones bacterianas zoonóticas resistentes.

Según Ortiz *et al.* (2011) la leche adulterada y sub productos con residuos de antibióticos constituye grave riesgo para la salud pública. Por otro lado Briones (2005) indica que los residuos de antimicrobianos presentes en la leche y derivados pueden causar efectos adversos en el consumidor como hipersensibilidad, alteraciones de la microflora intestinal, resistencia bacteriana. No obstante Samandoulougou *et al.* (2015) refiere que la vigilancia en el consumo de antibióticos es fundamental en la toma de decisiones en la salud pública, con el fin de evitar el aumento de los costos sanitarios, además de posibles efectos ecológicos que conducirían a la selección de formas bacterianas resistentes.

Uno de los mayores inconvenientes en cuanto a la presencia de residuos de antibacterianos en leche y derivados tiene que ver con la problemática de la efectividad de los métodos de detección de inhibidores. Entre los aspectos a considerar está la importancia del control de residuos de antibacterianos en derivados lácteos, para asegurar así un producto de mejor calidad, tanto higiénica como sanitaria. Según Gatica & Gesche

(2007) refiere que el método de los orificios o pocillos ayuda en la determinación de diferentes antibióticos para diferentes productos alimenticios. Por otro lado (Orós, 2014) refiere que la mayoría de los productores en la región Puno utiliza 3 antibacterianos (Penicilina, Oxitetraciclina y Tilosina) con mayor oferta para vacas de lechería.

Con el presente estudio se pretende introducir un método de análisis más apropiado para determinar residuos de antibióticos en queso tipo paria, a su vez nos permitirá tomar decisiones orientadas a la preservación de la salud pública. Por consiguiente el presente trabajo está orientado a dar respuesta a las siguientes interrogantes:

¿El uso de bacterias antibiótico sensibles puede ser utilizado para detectar residuos de antibióticos en queso tipo paria?, ¿Cuál es el pH del medio de cultivo, tiempo de incubación y el tipo de bacteria sensible?, ¿Cuál es la concentración mínima inhibitoria de tres antibióticos en una bacteria sensible? y ¿Cuál es la especificidad y sensibilidad del método biológico?

La Tesis está estructurada en IV capítulos:

En el primer capítulo, se destaca los fundamentos teóricos de la investigación, segmentado en dos partes, el primero corresponde al marco teórico considerando conceptos básicos referentes al estudio sobre los antibióticos, las bacterias y métodos empleados, el segundo corresponde a los antecedentes.

En el segundo capítulo; se diagnostica los problemas de uso inadecuado de los antibióticos y la aparición de cepas resistentes a los antimicrobianos, donde presentamos el problema a través de su descripción del enunciado, justificación y objetivos.

En el tercer capítulo; se presenta la metodología empleada, el tipo de investigación y la población de estudio, en este último punto se analiza la muestra empleada, teniendo en cuenta procedimientos para llevar los datos a un diseño estadístico.

En el cuarto capítulo; se presenta los resultados de la investigación, los cuales están expresados en cuadros y gráficos para su mejor comprensión, los que fueron importantes para llegar a las conclusiones acordes a los objetivos planteados.

## CAPITULO I

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 1.1 Marco teórico

La estructura productiva del departamento de Puno es básicamente agropecuaria y las características son: Instituciones desarticuladas y desintegradas en la estructura productiva, bajos niveles de producción y comercialización, ocupación del territorio heterogéneo. Los recursos económicos de los pobladores del altiplano provienen de actividades agropecuarias que se desarrollan en situaciones muy adversas como sequía, inundaciones, granizadas, heladas y la coyuntura actual de esta actividad se encuentra en estancamiento y la tendencia nos muestra que se mantendrá mientras no se modifique la política económica y agropecuaria a nivel nacional (Yapuchura, 2006).

Según Cetraro (2008) refiere que la importancia de Puno en el contexto nacional se evidencia en el caso de la carne y fibra de alpaca, que se considera como uno de los rubros más importantes para el desarrollo de la región; asimismo merece especial atención la explotación de derivados lácteos por su dinamismo creciente así como la generación de puestos de trabajo. Por otro lado MINCETUR (2006) indica que se aprecia un fuerte desarrollo empresarial impulsado por emprendedores de productos lácteos.

En Puno la presencia del ganado Brown Swiss persiste por el tema de altura, produciendo leche fresca de muy buena calidad ideal para la elaboración de quesos, y en la actualidad tienen mayor influencia en el desarrollo de técnicas de elaboración en derivados lácteos y Puno se ha considerado como uno de los representantes de la pequeña y mediana industria láctea (Sotelo, 2011).

La región Puno cuenta con escasas plantas de transformación de derivados lácteos, que garanticen los productos con certificación sanitaria, marca, etc. En su gran mayoría existen centros de producción artesanal, que producen quesos tipo “Paria” (MINAGRI, 2008).

### **1.1.1 Leche**

Según León (2013) indica que la leche es el primer y único alimento que ingieren los mamíferos. Es un producto nutritivamente muy completo y aporta las proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales que el recién nacido necesita para sobrevivir y para crecer. No obstante NTP 202.001 (2003), refiere que la leche es el producto íntegro de la secreción mamaria normal sin adición ni sustracción alguna y que ha sido obtenida mediante el ordeño.

La leche y sus derivados lácteos son alimentos de gran importancia en salud pública que deben cumplir con requisitos establecidos para garantizar la protección de la salud de los consumidores (Chamorro, López, Astaiza, Benavides, & Hidalgo, 2010).

#### **1.1.1.1 Acidez de la leche**

Es una medida del desarrollo bacteriano, es decir de la cantidad de ácido láctico producido por ellas (Dianda, 2005).

La acidez de la leche es muy importante para la elaboración de cualquier producto, porque determina si la leche es fresca, o está en vías de alteración; la acidez presentada en la mayoría de las cuencas lecheras de la región Puno sobrepasa la NTP 201.001.2003 que tiene relación directa con el pH (Brousett, Torres, Chambi, Mamani, & Gutiérrez, 2015).

#### **1.1.1.2 pH de la leche**

Según Robinson & Wilbey (2010) refieren que existen en la leche sustancias ácidas y alcalinas; la mayor acidez es la mayor cantidad posible de cargas positivas, es decir de H<sup>+</sup> (Hidrogeno) y la mayor alcalinidad es la mayor cantidad de cargas negativas, es decir OH (oxhidrilo). Arbitrariamente se ha hecho una escala, en la cual la máxima acidez es 0 y la máxima alcalinidad es 14. El neutro por consiguiente es 7. La leche tiene un pH igual

a 6.8 – 6.75, es decir que es levemente acida y esto es debido a las cargas de las proteínas. Si el valor es menor la leche está acidificando. Si es mayor puede ser alcalina (leche mastitica), porque pasa sangre a la leche y esta tiene sal – cloruro de sodio, que es alcalina.

Los cambios físicos, químicos y biológicos que ocurren en la leche desde que sale de la ubre, hasta que el queso está totalmente maduro se deben, al menos en parte, al pH (concentración de iones hidrógeno) del líquido o su cuajada. El delicado equilibrio físico entre los constituyentes de la leche, debido a la ionización de componentes, la captación de protones y la dispersión de sales y proteínas entre fases, determina una capacidad tampón frente al cambio de pH. El equilibrio ácido – base de la leche, suero o cuajada, es un parámetro útil para el procesado de queso (Robinson & Wilbey, 2010).

La mayoría de los microorganismos crecen mejor a valores de pH en torno a 7,0 (6,6-7,5) mientras que son pocos los que crecen por debajo de 4,0. Se ha demostrado que los pH mínimos de determinados lacto bacilos dependen del ácido usado, siendo los ácidos cítricos, clorhídrico, fosfórico, y tartárico los que permiten el crecimiento en un valor más bajo que los ácidos acético o láctico. La excelente calidad de conservación de estos productos es debida en gran parte al pH (Andino & Castillo, 2010).

### **1.1.1.3 Calidad de la Leche**

La calidad de la leche cruda destinado para derivados lácteos depende de numerosos factores relacionados con la producción en la granja. Algunos de estos aspectos deben controlarse mediante unas buenas prácticas ganaderas y el cuidado de la salud y estado de los animales; otros, con unas buenas prácticas de ordeño y sistemas de limpieza y desinfección eficaces (Early, 2000).

Cuando se considera a la leche desde el punto de la calidad se utiliza un vocablo de alcance muy general en el que van comprendidas, su composición, los diversos elementos que la constituyen, el sabor y el aroma, la posible presencia en ella de sustancias extrañas, la cantidad de microorganismos presentes (patógenos o no) y la acción de los mismos, las condiciones

sanitarias del lugar de producción y la manipulación higiénica de la leche desde el lugar de producción al de consumo (González, Vega, & Castillo, 2002).

Según Chamorro, López, Astaiza, Benavides, & Hidalgo (2010) la leche es una fuente de alimento de aceptación universal, por su aporte nutricional, no superada por ningún otro alimento conocido por el ser humano. Debido a esto la importancia de asegurar una leche de óptima calidad, adecuada para el consumo de una población.

#### **1.1.1.4 Valoración de la calidad composicional e higiénica de la leche**

Según Early (2000) los análisis que se realizan sobre la leche cruda son: presencia de antibióticos, aguado, contenido graso, contenido en sólidos lácteos no grasos, extracto seco total y recuento microbiológico; los recuentos bacterianos se suelen efectuar individualmente para controlar la calidad de la leche de cada uno de los proveedores.

Según NTP 202.001 (2003) la leche cruda deberá estar exenta de sustancias conservadoras y de cualquier otra sustancia extraña a su naturaleza y no podrá haber sido sometida a tratamiento alguno que disminuya o modifique sus componentes originales. En la Tabla 1 se puede observar los requisitos físico-químicos que debe cumplir la leche cruda:

Tabla 1

*Requisitos físico-químicos*

| ENSAYO  | REQUISITO       |
|---|-----------------|
| Materia grasa (g/100g)                                      | Mínimo 3,2      |
| Sólidos no grasos (g/100g)                                  | Mínimo 8,2      |
| Sólidos totales (g/100g)                                    | Mínimo 11,4     |
| Acidez, expresada en g. de ácido láctico (g/100g)           | 0,14 - 0,18     |
| Densidad a 15°C (g/mL)                                      | 1,0296 - 1,0340 |
| Índice de refracción del suero, 20°C                        | Mínimo 1,34179  |
| Ceniza total (g/100g)                                       | Máximo 0.7      |
| Alcalinidad de la ceniza total (mL de Solución de NaOH 1 N) | Máximo 1,7      |
| Índice crioscópico  | Máximo -0,540°C |
| Sustancias extrañas a su naturaleza                         | Ausencia        |
| Prueba de alcohol (74 % v/v)                                | No coagulable   |
| Prueba de la reductasa con azul de metileno                 | Mínimo 4 horas  |

Fuente: NTP 202.001 (2003)

En la Tabla 2 se puede observar los requisitos microbiológicos que debe cumplir la leche cruda:

Tabla 2

*Requisitos microbiológicos*

| ENSAYO   | REQUISITO        |
|--|------------------|
| Numeración de microorganismos Mesófilos aerobios y facultativos viables ufc/mL | Máximo 1 000 000 |
| Numeración de coliformes ufc/mL  | Máximo 1 000     |

Fuente: NTP 202.001 (2003)

La leche cruda deberá estar exenta de color, olor, sabor y consistencia, extraños a su naturaleza. En la Tabla 3 se puede observar los requisitos de calidad higiénica que debe cumplir la leche cruda:

Tabla 3

*Requisitos de calidad higiénica*

| ENSAYO                           | REQUISITO      |
|----------------------------------|----------------|
| Conteo de células somáticas / mL | Máximo 500 000 |

Fuente: NTP 202.001 (2003)

A nivel de la comunidad europea, por la Directiva 96/23/CE, que establece la obligatoriedad de detectar la presencia de residuos de medicamentos veterinarios y otras sustancias como pesticidas, micotoxinas, etc. en todos los productos de origen animal destinados al consumo humano, dentro de un plan nacional de vigilancia de residuos. Por no existir en nuestro país una norma que establece los Límites Máximos de Residuos de antimicrobianos, será tomada en cuenta la norma de la Comunidad Europea, para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima en la leche para procesar queso con antibiótico, en el presente trabajo (Reglamentos, 2010).

En la Tabla 4 se puede observar los límites máximos de residuos de antimicrobianos para la leche de vaca:

Tabla 4

*Límites Máximos de Residuos de antimicrobianos para la leche de vaca*

| ANTIMICROBIANOS                | LMR ( $\mu\text{g/Kg}$ ) |
|--------------------------------|--------------------------|
| <b>Betalactámicos</b>          |                          |
| Bencilpenicilina               | 4                        |
| <b>Tetraciclina</b>            |                          |
| Oxitetraciclina                | 100                      |
| <b>Macrólidos/lincosamidas</b> |                          |
| Tilosina                       | 50                       |

Fuente: Reglamentos UE (2010)

### 1.1.1.5 Calidad de la leche para la producción del queso

La composición química y la calidad microbiológica de la leche empleada para la fabricación del queso, tienen una gran influencia sobre el rendimiento y sobre las características del producto final. Antes de proceder a la elaboración del queso, la leche se puede someter a diversos tratamientos, bien para garantizar una buena calidad, o bien para impartir una textura específica y un flavor característico a la cuajada (Early, 2000).

Según Agudelo, Torres, Alvarez, & Vélez (2015) manifiestan que dos de los principales impactos de la globalización sobre los sistemas productivos lecheros locales son; a) la búsqueda de una mayor integración vertical con sus proveedores para tratar de influir en sus decisiones, con la intención de controlar el proceso productivo; b) la exigencia y presión sobre los ganaderos para que cada vez entreguen leche más inocua y de mejor calidad, a bajo precio; por otro lado Acosta, Romero, & Taborda (2014) refieren que es evidente que se debe fortalecer la implementación de buenas prácticas ganaderas, a fin de garantizar un alimento inocuo al consumidor.

Realizar un análisis completo de la cadena de leche de vaca en todo el país es complejo, por el tamaño de la actividad láctea, por la diversidad de los sistemas de producción y por la cantidad de productos que integran la cadena, lo cual requeriría gran cantidad de recursos y de tiempo para realizarlo (Cuevas *et al.*, 2007).

### 1.1.2 Mastitis

La mastitis bovina es considerada la enfermedad infecciosa del ganado lechero de mayor impacto económico mundial, siendo *Staphylococcus aureus* el principal agente patógeno en muchos países. Si bien existen métodos para prevenir y controlar la mastitis bovina, la terapia con antibióticos desempeña un papel determinante en la eliminación de infecciones, aun cuando esta práctica lleve a la selección de cepas resistentes que intervienen de manera negativa en el tratamiento. (Pellegrino, Frola, Odierno, & Bogni, 2011)

Según Reyes, Villar, & Olivera (2010) actualmente, los residuos más importantes que aparecen en la leche son los producidos por medicamentos antimicrobianos. Las mastitis generan grandes pérdidas económicas representadas en la disminución de la producción, alteración de la calidad de la leche, la fuente de contaminación para otros animales, los costos por tratamiento y los descartes, y por el riesgo potencial que presentan para la salud humana (Cerón, Agudelo, & Maldonado, 2007).

#### 1.1.2.1 Tratamiento de mastitis

Según Belloso (2002) Los antibióticos son considerados habitualmente como uno de los descubrimientos terapéuticos más importantes de la historia de la medicina. En la actualidad es muy improbable que alguien pueda vivir su vida sin recibir algún tipo de agente antimicrobiano. Por otro lado Falcón (2014) refiere que los antibióticos son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y pueden eventualmente destruirlos.

Según Denobile & Nascimento (2004) los antibióticos son ampliamente utilizados en el tratamiento de enfermedades en el ganado lechero y también como suplementos en su dieta. Por otro lado León (2013) menciona que actualmente los antibióticos son usados por cualquier persona en el tratamiento de enfermedades de su ganado, sin ser necesario para la adquisición de estos una receta de un médico veterinario y menos aún que este último haya revisado al animal, las personas que hacen uso de los

antibióticos en los tratamientos tampoco respetan las dosis necesarias para el control de la enfermedad.

Según Máttar, Calderón, Sotelo, Sierra, & Tordecilla (2009) refiere que los antibióticos y otros antimicrobianos se utilizan ampliamente en los tratamientos de la mastitis y otras enfermedades ya que constituye la principal herramienta terapéutica en el control y, en algunos casos, en la erradicación de enfermedades infecciosas de origen bacteriano en los diferentes sistemas de crianza intensivo. Sin embargo, la gran mayoría de estos productos son susceptibles de dejar residuos en los alimentos procedentes de los animales que han sido tratados y de esta forma llegar a la población generando diversos efectos adversos.

#### **1.1.2.2 Antibióticos en leche**

Según Salas, Calle, Falcón, Pinto, & Espinoza (2013) la leche constituye una vía natural de eliminación para los antibióticos y sus metabolitos, y la cantidad presente depende de la dosis y vía de aplicación, nivel de producción de leche, tipo y grado de afección mamaria y tiempo que media entre el tratamiento y el ordeño.

Según Maluf, Castro, & Braga (2012) refiere que la presencia de residuos de antibióticos representa la principal contaminación química en la leche y los productos lácteos. La leche con antibióticos se considera inadecuada para el consumo, representando riesgos para la salud, además de la posibilidad de interferencia en los procesos tecnológicos de producción.

Estudios previos en el Perú demuestran la presencia de varias familias de antibióticos cuyos residuos contaminan la leche fresca. A pesar del riesgo de estos metabolitos, la Norma Técnica Peruana referente a la leche cruda no considera explícitamente este parámetro entre sus indicadores de calidad, posiblemente debido a la reducida publicación científica existente en el medio al respecto (Ortiz et al., 2011).

Para evitar contaminar tanques de acopio con leche de vacas tratadas, los productores se beneficiarían de tener pruebas in situ que les permitan hacer sus propios controles (Díez, Pérez, Olivera, Restrepo, & Villar, 2013).

Según Barrera & Ortez (2012) indican que los antimicrobianos (antibióticos y sulfas) ya sean con fines terapéuticos (sistémicos o locales) o preventivos, han sido ampliamente utilizados en la medicina veterinaria con el fin de controlar y, en algunos casos, erradicar las enfermedades bacterianas. Pero, estos fármacos pueden ser dañinas para la salud del consumidor y perjudiciales para la industria lechera.

Según Robinson & Wilbey (2010) refiere que la inyección directa de estos agentes en la corriente sanguínea de un animal lechero o incluso la ingestión oral, hace que la leche segregada contenga cantidades variables de compuestos bactericidas o bacteriostáticos. En la Tabla 5 se indican los niveles inhibidores de penicilina de algunos microorganismos empleados en quesería.

Tabla 5

*Niveles inhibidores de penicilina*

| Microorganismos                                  | Niveles inhibidores de penicilina<br>(unidades internacionales) |        |
|--|---|--------|
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>   | 0.1   | - 0.5  |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> | 0.05  | - 0.1  |
| <i>Streptococcus thermophilus</i>                | 0.01  | - 0.05 |
| <i>Enterococcus faecalis</i>                     | 0.25  | - 0.45 |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i>                  | 0.25  | - 0.5  |
| <i>Lactobacillus casei</i>                       | 0.25  | - 0.5  |
| <i>Lactobacillus helveticus</i>                  | 0.25  | - 0.5  |
| <i>Propionibacterium shermani</i>                | 0.05  | - 0.1  |
| Cultivo mixto iniciador                          | 0.25  | - 0.5  |

Fuente: Robinson & Wilbey (2010)

### 1.1.3 Antibióticos y salud pública

Desde 1945, Fleming prevé los riesgos potenciales ligados a la utilización de los antibióticos. Teme que su utilización a gran escala seleccione bacterias resistentes, en su laboratorio, observa que bacterias sensibles a la penicilina al comienzo del experimento consiguen multiplicarse en presencia de concentraciones

crecientes del antibiótico. Consta que las bacterias sensibles habían sido destruidas y las bacterias resistentes se habían multiplicado sin límite (Embíd, 2000).

En la especie bovina los antimicrobianos son administrados con fines terapéuticos o profilácticos. Errores en la posología y el incumplimiento del tiempo de retiro, podrían generar la presencia de residuos en la carne destinada al consumo humano, pudiendo afectar la salud del consumidor por reacciones alérgicas o alteraciones de la microbiota intestinal o favoreciendo la selección de bacterias resistentes (Vela, Tafur, Vela, & Suárez, 2014).

Según Ortiz *et al.* (2011) La leche adulterada y sub productos con residuos de antibióticos constituye, como tal, un grave riesgo para la salud pública. Por otro lado Briones (2005) indica que los residuos de antimicrobianos presentes en la leche y derivados pueden causar efectos adversos en el consumidor como hipersensibilidad, alteraciones de la microflora intestinal y resistencia bacteriana. No obstante Samandoulougou *et al.* (2015) refiere que se deben tomar medidas para garantizar la seguridad del consumidor y reducir el impacto de estos antimicrobianos en la selección de cepas de bacterias patógenas resistentes.

Según Muñoz, Arango, & Jaramillo (2014) refiere que el descubrimiento de los antibióticos y su impacto sobre las infecciones bacterianas representó un capítulo muy importante dentro de la historia de la ciencia del siglo XX. Sin embargo, su uso inadecuado ha conllevado efectos adversos, entre ellos la resistencia bacteriana a estos productos. Esta representa un grave problema de salud pública debido a que muchas enfermedades han dejado de responder a los antibióticos de uso común y genera creciente preocupación en los consumidores debido a los riesgos de toxicidad o reacciones alérgicas en personas hipersensibles, y a la posibilidad de generación de resistencia por parte de microorganismos patógenos. Por otro lado Camacho *et al.* (2010) refiere que los residuos de antibióticos en leche y en los productos de origen animal ha aumentado en los últimos años, representando un riesgo para la salud pública.

Los antibióticos constituyen uno de los agentes farmacológicos peor usados, tanto a nivel médico como veterinario, siendo administrados en muchas ocasiones de forma irracional y en dosis inadecuadas. El empleo indiscriminado de estos

productos puede acompañarse de complicaciones tales como reacciones alérgicas, superinfecciones, retrasos en la identificación del germen causal; quizás, una de las complicaciones más importantes es la aparición de gérmenes antibiótico-resistentes que a su vez, crea la necesidad cada vez mayor de nuevas drogas (Cancho, García, & Simal, 2000).

Según Sabah (2015) refieren que la presencia de antibióticos en los productos alimenticios puede provocar diarrea asociada a los antibióticos, alergias y otros problemas intestinales en el consumidor. Un alimento inocuo es aquel que no ocasiona un daño o enfermedad a la persona que lo consume.

### **1.1.3.1 Penicilina**

En la actualidad, cada día es más amplio el arsenal de nuevos antibióticos disponibles para el tratamiento de los diferentes procesos infecciosos. No obstante, la penicilina y sus derivados constituyen drogas de primera línea en muchos de estos procesos. Estos antibióticos no son relativamente tóxicos, inclusive a altas dosis; sin embargo, su uso frecuente conduce a la aparición de reacciones de hipersensibilidad que pueden definirse como aquellas donde aparece una respuesta inusual tras la administración de un medicamento o producto biológico (Alpízar, 2000).

Una unidad internacional (UI), es la actividad de la penicilina incluida en 0.6  $\mu$ g de sal sódica, y por lo tanto, 1 mg de dicha sal contendrá 1,667 UI de penicilina. Un mg de sal potásica contiene 1,595 UI. Un mg de la sal procainica tiene una equivalencia de 1,000 UI (Sumano & Ocampo, 2006).

### **1.1.3.2 Oxitetraciclina**

Las Oxitetraciclinas son compuestos antibacterianos utilizados en el ganado lechero para tratar enfermedades infecciosas, como la mastitis y también como aditivos en ración animal para mejorar la conversión alimenticia. El uso de las oxitetraciclinas puede acarrear la presencia de residuos de estos fármacos en la leche, principalmente si no se utilizan de acuerdo con las indicaciones y si no se respeta el período mínimo de eliminación de los antibióticos por la leche. La presencia de residuos de antibióticos en la leche interfiere en el proceso industrial de derivados, inhibiendo fermentos lácticos

usados en la producción de yogures y quesos, lo que, consecuentemente, causa serios perjuicios económicos. Los residuos de antibióticos en la leche de consumo pueden suponer un riesgo para la salud humana, por causar reacciones alérgicas en individuos sensibles, efectos adversos a la flora intestinal humana, perjudicando su acción protectora local, además de propiciar la selección de poblaciones de bacterias resistentes (Denobile & Nascimento, 2004).

Posee actividad frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo algunas especies de micoplasmas y rickettsias. Los efectos adversos de la residualidad de este grupo de fármacos para los consumidores son: cambios en la flora intestinal e inhibiciones terapéuticas por el desarrollo de resistencia bacteriana, riesgos teratogénicos, reacciones de hipersensibilidad y manchas en los dientes de niños (Acosta et al., 2014).

#### **1.1.3.3 Tilosina**

La Tilosina fue descubierta en 1960 por Mc Guire y colegas. Es una mezcla de antibióticos macrólidos producidos por una variedad de *Streptomyces fradiae* u otro semejante. La Tilosina es un antibiótico del grupo de los macrólidos; utilizado para combatir neumonía, septicemia hemorrágica, mastitis, conjuntivitis, leptospirosis, micoplasmosis, etc. en diversos animales domésticos como ovinos, caprinos, bovinos, cerdos y aves (Cárdenas & Asencios, 2008).

#### **1.1.4 Queso**

Sobre el queso se revela la existencia de casi 2000 nombres distintos que se aplican a este alimento, y continúan apareciendo periódicamente nombres nuevos para describir nuevas variedades (Robinson & Wilbey, 2010).

El término actual de “queso” deriva del latín “caseus”. Al queso se le denomina en alemán “Kase”, en francés “fromage” y en italiano “formaggio”. El incremento en el número de variedades hace que la propia definición de queso resulte muy difícil. Así, por ejemplo, la definición de la cuajada de leche producida por la actividad enzimática y subsiguiente separación del suero para la obtención de un coágulo más firme (Robinson & Wilbey, 2010).

La industria agroalimentaria es estratégica en la economía del país, no solo por el valor que genera, sino por el fomento a la actividad ganadera, como también por su capacidad de generar empleo, mediante el impulso de la industrialización de los productos lácteos, lo que ha derivado que estos se enfrentan a duras condiciones de competencia, unidas a las exigencias del consumidor ante un producto de primera necesidad como es el queso (López, 2011).

Cuando la leche presenta sustancias inhibitorias o extrañas se genera el problema para los productores lácteos pues esto influye directamente en la elaboración de los diferentes productos, como el queso, mantequilla, yogurt, etc, donde se produce el desarrollo de la flora del ácido láctico, la cual es inhibida por la presencia de antibióticos. (León, 2013)

Según Robinson & Wilbey (2010) el queso constituye una fuente proteica muy adecuada ya que normalmente contiene todos los aminoácidos esenciales.

Según Dávila & Hernández (2006) refiere que la necesidad de obtener productos de calidad es un reto que día a día se impone en las Industrias de Alimentos. Por otro lado De la Fuente & Barboza (2010) indica que la población está interesada en consumir alimentos libres de patógenos, con la menor cantidad de aditivos químicos, que sean sensorialmente aceptables, con un valor nutricional elevado y que representen una alternativa en la prevención de enfermedades.

#### **1.1.4.1 Queso tipo paria**

Según Vargas & Vigo (2016) refiere que el queso tipo paria es un queso maduro semiduro que se produce en el altiplano peruano, posee una corteza corrugada por el tipo de molde utilizado, es de color marfil amarillento. Tiene un sabor característico y posee una textura firme. El porcentaje de agua es no mayor al 40% y el pH es de 5.5.

#### **1.1.4.2 Antibióticos en el queso**

Los antibióticos se administran invariablemente al ganado para controlar enfermedades infecciosas, pero su uso indiscriminado, sin un control técnico y veterinario adecuado, puede llevar a una serie de

consecuencias negativas en todos los niveles de la cadena productiva de productos lácteos (Poggio *et al.*, 2009).

El efecto en la leche de quesería de la presencia de antibióticos y otros agentes quimioterapéuticos es la destrucción de aquellos microorganismos necesarios para el desarrollo de la acidez, el bouquet y el aroma en el queso. La inoculación de los animales con estos agentes, o su administración oral, provoca su aparición en la leche en cantidades variables. Como el objetivo del quesero es procurarse, en la producción de queso madurado de buenas características, la ayuda de las bacterias, la presencia de cualquiera de estas sustancias en la leche le perjudica (Robinson & Wilbey, 2010).

### 1.1.5 Métodos para detectar residuos de antibióticos

Según Cárdenas & Asencios (2008) refiere que el método está basado en la difusión del antibiótico ya sea desde un cilindro vertical, disco o excavación a través de una capa de agar gelificado en una placa Petri, en una extensión; tal que se produce la inhibición del crecimiento de los microorganismos agregados en un área circular o “zona de inhibición” que contiene una solución de antibiótico. Por otro lado López & Torres (2006) refieren que al cabo de 18 horas de incubación, en aquella zona donde el antibiótico es capaz de impedir el crecimiento de la bacteria aparece un halo de inhibición alrededor del disco.

Según Gatica & Gesche (2007) para detectar residuos de antibióticos en la leche se usan tres cepas sensibles con cuatro niveles de pH:

- *Bacillus stearothermophilus* a pH 7.0 (Placa 1)
- *Bacillus subtilis* a pH 6.0 (Placa 2)
- *Bacillus subtilis* a pH 7.2 (Placa 3)
- *Bacillus subtilis* a pH 8.0 (Placa 4)
- *Escherichia coli* a pH 8.0 (Placa 5);

Los ensayos de inhibición microbiológica se basan en el crecimiento de un microorganismo (normalmente *Bacillus stearothermophilus*) que origina una reacción coloreada consecuencia del ácido que produce durante una incubación de

2 – 3 horas. Estos análisis detectan la presencia de cualquier compuesto que inhibe el crecimiento de microorganismo y, por lo tanto, impide el cambio de color, pero son especialmente sensibles a los compuestos B-lactámicos. El test de inhibición microbiológica más utilizado es el “Delvotest P” (Early, 2000).

Según Robinson & Wilbey (2010) indica que la ubre puede recibir dosis del orden de 100,000 unidades de penicilina o de 200,000 – 400,000 de auremicina o estreptomycin, parte de estos antibióticos son eliminados con la leche, la presencia de sustancias inhibitoras en la leche puede detectarse mediante métodos basados en la capacidad acidificante de determinadas bacterias sensibles a los antibióticos.

#### **1.1.5.1 Preparación, esterilización de materiales y medios de cultivo**

La esterilización con calor seco y húmedo son los procedimientos de mayor utilización en Microbiología. El calor seco desnaturaliza las enzimas y destruye a los microorganismos por oxidación, por ejemplo al ponerlos directamente a la flama de un mechero. Estos métodos se aplican principalmente en la esterilización de asas de inoculación y todo tipo de material de vidrio y quirúrgico. Los procesos con calor húmedo se aplican para esterilizar medios de cultivo, soluciones, y cultivos bacterianos que se desechan, el más recomendable es el autoclave en el que se utiliza vapor de agua a presión para alcanzar temperaturas de 121°C o 15 Lbs de presión durante 15 minutos para asegurarse de la destrucción de endosporas, que son las estructuras bacterianas más resistentes al calor (Aquiahuatl & Pérez, 2004).

#### **1.1.5.2 Microorganismos indicadores de presencia de residuos de antibióticos**

##### **1.1.5.2.1 *Bacillus subtilis***

El método de *Bacillus subtilis* es el test oficial de Alemania Federal para detectar la presencia de residuos antimicrobianos en tejido animal. Es considerado como una cepa sensible a los antibióticos y presenta ventajas frente a otras bacterias indicadoras. Además de otras características como son, el bajo costo del análisis, fácil ejecución, detección de residuos bajo los niveles de tolerancia propuesta para los

tejidos musculares; para detectar la presencia de residuos de antimicrobianos las muestras pueden ser tomadas de diferentes productos. La lectura de la técnica se realiza en la medición del halo entre el borde del tejido y el límite de crecimiento. Una inhibición clara y total del crecimiento de al menos 2 mm, se considera positiva; una de 1-2 mm sospechosa cuando los controles paralelos han denotado un halo de inhibición perfecto de un tamaño cercano a los 6 mm (Gatica & Gesche, 2007).

#### **1.1.5.2.2 *Lactobacillus bulgáricos***

Se presenta en forma de bacilos alargados con la punta redondeada, separados o formando cadenas. El tamaño medio en la leche es de 0.8 – 1  $\mu\text{m}$  de ancho y 4 – 6  $\mu\text{m}$  de largo, su metabolismo es homofermentativa. Es una bacteria termófila, su temperatura óptima de crecimiento es de 40 – 43°C, la mínima de 15°C y la máxima de 52°C (algunas cepas crecen hasta 60°C). Presenta una mayor resistencia a los antibióticos que el *S. thermophilus*, es inhibido por 0.3 – 0.6 U.I de penicilina. Son microaerófilos, soportan una acidez elevada y viven en simbiosis. (Romero del Castillo & Mestres, 2004)

#### **1.1.5.2.3 *Streptococcus thermophilus***

Se presenta en forma de células esféricas u ovoides de 0.7 a 0.9  $\mu\text{m}$  de diámetro unidas en parejas o largas cadenas, según la temperatura de crecimiento y el medio de cultivo. Es homofermentativa, es una bacteria termófila, su temperatura óptima de crecimiento es de 42-45°C, la mínima de 10°C y la máxima de 50°C. También es una bacteria termodúrica, aguanta un tratamiento de calor en la leche de 30 minutos a 60°C. Es muy sensible a la presencia de inhibidores y en especial de antibióticos, por ejemplo su crecimiento es inhibido por 0.01 U.I de penicilina o 5 mg de estreptomycin por mL de leche. (Romero del Castillo & Mestres, 2004).

### 1.1.5.3 Tipos de incubación

La mayoría de los seres vivos necesitamos solo un ambiente atmosférico, el aerobio. Sin embargo las bacterias son los seres más primitivos del universo, por ello, para su cultivo se requiere un ambiente atmosférico con características especiales como anaerobio, facultativo y aerobio. Generar el ambiente facultativo es muy sencillo: se puede hacer en una campana, utilizando un gas generador con una concentración de 5-10% de CO<sub>2</sub>. También puede lograrse en un recipiente hermético, como una jarra o un tarro con una vela encendida. La vela va a consumir el oxígeno presente y así se generará el ambiente facultativo, cada vez que se abra es importante encender la vela (Ordoñez, 2014).

### 1.1.5.4 Aislamiento de bacterias

Según Aquiahuatl & Pérez (2004) refieren que las técnicas de aislamiento, permiten la obtención de microorganismos a partir de muestras complejas (suelo, agua, alimentos, etc.) en las que hay una gran diversidad microbiana, así como para comprobar la pureza de los cultivos obtenidos. Los cultivos axénicos o puros están formados por un solo tipo de microorganismo; y son indispensables para conocer las características morfológicas, propiedades de tinción, actividad bioquímica, patogenicidad, sensibilidad a antibióticos e identificación de las especies microbianas. La técnica de aislamiento por estría en superficie a partir de una población microbiana mixta, que se muestra en la Figura 1:

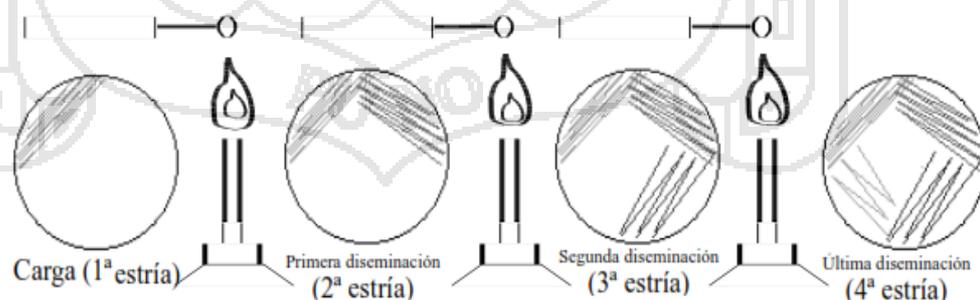


Figura 1. Técnica de aislamiento por estría en superficie

Fuente: Aquiahuatl & Pérez (2004)

Entre las principales características de las bacterias se encuentran su tamaño, forma, estructura y tipo de agrupación. Todas estas características van a constituir la morfología propia de las células bacterianas (López & Torres, 2006).

En el proceso de identificación bacteriana tradicional, la experiencia del microbiólogo es fundamental para la elección de una prueba o una batería de pruebas de forma secuencial, en función de la fiabilidad de las mismas, del género o de la especie bacteriana que se pretende identificar, del origen del aislado bacteriano, así como del coste de las mismas (Fernández, García, Saéz, & Valdezate, 2010).

#### **1.1.5.5 Preparación, fijación y coloración simple de frotis**

En 1884 un médico Danés, Christian Gram, desarrolló un método de tinción de Gram utilizable en el laboratorio de bacteriología. Esta tinción revela detalles referentes a la forma y agrupación bacteriana y permite clasificar a las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas. Durante el proceso de tinción, tanto las bacterias Gram positivas como las Gram negativas retienen el colorante primario. Sin embargo al aplicar el agente decolorante, la pared de las bacterias Gram positivas sufre una deshidratación que impide la salida de colorante. En el caso de las bacterias Gram negativas, el agente decolorante destruye la integridad de la membrana externa, incrementando así su permeabilidad, lo cual permite la salida del colorante primario (Lagunas & Vega, 2013).

Esta tinción separa las bacterias en dos grandes grupos, las Gram positivas que retienen el primer colorante usado (cristal violeta) y las Gram negativas que se tiñen con el segundo colorante (safranina). Estas diferencias están basadas en la estructura y composición química de la pared celular. Las Gram positivas tienen una pared gruesa de péptidoglicano y además, muchas de estas especies presentan ácidos teicoicos en la pared. Las Gram negativas contienen menos péptidoglicano y su capa es mucho más delgada, pero está rodeada de una bicapa más externa de lípidos, llamada membrana externa. Los mejores resultados se obtienen utilizando cultivos jóvenes de bacterias,

no mayores de 24-48 horas, pues de lo contrario los resultados son ambiguos. La pared celular es dañada en las células viejas (Olivas, 2012).

Según Mendía & Barrientos (2014) refieren que el procedimiento de coloración simple de frotis se realiza frente a la llama del Mechero Bunsen y se procede en orden siguiente: Aislar colonias de las cajas Petri de diferentes bacterias en láminas porta objetos, cubrir el frotis con solución cristal violeta y dejarlo por un minuto, lavar con agua de chorro y escurrir, cubrir con solución de Lugol durante un minuto, lavar con agua a chorro y escurrir, cubrir con alcohol acetona sobre la preparación hasta que esta deje de soltar color violeta (unas 4 gotas) y lavar inmediatamente, cubrir con solución safranina durante un minuto, lavar con agua a chorro escurrir y dejar secar a temperatura ambiente, agregar una gota de aceite de inmersión al frotis, utilizar el objetivo de inmersión (100X) en el microscopio.

A pesar de la gran utilidad de la tinción de Gram, este método debe ser valorado con precaución, ya que la reacción puede variar según la edad de las células, presencia de antibióticos y errores del operador, por ello junto a la muestra deben teñirse controles con Gram positivas y Gram negativas (Prado, Rodríguez, Figueroa, & Shirai, 2013).

#### **1.1.5.6 Métodos de inoculación y siembra de bacterias en medios de cultivo**

Para realizar el estudio de las bacterias es necesario recuperarlas del hábitat natural donde se encuentran y hacer que proliferen en medios artificiales, que les proporcionen sus requerimientos nutricionales. Este procedimiento se le conoce como cultivo bacteriano *in vitro*. Las bacterias para su metabolismo necesitan donadores y aceptores de hidrógeno, fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y minerales. Además del uso de un medio nutritivo adecuado para el cultivo bacteriano, es necesario considerar factores ambientales tales como la temperatura, pH, humedad relativa y atmósfera de incubación (Lagunas & Vega, 2013).

Según Pasterán & Galas (2008) refieren que la realización de pruebas de sensibilidad requiere el uso de inóculos estándar. El patrón de McFarland se

utiliza para la preparación de inóculos en dilución de agar estandarizado, procedimientos de macro y microdilución de caldo, de difusión de disco y pruebas de sensibilidad para organismos anaerobios.

Según Cárdenas & Asencios (2008) la técnica cilindro en placa, es la más utilizada dada su exactitud y sensibilidad; se fundamenta en la difusión del antibiótico desde un cilindro vertical (o desde una perforación circular en el agar) a través de una capa de agar solidificada en una placa de Petri hasta inhibir totalmente el crecimiento del microorganismo añadido en el medio de cultivo, en un área circular o zona de inhibición entorno al cilindro que contiene una solución del antibiótico. Las distintas respuestas obtenidas (diámetros de los halos de inhibición) son proporcionales a las dosis de antibiótico utilizadas.

#### **1.1.5.7 Medios de cultivo**

La preparación de los medios de cultivo se hace de acuerdo con los recursos que la institución suministra al laboratorio. Las fábricas de medios de cultivo utilizan equipos sistematizados que los envasan. Existe en el mercado varias marcas de cultivo listos para usar, estos deben venir con el correspondiente sistema para control de calidad y esterilización, control de pH y bacteriológico. Los medios de cultivo para preparar y envasar en el laboratorio pueden venir deshidratados en polvo, en gránulos o en pastillas para disolverlos en agua destilada y duran muchos años (Ordoñez, 2014).

#### **1.1.5.8 Medios selectivos**

Son medios en cuya composición presentan algún componente o componentes que van a impedir el crecimiento de algún tipo bacteriano, estableciendo en ello una selección en el tipo de microorganismo que sí puede crecer (Granados & Villaverde, 2002).

#### **1.1.5.9 Identificación bacteriana**

La identificación bacteriana se puede hacer por diferentes métodos, las bacterias se identifican según la forma como se nutren o reaccionan a las

distintas sustancias que pueden contener los diferentes medios de cultivo (Ordoñez, 2014)

### 1.1.6 Valoración de pruebas diagnósticas

#### 1.1.6.1 Sensibilidad

Es la proporción de verdaderos positivos identificados por la prueba del total de muestras con antibióticos (Pita & Pértegas, 2003).

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

Donde: VP = Verdaderos Positivos

FN = Falsos Negativos

#### 1.1.6.2 Especificidad

Es la proporción de verdaderos negativos identificados por la prueba del total de muestras con ausencia de antibióticos (Pita & Pértegas, 2003).

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

Donde: VN = Verdaderos Negativos

FP = Falsos Positivos

## 1.2 Antecedentes

Se han evaluado investigaciones semejantes a lo que venimos estudiando, que nos han permitido comprender las variables de análisis como las que a continuación detallamos:

El "Método de las 5 placas" para la detección de residuos de antibacterianos en leche, para el cual ha utilizado como cepas sensibles *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* a diferentes pH. Se utilizaron diferentes antibacterianos de mayor oferta en Chile para vacas de lechería y se determinó la placa más sensible a cada uno de ellos. Posteriormente, en la placa más sensible a cada antibacteriano, se determinó la concentración mínima detectable para cada uno de éstos, demostrando así el método una adecuada sensibilidad a los antibacterianos analizados (Gatica & Gesche, 2007).

Con el propósito de probar una técnica microbiológica de detección de inhibidores bacterianos aplicados en peces, se utilizó un Método Microbiológico con las cepas sensibles *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* a diferentes pH. Para el análisis se depositó un trozo de músculo de 8 mm de diámetro por 2 mm de espesor, en la parte superior de las placas de Petri, que contenían el substrato de cultivo con las cepas sensibles. Basándose en el tamaño de halo de inhibición de crecimiento de las cepas bacterianas provocado por cada antibacteriano, Asimismo se pudo establecer que *Bacillus subtilis* fue más sensible para detectar residuos de antibióticos (Aguila, 2000).

El estudio se orientó a identificar, residuos de antimicrobianos por el método microbiológico en diferentes muestras de carne de cerdo, de Bogotá, Colombia, para ello se utilizó *Bacillus subtilis* y como resultado mostraron residuos de varios antimicrobianos bajo estudio (Ujueta & Araque, 2016).

Con la finalidad de aportar antecedentes a la detección microbiológica de residuos de ácido oxolínico y oxitetraciclina en peces, se tomaron muestras de músculo y suero. Las muestras se analizaron por el método de detección del antibiótico por inhibición bacteriana, utilizando *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* como cepas sensibles. Después de la incubación de las placas a 35°C por 24 h se midió el halo de inhibición bacteriana (en mm) provocado por la difusión del residuo. Los resultados demuestran que el ácido oxolínico y la oxitetraciclina se detectan mejor en el substrato a pH 6,0, y que la cepa *Bacillus subtilis*, es más sensible que *Escherichia coli* (Gesche, Madrid, & Aguila, 2001).

## CAPITULO II

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 2.1 Identificación del problema

El uso de antimicrobianos es frecuente para el control y prevención de enfermedades infecciosas en los ganados de producción de leche de nuestro medio; sin embargo en la gran mayoría de casos, se utilizan sin tener la asesoría de un profesional, por lo que son utilizados de una forma inadecuada sin considerar duración del tratamiento, sobredosificación, cantidad de aplicaciones, y vías de administración incorrectas (Barrera & Ortez, 2012).

#### 2.2 Enunciados del problema

Se ha demostrado que después de la administración de cualquier tratamiento veterinario, los residuos del medicamento aparecen en los productos comestibles obtenidos de los animales tratados. La leche constituye una vía natural de eliminación para los antibióticos y sus metabolitos (Salas et al., 2013).

Los residuos de antimicrobianos en los alimentos es potencialmente peligroso para la salud, siendo el de mayor importancia reacciones alérgicas en las personas y la aparición de resistencia a los antibióticos en los microorganismos patógenos, cambios en el comportamiento de la flora gastrointestinal, y además, para la industria láctea y pueden provocar daños económicos (Babapour, Azami, & Fartashmehr, 2012).

La resistencia bacteriana en la actualidad ha dejado de ser una amenaza para convertirse en una realidad de dimensiones insospechadas. La región, el país y el mundo podría en poco tiempo enfrentar una situación muy grave provocada por múltiples bacterias letales y resistentes a todos los antibióticos (Quizhpe, Encalada, & Sacoto, 2014).

### 2.3 Justificación

Según MINAGRI (2015) la región Puno tiene una producción de leche anual aproximado de 84,700 TM a setiembre del año 2015, esta producción se encuentra en manos de pequeños, medianos y grandes productores. Por otra parte Flores (2015) refiere que de la producción total de leche de la región Puno se estima que alrededor del 95% son destinados para la producción de Quesos de diferentes variedades y el Queso tipo paria es uno de los principales productos los que son producidos por pequeños productores o procesadores quienes acopian la leche sin realizar el control de calidad respectivo.

Según Monroy, Linares, & Ramírez (2015) refiere que el descubrimiento de los antibióticos ha permitido salvar la vida de millones de personas y animales, sin embargo Pardo & Almanza (2005) refiere que el peligro de que la amplia utilización de antibióticos, los nuevos productos de limpieza y desinfección involucren el riesgo de que lleguen estas sustancias extrañas e inhibidoras afectar la calidad de la leche y derivados.

Diversos estudios, han puesto de manifiesto que entre los principales problemas en salud pública que generan los residuos de antibióticos en productos de origen animal, figuran las reacciones anafilácticas, alteraciones de la flora intestinal humana y alteraciones tóxicas específicas (San Martín et al., 2000)

Los antibióticos pueden provocar efectos adversos en el organismo, algunos de estos efectos son: Alergia, eliminación de bacterias "buenas" (de presencia deseable en el tubo digestivo), así como también predisponen el terreno para el crecimiento de hongos (caso de candidiasis) y pueden dañar los riñones, el hígado y el sistema nervioso, y producir alteraciones en los glóbulos de la sangre (Sánchez, 2006).

En la región Puno existen pocos estudios sobre la presencia de residuos de antibióticos en alimentos procesados de mayor consumo como los derivados lácteos. Por lo que con el presente estudio se pretende introducir un método de análisis más apropiado para determinar residuos de antibióticos en queso tipo paria, a su vez nos permitirá tomar decisiones orientadas a la preservación de la salud pública. Por consiguiente el presente trabajo está orientado a dar respuesta a las siguientes interrogantes:

**Problema General:**

¿El uso de bacterias antibiótico sensibles puede ser utilizado para detectar residuos de antibióticos en queso tipo paria?

**Sub Problemas:**

- a. ¿Cuál es el pH del medio de cultivo, tiempo de incubación y el tipo de bacteria sensible?
- b. ¿Cuál es la concentración mínima inhibitoria de tres antibióticos en una bacteria sensible?
- c. ¿Cuál es la especificidad y sensibilidad del método biológico?

**2.4 Objetivos****2.4.1 Objetivo general**

Validación de una prueba biológica para detectar residuos de antibióticos en queso tipo paria.

**2.4.2 Objetivos específicos**

- Determinar el pH del medio de cultivo, tiempo de incubación y el tipo de bacteria sensible.
- Determinar la concentración inhibitoria mínima de tres antibióticos en una bacteria sensible.
- Determinar la especificidad y sensibilidad del método biológico.

**2.5 Hipótesis****2.5.1 Hipótesis general**

La prueba biológica detecta la presencia de residuos de antibióticos en queso tipo paria con una sensibilidad mayor al 80%.

**2.5.2 Hipótesis específicos**

- El mayor halo de inhibición para dos antibióticos es influenciado por el pH del medio de cultivo, tiempo de incubación y el tipo de bacteria utilizado.
- La concentración inhibitoria mínima para tres antibióticos es influenciada por el tipo de bacteria utilizado.
- La especificidad y sensibilidad del método biológico es mayor al 80%.

## CAPITULO III

### METODOLOGÍA

#### 3.1 Lugar de estudio

El estudio se realizó en el laboratorio de microbiología de la escuela profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno.

La altitud, es un factor decisivo en la geografía puneña; la ciudad de Puno se encuentra ubicado a 3827 msnm, el clima de Puno es frío, la media anual de temperatura máxima y mínima 14.4°C y 2.7°C respectivamente (SENAMHI, 2011).

#### 3.2 Población

La población de bacterias y antibióticos es muy amplio de acuerdo a sus características por lo que se utilizaron bacterias beneficiosas para la salud de las personas como para las plantas (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) y los antibióticos se utilizaron los que mayormente se utiliza en la región Puno para el tratamiento de la mastitis y enfermedades comunes como son: Penicilina, Oxitetraciclina y Tilosina (Orós, 2014).

#### 3.3 Muestra

El muestreo utilizado es el No Probabilístico: Muestreo por conveniencia, que consiste en la elección por métodos no aleatorios de una muestra cuyas características sean similares a las de la población objetiva, es una técnica que consiste en seleccionar una muestra de la población por el hecho de que sea accesible así mismo es la muestra que está disponible en el tiempo o periodo de investigación (Quezada, 2010).

### 3.4 Método de investigación

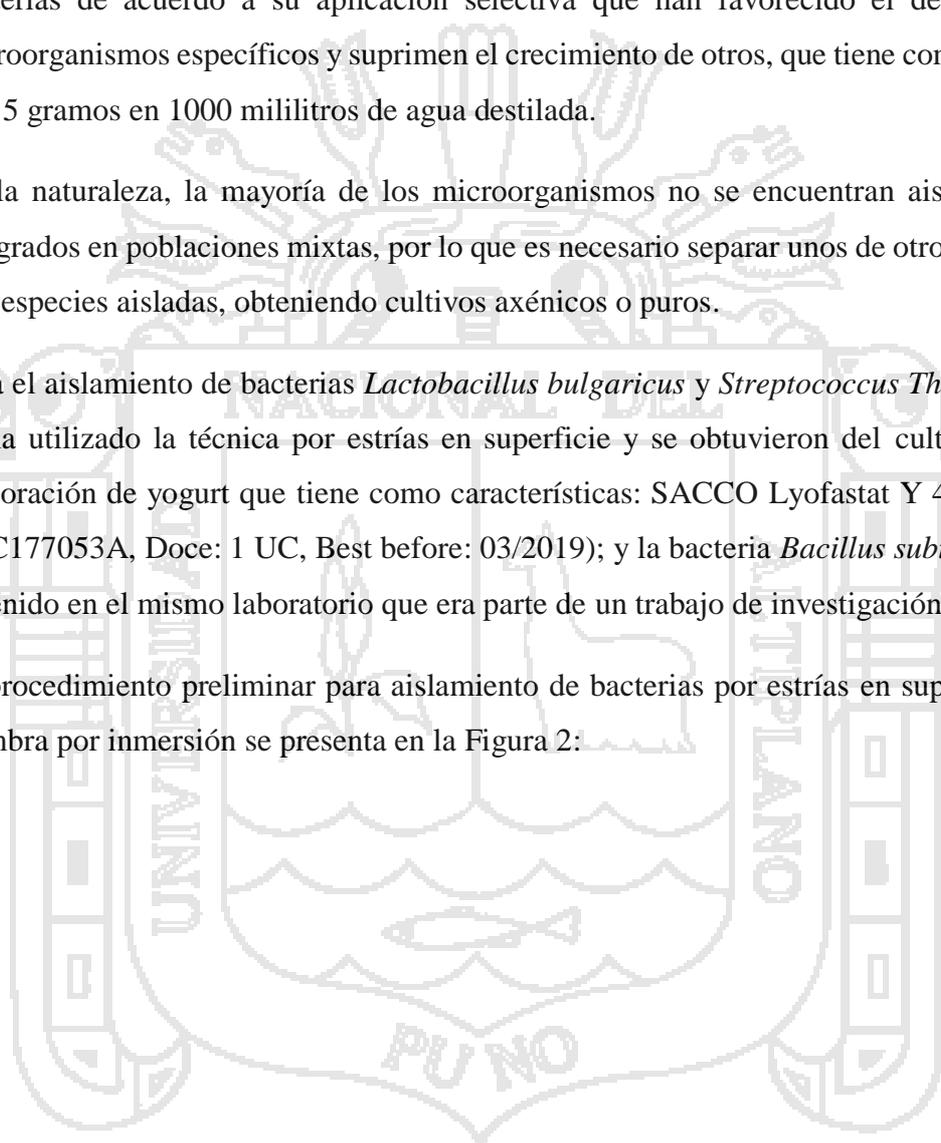
El Método utilizado es experimental, específicamente el experimento de Laboratorio, Los componentes principales del experimento han sido: la observación, el control y la medición, con la finalidad de obtener conocimiento.

Para el estudio se ha utilizado el medio de cultivo *Lactobacillus* MRS Agar para las tres bacterias de acuerdo a su aplicación selectiva que han favorecido el desarrollo de microorganismos específicos y suprimen el crecimiento de otros, que tiene como dilución 67.15 gramos en 1000 mililitros de agua destilada.

En la naturaleza, la mayoría de los microorganismos no se encuentran aislados, sino integrados en poblaciones mixtas, por lo que es necesario separar unos de otros y trabajar con especies aisladas, obteniendo cultivos axénicos o puros.

Para el aislamiento de bacterias *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus Thermophilus* se ha utilizado la técnica por estrías en superficie y se obtuvieron del cultivo para la elaboración de yogurt que tiene como características: SACCO Lyofastat Y 456 B (Lot. n.: C177053A, Doce: 1 UC, Best before: 03/2019); y la bacteria *Bacillus subtilis* ha sido obtenido en el mismo laboratorio que era parte de un trabajo de investigación reciente.

El procedimiento preliminar para aislamiento de bacterias por estrías en superficie y la siembra por inmersión se presenta en la Figura 2:



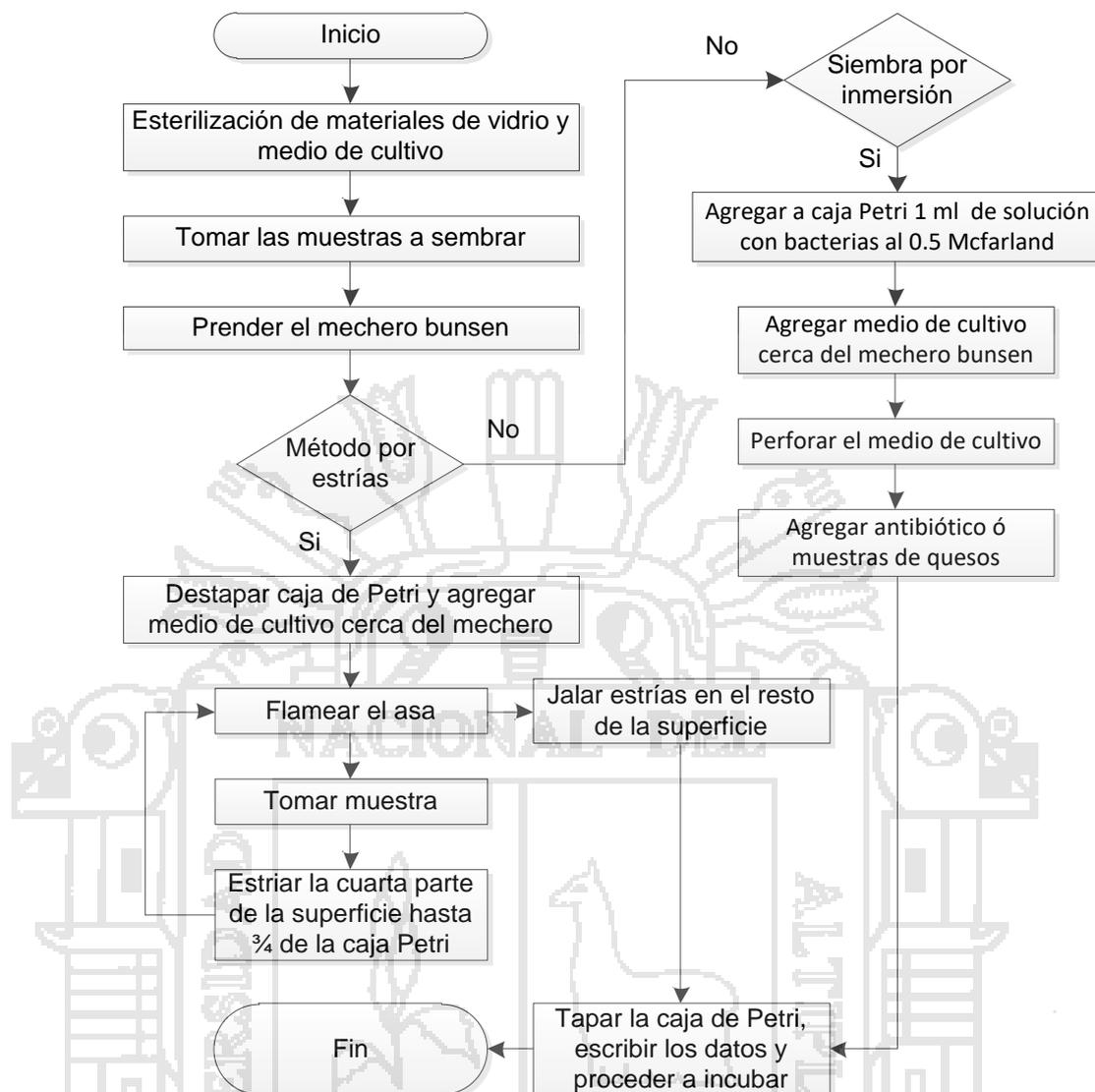


Figura 2. Aislamiento de bacterias por estrías y siembra de bacterias por inmersión.

La identificación se ha realizado a través de la técnica de Tinción Gram que es un proceso por el cual las moléculas de un colorante se absorben a una superficie, se observa en la Tabla 6:

Tabla 6

*Procesos para Tinción Gram*

| PROCESOS                             | GRAM POSITIVAS | GRAM NEGATIVAS |
|--------------------------------------|----------------|----------------|
| Colorante principal: Cristal violeta | Violeta        | Violeta        |
| Mordiente: Lugol                     | Violeta        | Violeta        |
| Decolorante: Alcohol – acetona       | Violeta        | “Transparente” |
| Colorante de contraste: Safranina    | Violeta        | Rojo           |

**3.4.1 Procedimiento para determinar el pH del medio de cultivo, tiempo de incubación y el tipo de bacteria sensible**

Se utilizó el método de los orificios, en cada placa se realizaron perforaciones de 8 mm de diámetro en el sustrato del cultivo, con un sacabocado de acero inoxidable, con una separación de al menos 30 mm entre sí, en las cuales se depositaron diferentes cantidades de antibióticos así como también las muestras de quesos elaborados con antibiótico y sin antibiótico como se observa en la Figura 3:

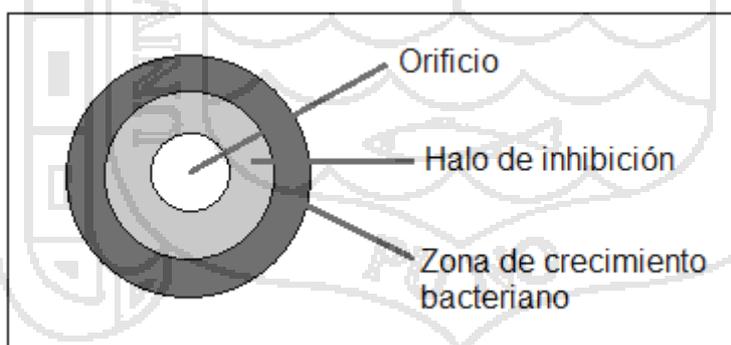


Figura 3. Esquema de las mediciones del halo de inhibición

Luego se incubaron a 35°C *Bacillus subtilis* y 37°C *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. El principio de estas técnicas se fundamenta en la capacidad de difusión del antimicrobiano en diferentes pH del medio de cultivo, tiempo de incubación y determinado microorganismo sensible inhibiendo el desarrollo de la bacteria. La incubación es por 18-24 horas. Este método presenta

una buena detección para residuos de antibióticos beta-lactámicos, tetraciclinas y aminoglicósidos (Aguilar, 2006).

El procedimiento preliminar para determinar el pH del medio de cultivo, tiempo de incubación y bacteria sensible se presenta en la Figura 4:

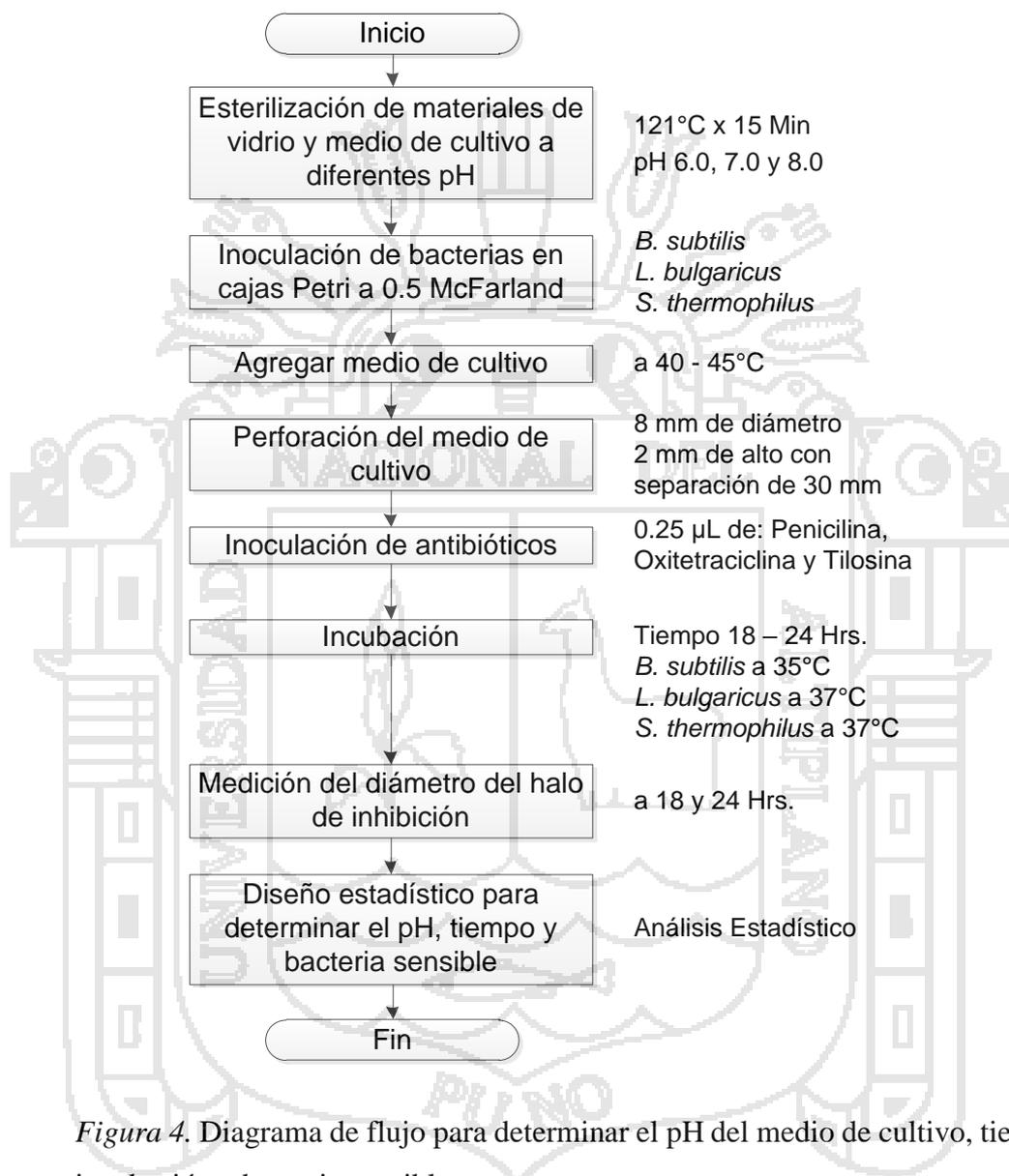


Figura 4. Diagrama de flujo para determinar el pH del medio de cultivo, tiempo de incubación y bacteria sensible.

### 3.4.1.1 Análisis estadístico para determinar el pH del medio de cultivo, tiempo de incubación y el tipo de bacteria sensible

En el experimento factorial intervienen tres factores A (Bacterias), B (Tiempo) y C (pH), donde el factor A tiene 3 niveles, el factor B tiene 2 niveles y el factor C tiene 3 niveles, se simbolizará como  $3A \times 2B \times 3C$  ó  $3 \times 2 \times 3$  y el número de tratamientos producto de las combinaciones será igual a 18, para el cual se utilizó el modelo estadístico lineal bajo el diseño de bloque completo al azar que se muestra en la ecuación (Ibañez, 2009).

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

$Y_{ijkl}$  = Variable de respuesta en la  $l$ -ésima observación bajo el  $k$ -ésimo nivel de factor pH, en el  $j$ -ésimo nivel del factor Tiempo, sujeto al  $i$ -ésimo nivel del tratamiento Antibiótico.

$\mu$  = Es la media general de la variable de respuesta a la cual pertenecen las observaciones.

$\alpha_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo nivel del factor Antibiótico

$\beta_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo nivel del factor Tiempo

$\gamma_k$  = Efecto del  $k$ -ésimo nivel del factor pH

$(\alpha\beta)_{ij}$  = Efecto de la interacción del  $i$ -ésimo nivel del factor Antibiótico, con el  $j$ -ésimo nivel del factor Tiempo.

$(\alpha\gamma)_{ik}$  = Efecto de la interacción del  $i$ -ésimo nivel del factor Antibiótico, en el  $k$ -ésimo nivel del factor pH.

$(\beta\gamma)_{jk}$  = Efecto de la interacción del  $j$ -ésimo nivel del factor Tiempo, en el  $k$ -ésimo nivel del factor pH.

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$  = Efecto de la interacción del  $i$ -ésimo nivel del factor Antibiótico, en el  $j$ -ésimo nivel del factor Tiempo, sujeto al  $k$ -ésimo nivel del factor pH.

$\varepsilon_{ijkl}$  = Error aleatorio

### 3.4.1.2 Determinar el punto óptimo del tratamiento en la bacteria más sensible

Para determinar el punto óptimo del tratamiento se ha utilizado la bacteria más sensible de la prueba anterior y se busca optimizar ajustando el pH del medio de cultivo y tiempo de incubación de acuerdo al modelo estadístico de diseños compuestos centrales, el procedimiento para determinar el punto óptimo del tratamiento en la bacteria más sensible en diferentes antibióticos (penicilina, oxitetraciclina y tilosina) se presenta en la Figura 5:

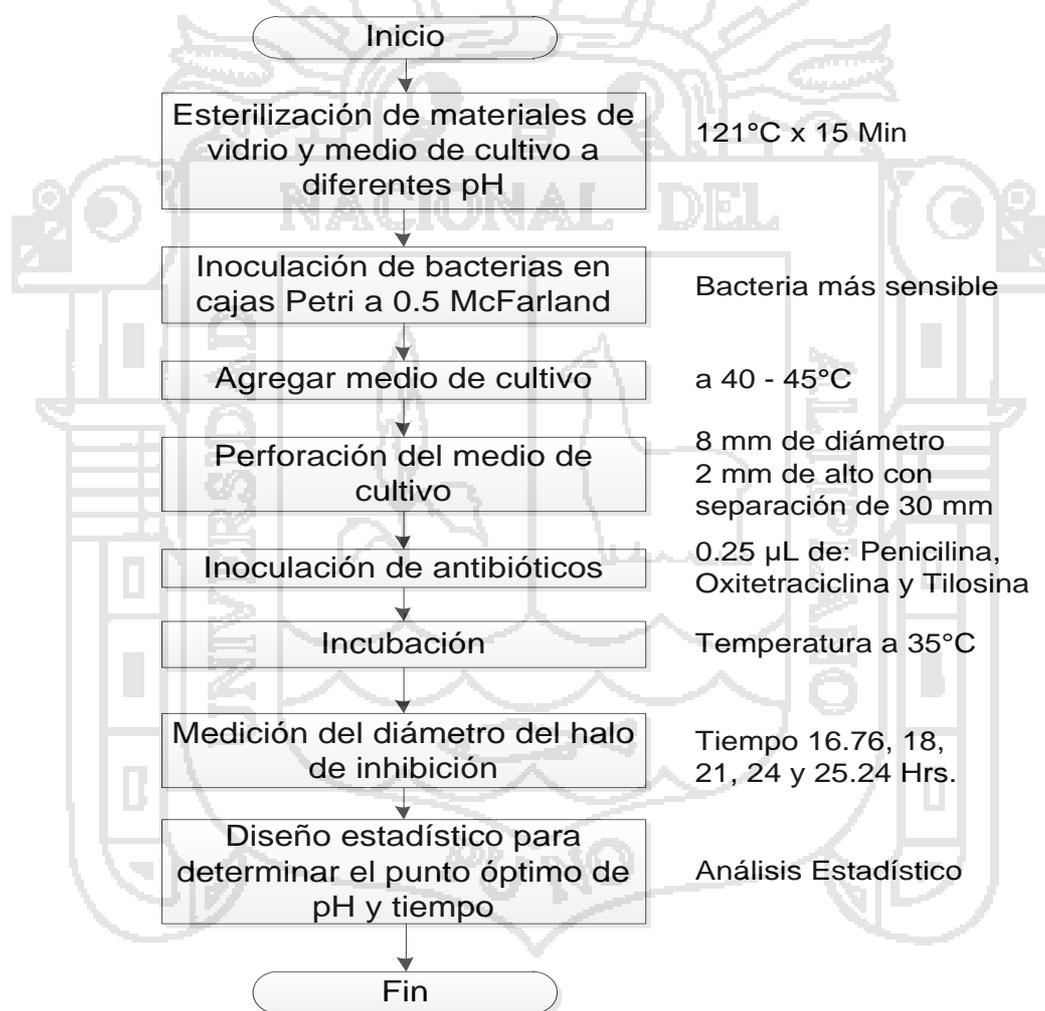


Figura 5. Diagrama de flujo para determinar el punto óptimo del tratamiento en la bacteria más sensible.

### 3.4.1.3 Diseño experimental para determinar el punto óptimo del tratamiento en la bacteria más sensible.

Se utilizó diseños compuestos centrales cuyo modelo se muestra en la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

El número de tratamientos es igual a:

$$N = 2^p + 2p + C$$

Donde:

$N$  = Número total de tratamientos u observaciones

$2^p$  = Es el número de tratamientos básicos de la parte factorial o combinaciones de tratamientos.

$2p$  = Corresponde a los tratamientos de la parte axial o estrella o combinación de tratamientos en los puntos axiales del diseño.

$C$  = Constituye el tratamiento central que se repite un número determinado de veces dependiendo del número de factores o réplicas en el centro del diseño.

$p$  = Número de factores en estudio o variables

### 3.4.2 Procedimiento para determinar la concentración inhibitoria mínima de tres antibióticos en una bacteria sensible.

Según Aguila (2000) refiere que a partir de los tamaños de halo de inhibición producidos por cada antibiótico es posible determinar las concentraciones en la cual fluctúan los diferentes antibacterianos. La determinación por dilución en agar de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de un antibiótico para un microorganismo ha tenido, y en muchos ámbitos sigue teniendo, los máximos honores entre las pruebas que estudian la sensibilidad.

El procedimiento para determinar la concentración inhibitoria mínima se muestra en la Figura 6:

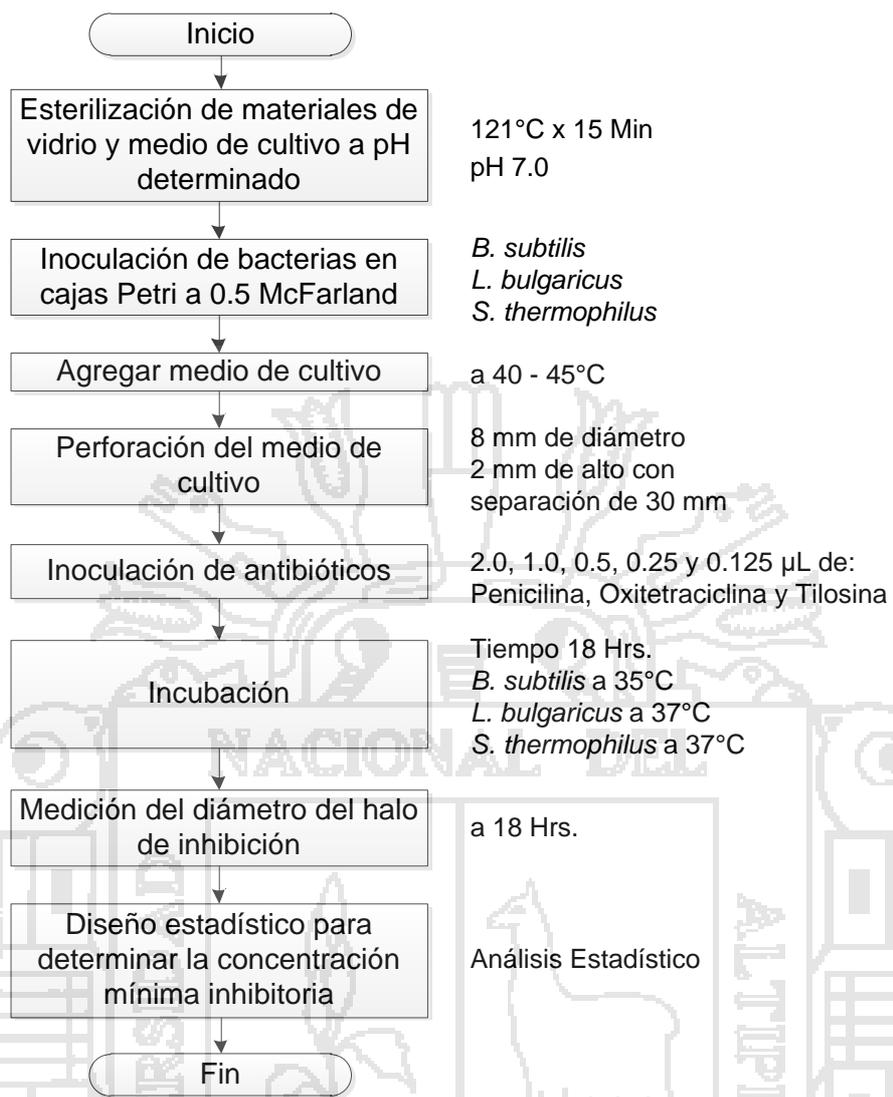


Figura 6. Diagrama de flujo para determinar la concentración inhibitoria mínima.

### 3.4.2.1 Análisis estadístico para determinar la concentración inhibitoria mínima de tres antibióticos en una bacteria sensible.

Se utilizó regresión lineal simple, cuyo modelo se muestra en la siguiente ecuación:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \epsilon_i, \quad i = 1, 2, \dots, n$$

Donde:

$Y_i$  = Halo de inhibición

$X_i$  = Dosis de antibióticos ( $\mu\text{L}$ )

$\beta_0$  = parámetro desconocido que indica la ordenada donde la línea de regresión lo interseca.

$\beta_1$  = Parámetro desconocido que indica la pendiente de la línea de mejor ajuste, llamada también coeficiente de regresión poblacional.

e = Error de perturbación

Para determinar la cantidad inhibitoria mínima se ha utilizado las tres bacterias de acuerdo al resultado del pH del medio de cultivo evaluado y el tiempo de incubación definido para diferentes dosis de antibióticos.

### 3.4.3 Metodología para determinar la especificidad y sensibilidad del método biológico

Se realizó mediante el método de difusión en disco el cual consiste en la determinación de una zona de inhibición del crecimiento que es proporcional a la sensibilidad de la bacteria al antimicrobiano presente en el disco, los resultados de la prueba se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

*Especificidad y sensibilidad del método biológico.*

| RESULTADO<br>DE LA PRUEBA | VERDADERO DIAGNOSTICO       |                            |
|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|
|                           | PRESENCIA DE<br>ANTIBIÓTICO | AUSENCIA DE<br>ANTIBIÓTICO |
| POSITIVO                  | Verdaderos Positivos (VP)   | Falsos Positivos (FP)      |
| NEGATIVO                  | Falsos Negativos (FN)       | Verdaderos Negativos (VN)  |

#### 3.4.3.1 Metodología para la elaboración del queso tipo paria.

El procedimiento se presenta en la Figura 7.

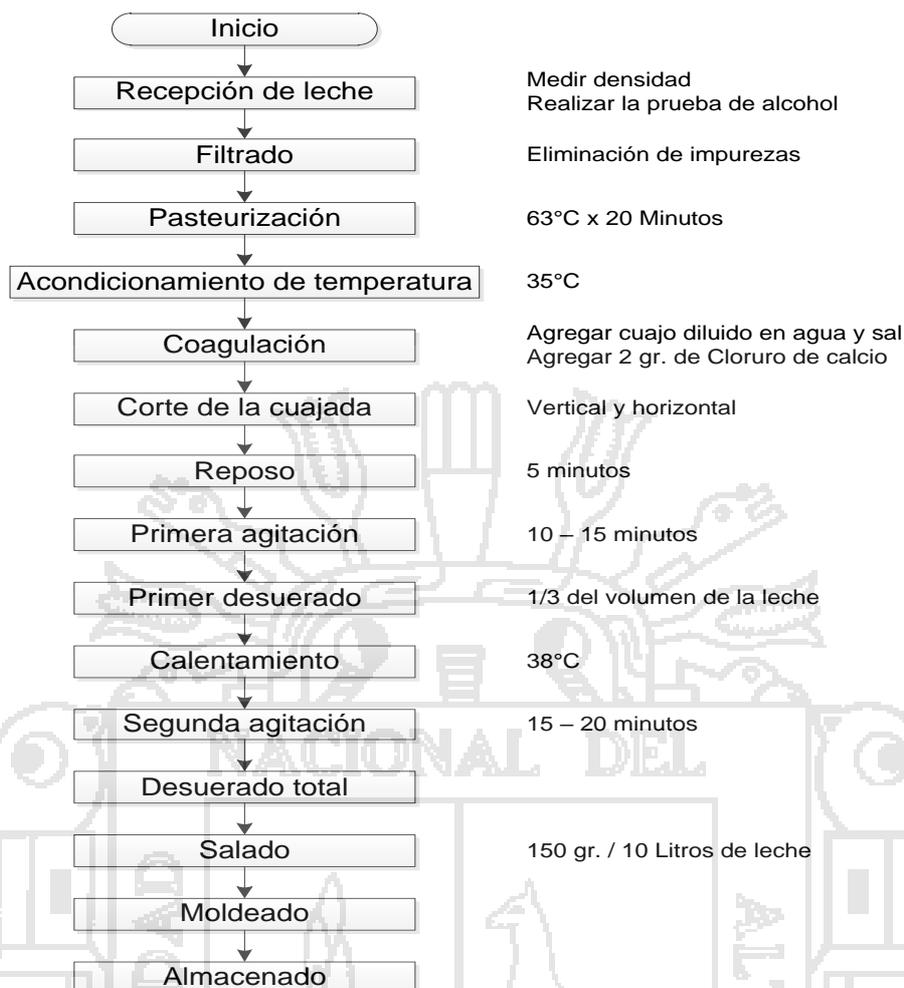


Figura 7. Diagrama de flujo para la elaboración de queso tipo paria

### 3.4.3.2 Metodología para la elaboración del queso tipo paria con antibiótico.

El procedimiento para la elaboración de queso tipo paria con antibiótico penicilina, oxitetraciclina y tilosina se presenta en la Figura 8.

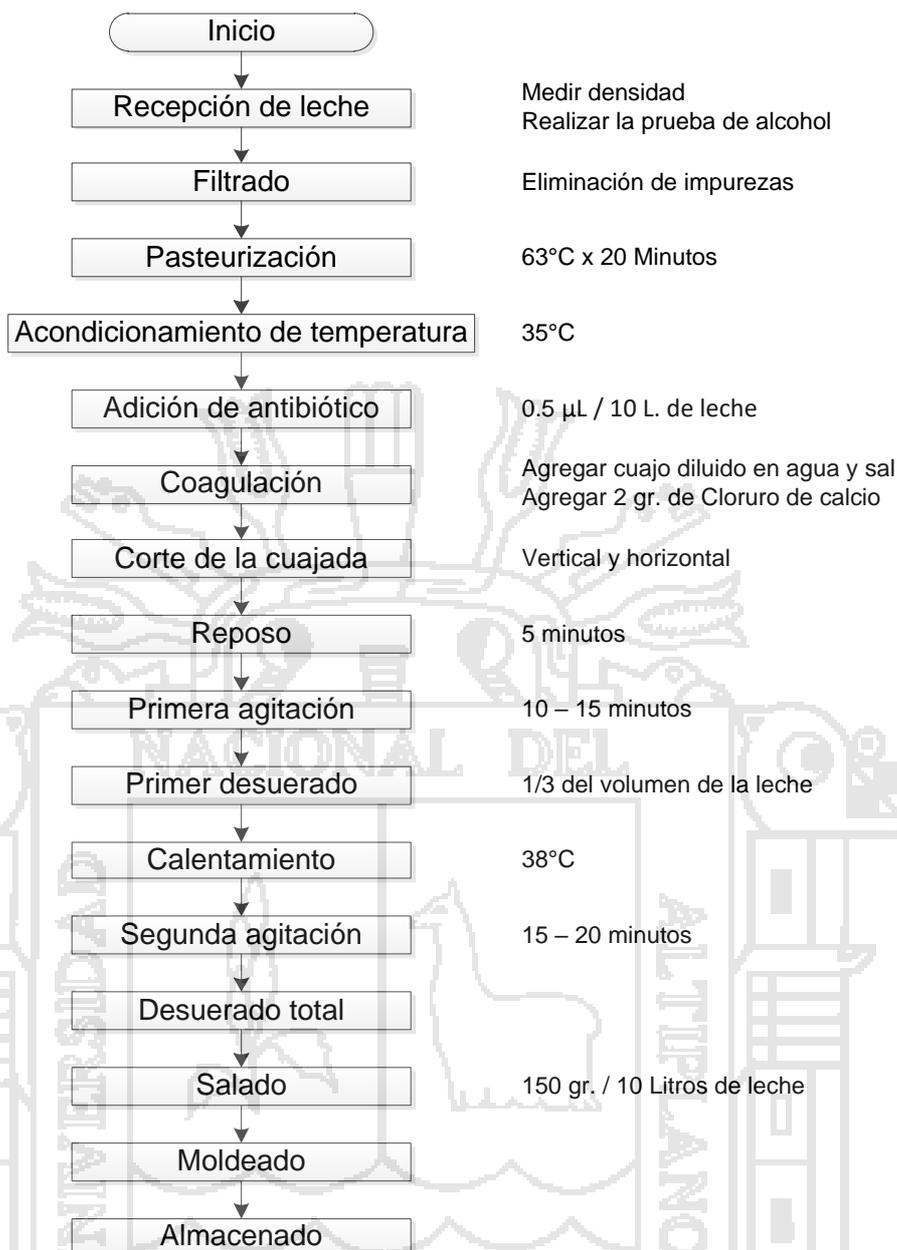


Figura 8. Diagrama de flujo para la elaboración de queso tipo paria con adición de antibióticos.

### 3.4.3.3 Metodología para determinar antibiótico en el queso tipo paria

El procedimiento para determinar la presencia de antibiótico presente en el queso tipo paria se presenta en la Figura 9:

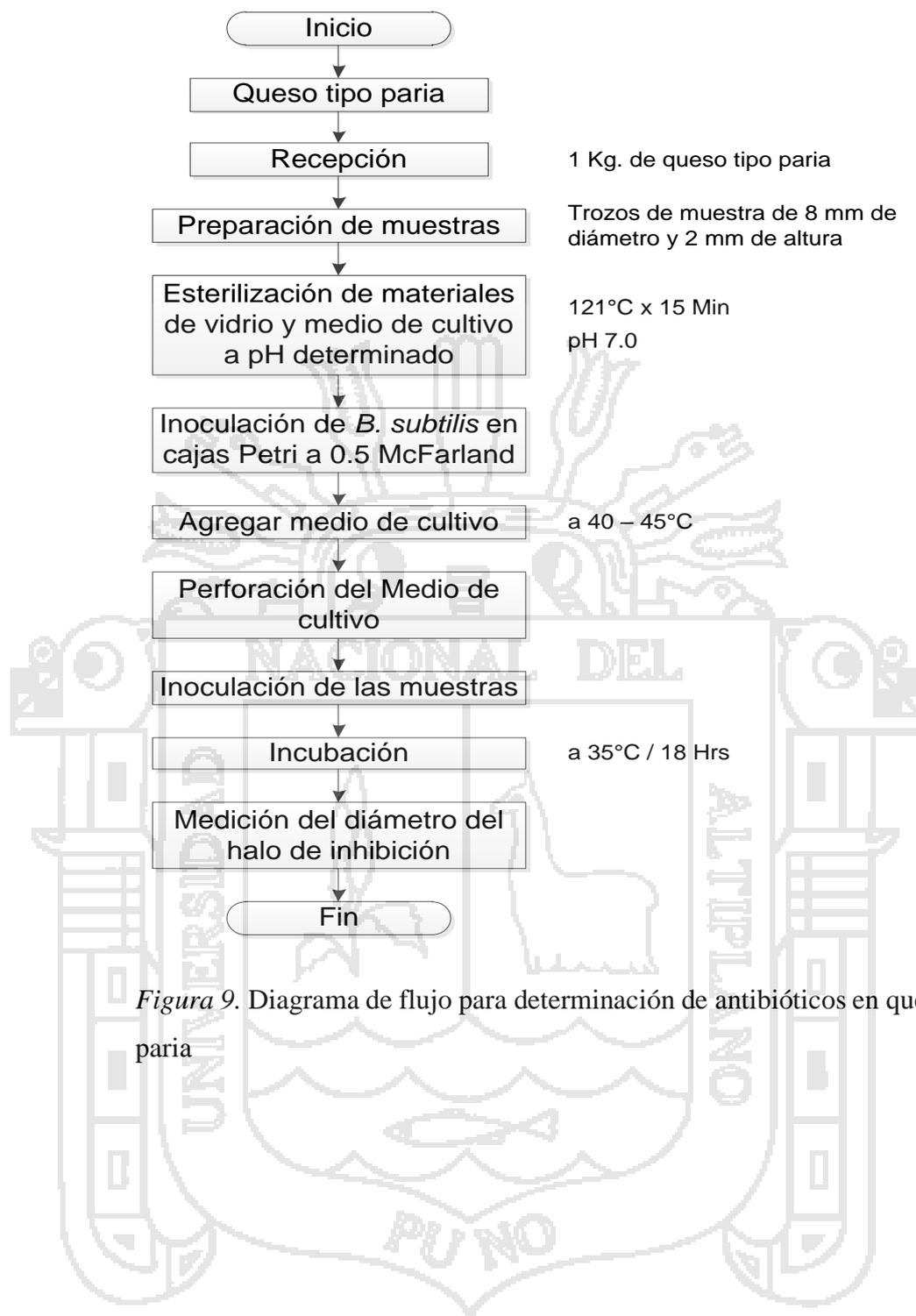


Figura 9. Diagrama de flujo para determinación de antibióticos en queso tipo paria

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSION

#### 4.1 pH del medio de cultivo, tiempo de incubación y el tipo de bacteria sensible.

Para determinar el pH del medio de cultivo, tiempo de incubación y el tipo de bacteria sensible, para los tres antibióticos (penicilina, oxitetraciclina y tilosina) se analizaron para cada antibiótico 18 tratamientos con 72 repeticiones al respecto Pasterán & Galas (2008) refieren que el criterio de la determinación del pH del medio de cultivo, tiempo de incubación y bacteria más sensible, se considera aquella que produce el mayor halo de inhibición a una determinada cantidad de antibióticos, en una turbidez equivalente al 0.5 Mc Farland representa aproximadamente  $10^8$  UFC/ml para bacterias de rápido crecimiento.

##### 4.1.1 Halo de inhibición de penicilina en diferentes bacterias

El halo de inhibición para penicilina (dosis de 0.25  $\mu$ L) por análisis de varianza de efecto simple muestra diferencia altamente significativa a las bacterias (*Bacillus subtilis*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*) y pH del medio de cultivo (6, 7 y 8) expuesto en Anexo 2 ( $p < 0.0001$ ), resultado mostrado en Anexo 3, se pueden observar en la Figura 10 y Figura 11 respectivamente, el tiempo de incubación (18 y 24 Hrs.) expuesto en Anexo 2, no presenta diferencia significativa ( $p = 0.3376$ ), resultado mostrado en Anexo 3, se puede observar en la Figura 12. Al respecto Cárdenas & Asencios (2008) refieren que el método basado en la difusión del antibiótico ya sea desde un cilindro vertical, disco o excavación presenta halo de inhibición a diferentes condiciones de pH y bacteria sensible y por otro lado López & Torres (2006) refieren que al cabo de 18 horas de incubación, en

aquella zona donde el antibiótico es capaz de impedir el crecimiento de la bacteria aparece un halo de inhibición alrededor del disco.

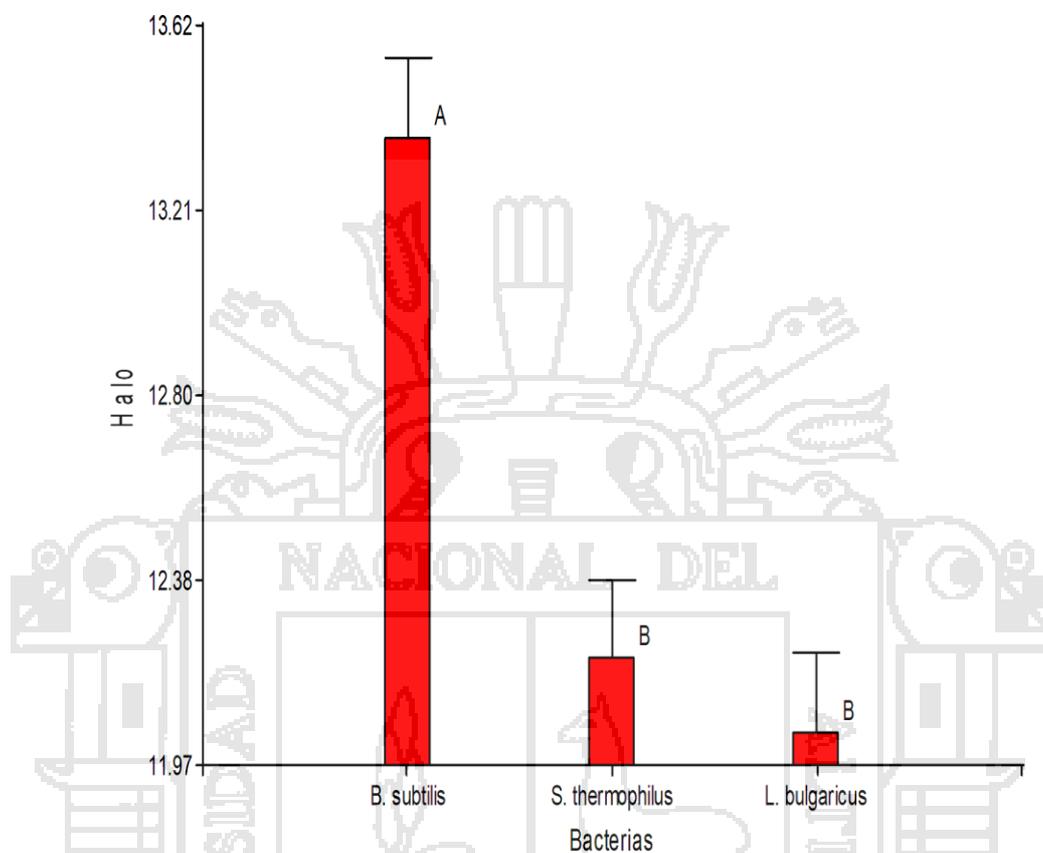


Figura 10. Halo de inhibición de penicilina en diferentes bacterias

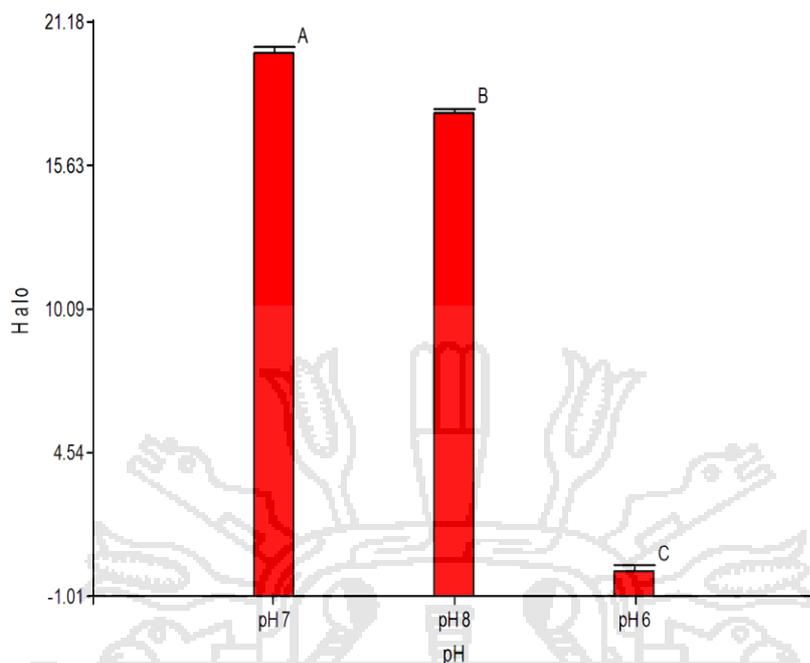


Figura 11. Halo de inhibición de penicilina en diferentes pH

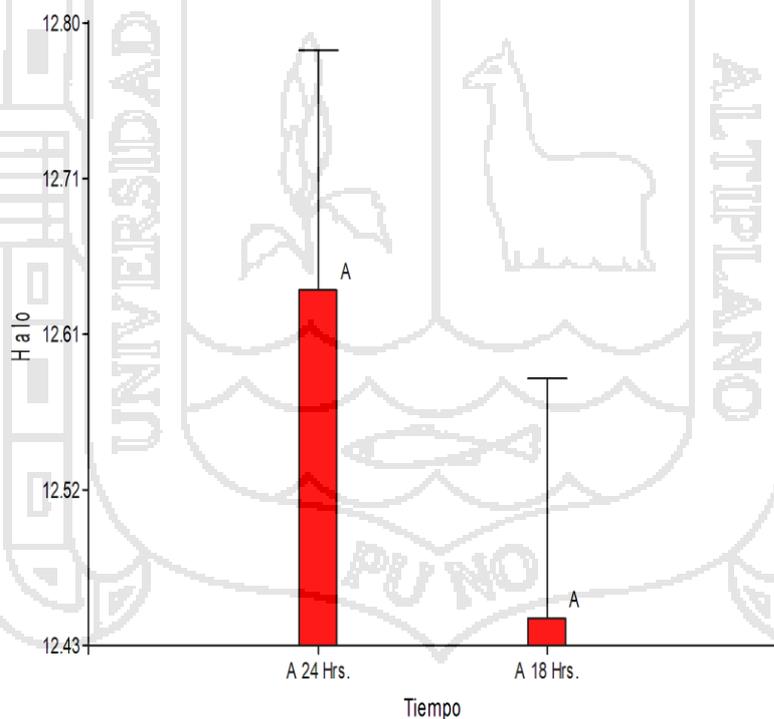


Figura 12. Halo de inhibición de penicilina en diferentes Tiempos

El nivel de significancia de los factores en estudio, revela que la interacción de los factores Bacterias\*pH presenta diferencia estadística altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) resultado expuesto en Anexo 3, se puede observar en la figura 13, mientras que la interacción Bacterias\*Tiempo ( $p = 0.9265$ ) y Tiempo\*pH ( $p = 0.6971$ ) resultados expuestos en Anexo 3, se pueden observar en la Figura 14 y Figura 15 respectivamente, mostraron diferencia estadística no significativa (Anexo 3). Al respecto Cabrera (2015) refiere que por medio de la medición de los halos de inhibición es posible obtener la curva de calibración para cada ensayo realizado, de manera que se verifica la linealidad del método de las diferentes muestras, las placas se incuban durante 16 – 18 horas. Por otro lado Mendía & Barrientos (2014) refieren que se deben realizar las incubaciones de 18 a 24 horas.

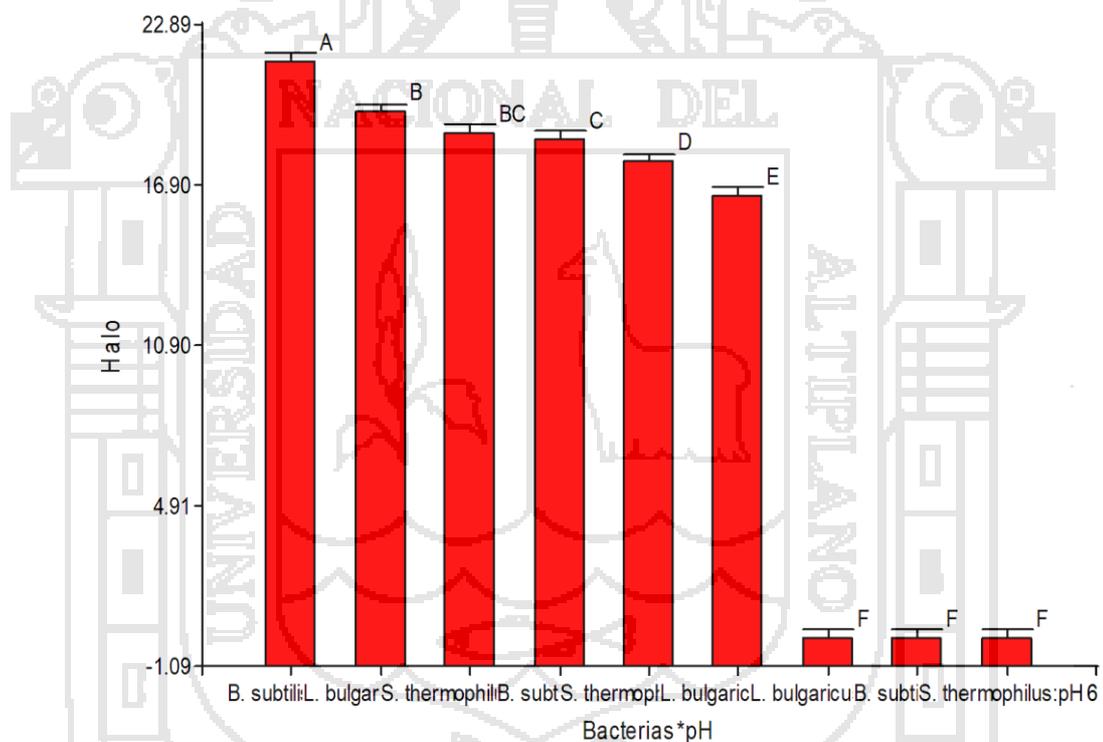


Figura 13. Halo de inhibición de penicilina en diferentes bacterias y pH

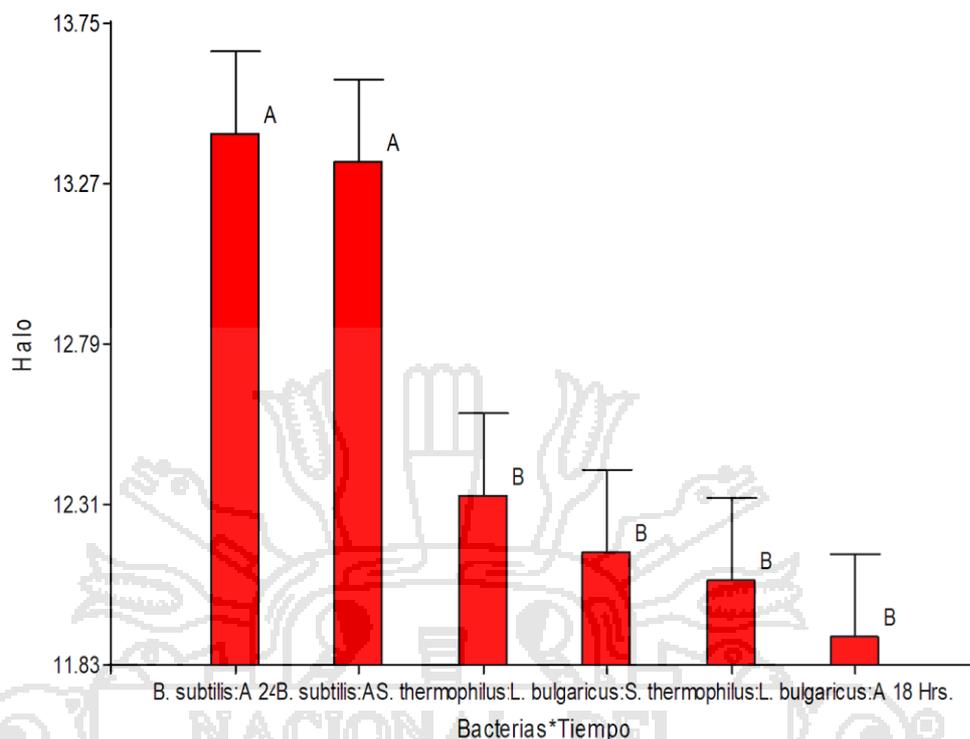


Figura 14. Halo de inhibición de penicilina en diferentes bacterias y tiempos

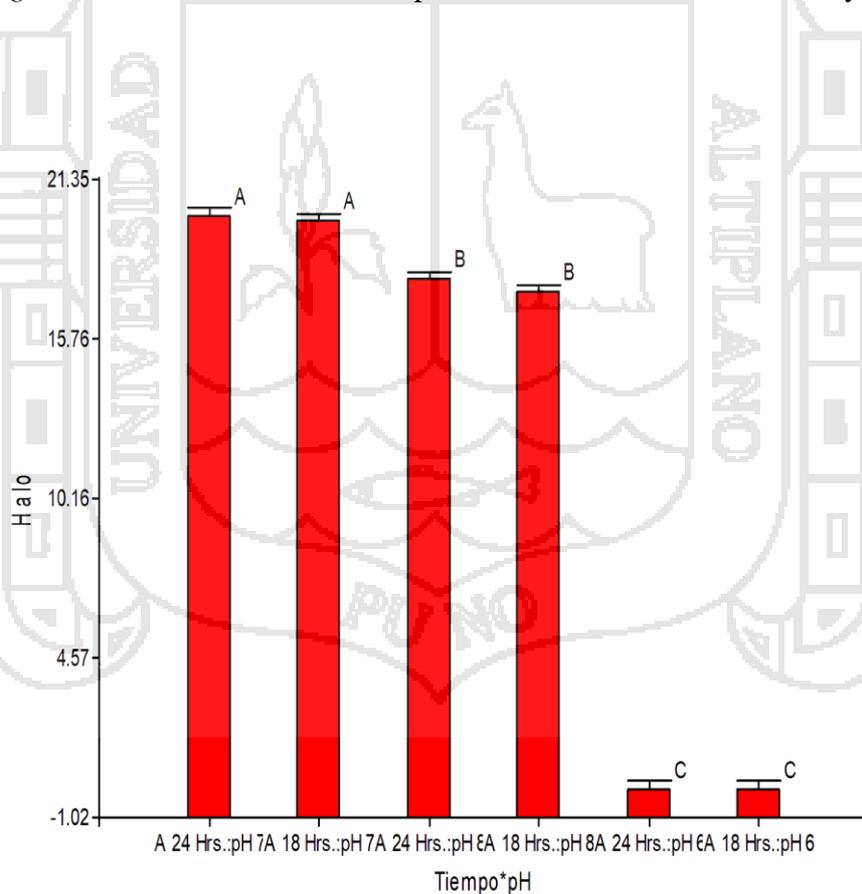


Figura 15. Halo de inhibición de penicilina en diferentes tiempos y pH

La interacción de los 3 factores Bacteria\*Tiempo\*pH ( $p = 0.9993$ ) resultado expuesto en Anexo 3, se puede observar en la Figura 16, indica que no existe diferencia significativa por lo que no existe interacción de los 3 factores.

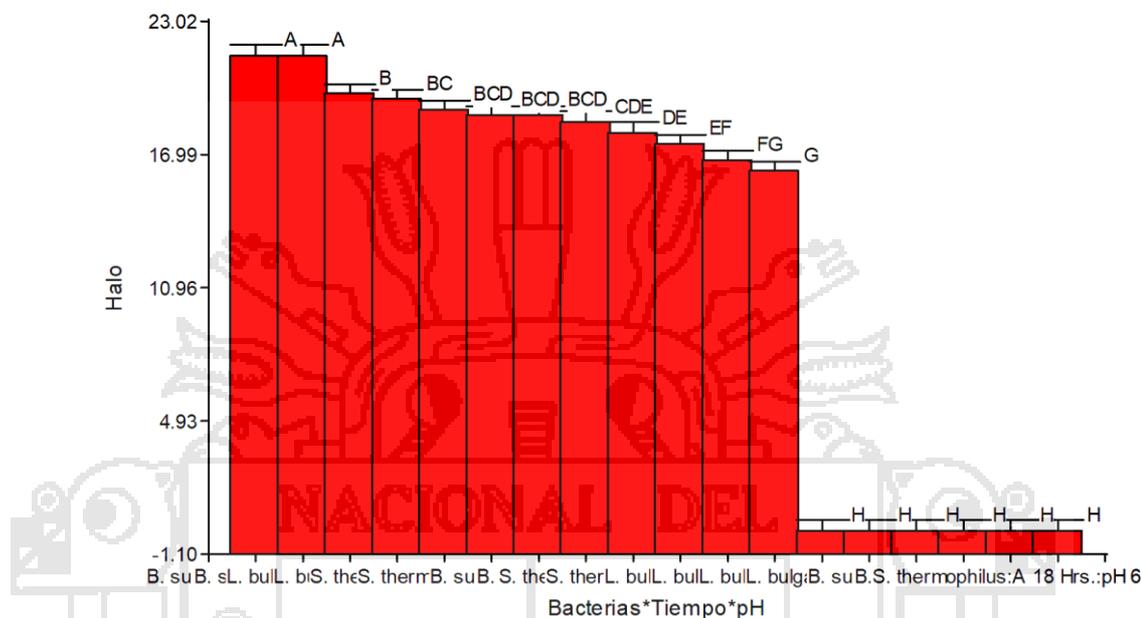


Figura 16. Halo de inhibición de penicilina en diferentes bacterias, tiempos y pH

La línea recta nos muestra la relación lineal esperada y los puntos dispersos en torno a esa línea muestran la divergencia entre los datos reales y los esperados. Este análisis indica la precisión de la correlación de un conjunto de resultados con una entrada determinada, y la magnitud de la variación con respecto al modelo ideal, los resultados se pueden observar en la Figura 17 que corresponden al Anexo 2 y Anexo 3

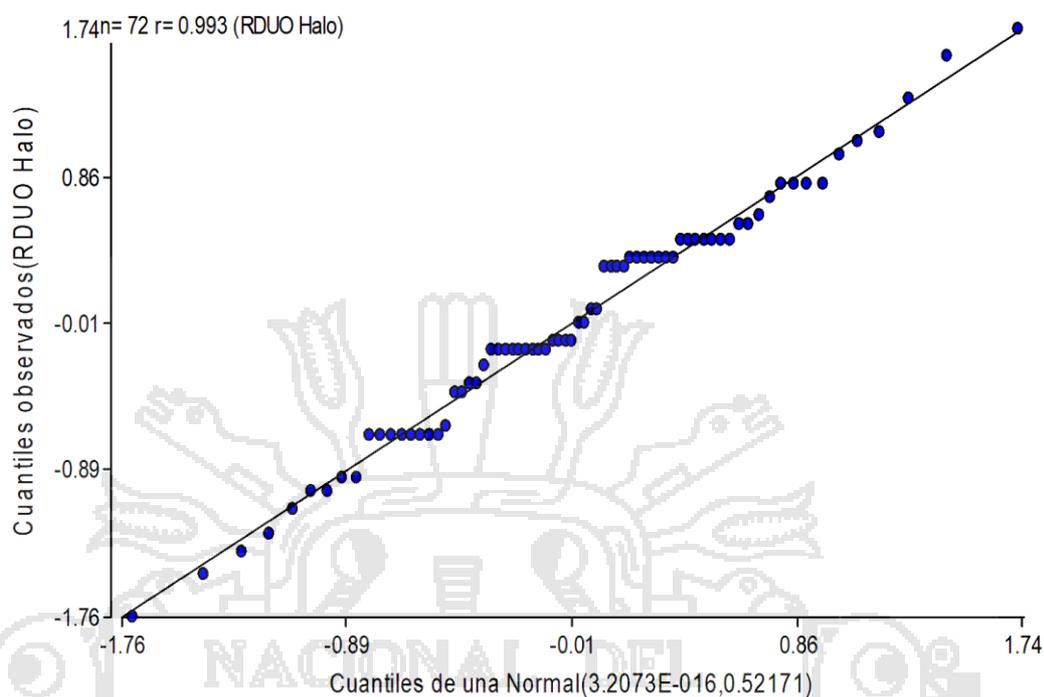


Figura 17. Homogeneidad del experimento con el antibiótico penicilina

#### 4.1.2 Halo de inhibición de oxitetraciclina en diferentes bacterias

El halo de inhibición para oxitetraciclina (dosis de 0.25  $\mu$ L) por análisis de varianza de efecto simple muestra diferencia altamente significativa a las bacterias (*Bacillus subtilis*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*) y pH del medio de cultivo (6, 7 y 8) expuesto en Anexo 4 ( $p = 0.0001$ ), resultado expuesto en Anexo 5, se pueden observar en la Figura 18 y Figura 19 respectivamente, el tiempo de incubación (18 y 24 Hrs.) expuesto en Anexo 4, no presenta diferencia significativa ( $p = 0.2887$ ), resultado expuesto en Anexo 5, se puede observar en la Figura 20.

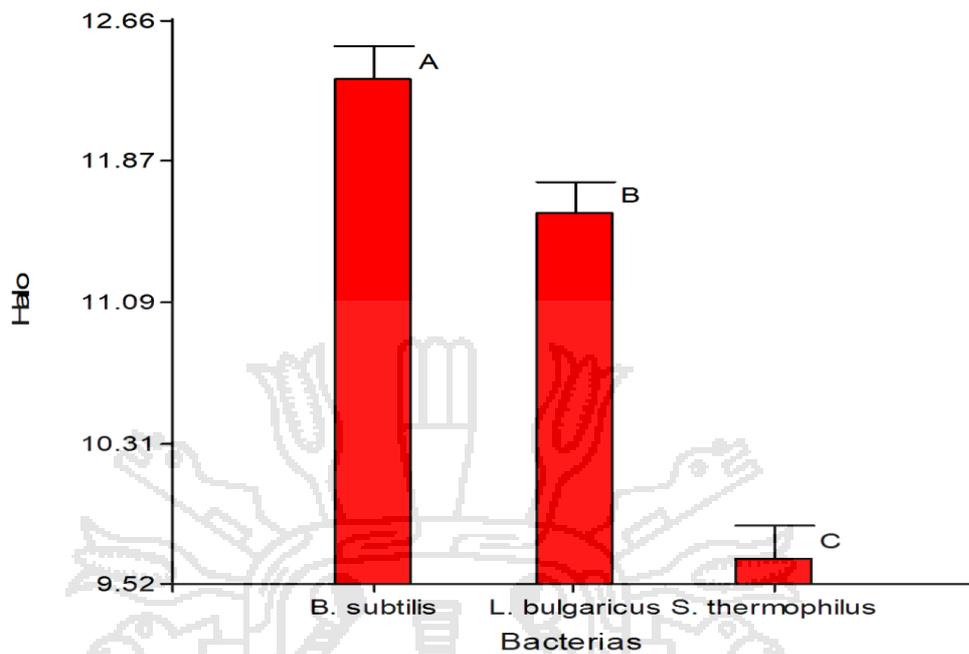


Figura 18. Halo de inhibición de oxitetraciclina en diferentes bacterias

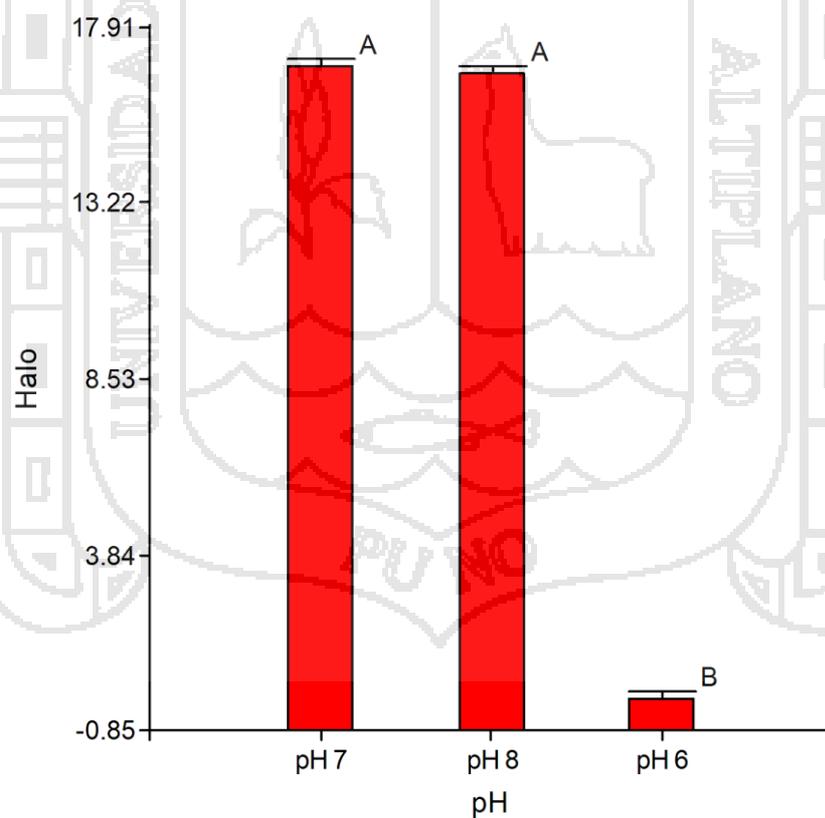


Figura 19. Halo de inhibición de oxitetraciclina en diferentes pH

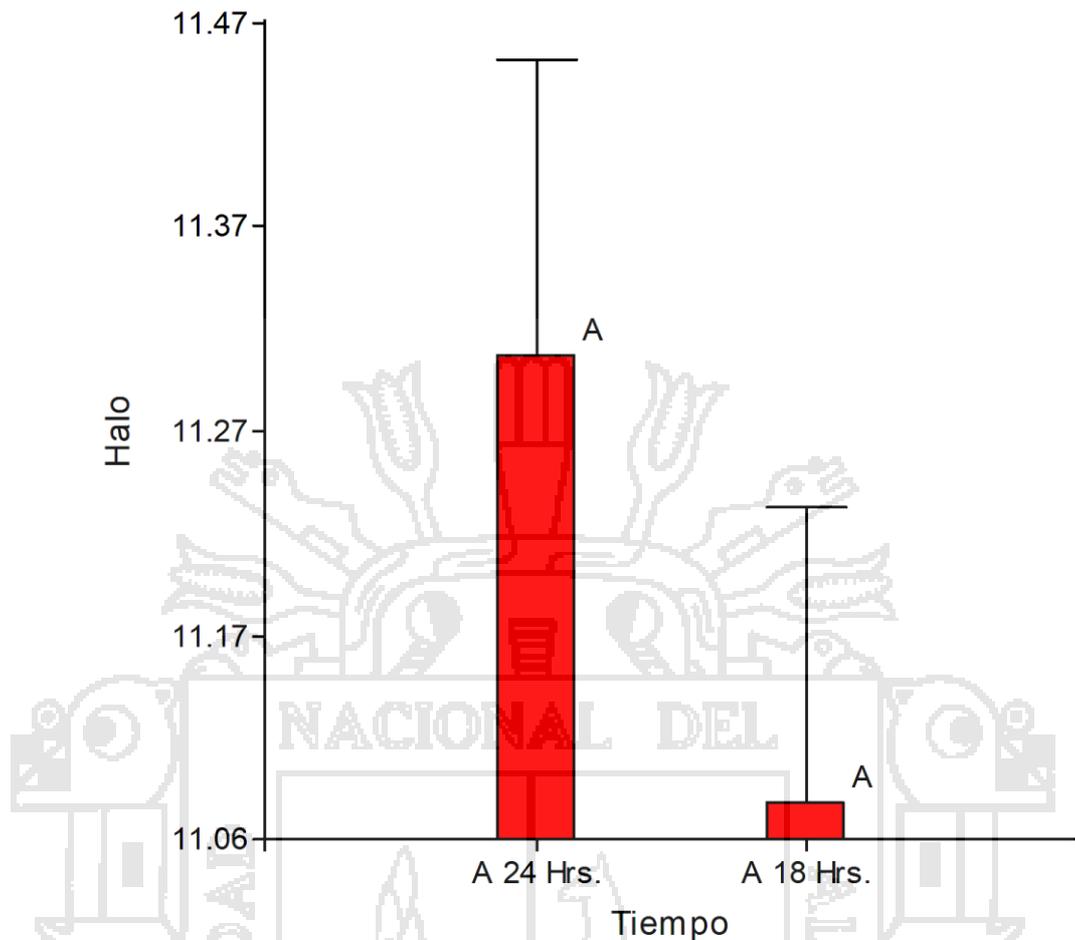


Figura 20. Halo de inhibición de oxitetraciclina en diferentes tiempos

El nivel de significancia de los factores en estudio, revela que la interacción de los factores Bacterias\*pH presenta diferencia estadística altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) resultado expuesto en Anexo 5, se puede observar en la Figura 21, mientras que la interacción Bacterias\*Tiempo ( $p = 0.9308$ ) y Tiempo\*pH ( $p = 0.7125$ ) resultados expuestos en Anexo 5, se pueden observar en la Figura 22 y Figura 23 respectivamente, mostraron diferencia estadística no significativa.

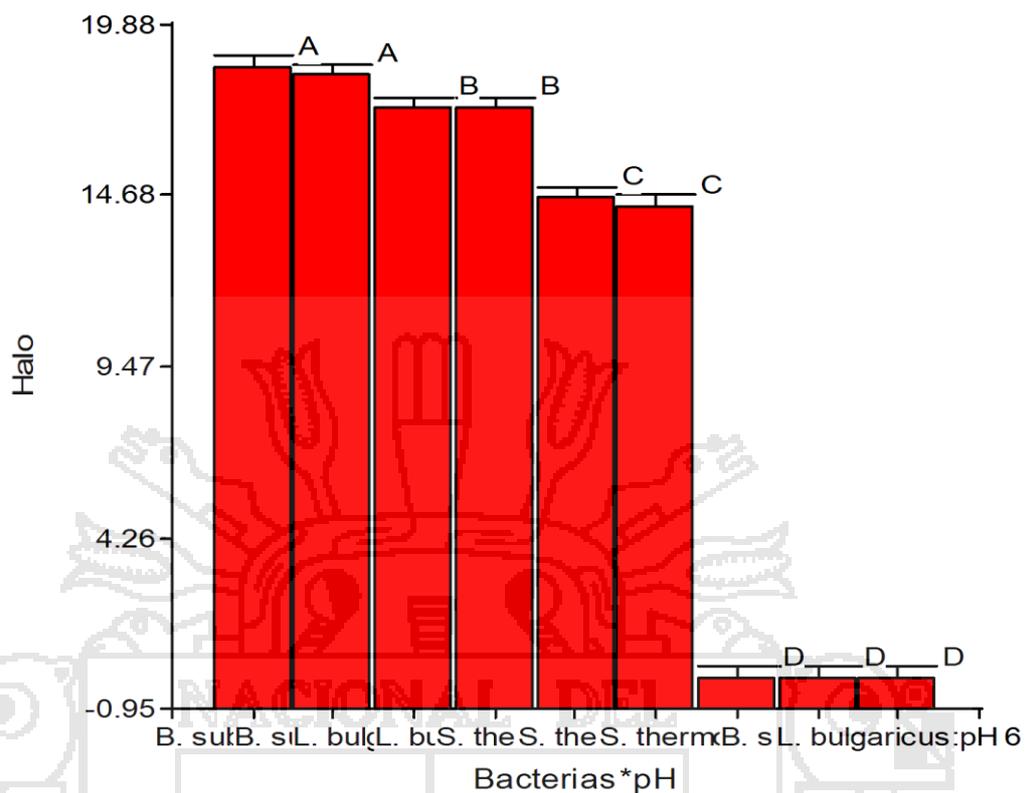


Figura 21. Halo de inhibición de oxitetraciclina en diferentes bacterias y pH

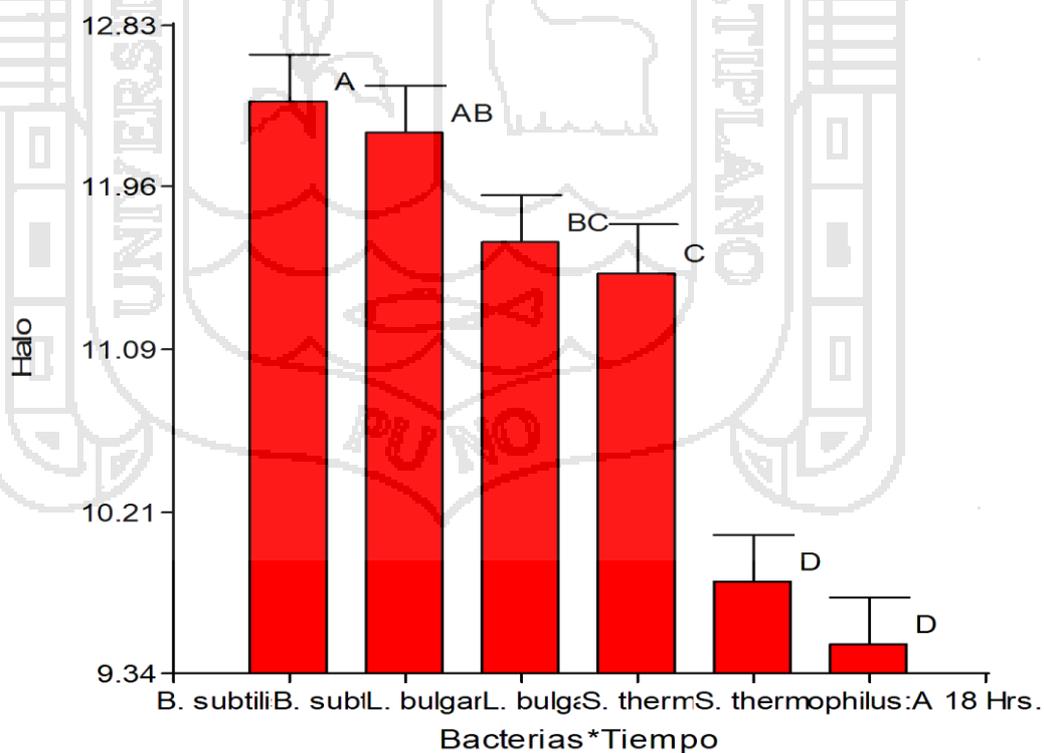


Figura 22. Halo de inhibición de oxitetraciclina en diferentes bacterias y tiempos

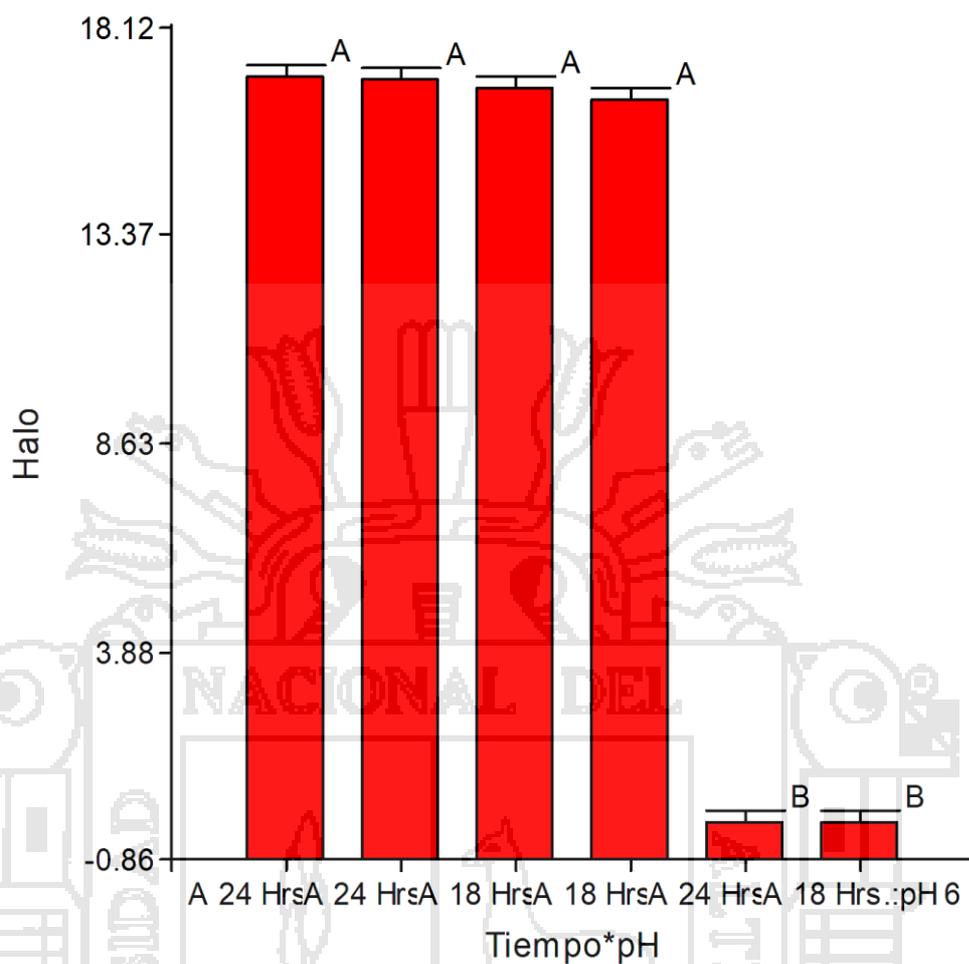


Figura 23. Halo de inhibición de oxitetraciclina en diferentes tiempos y pH

La interacción de los 3 factores Bacteria\*Tiempo\*pH ( $p = 0.9903$ ) resultado expuesto en Anexo 5, se puede observar en la Figura 24, indica que no existe diferencia significativa por lo que no existe interacción de los 3 factores.

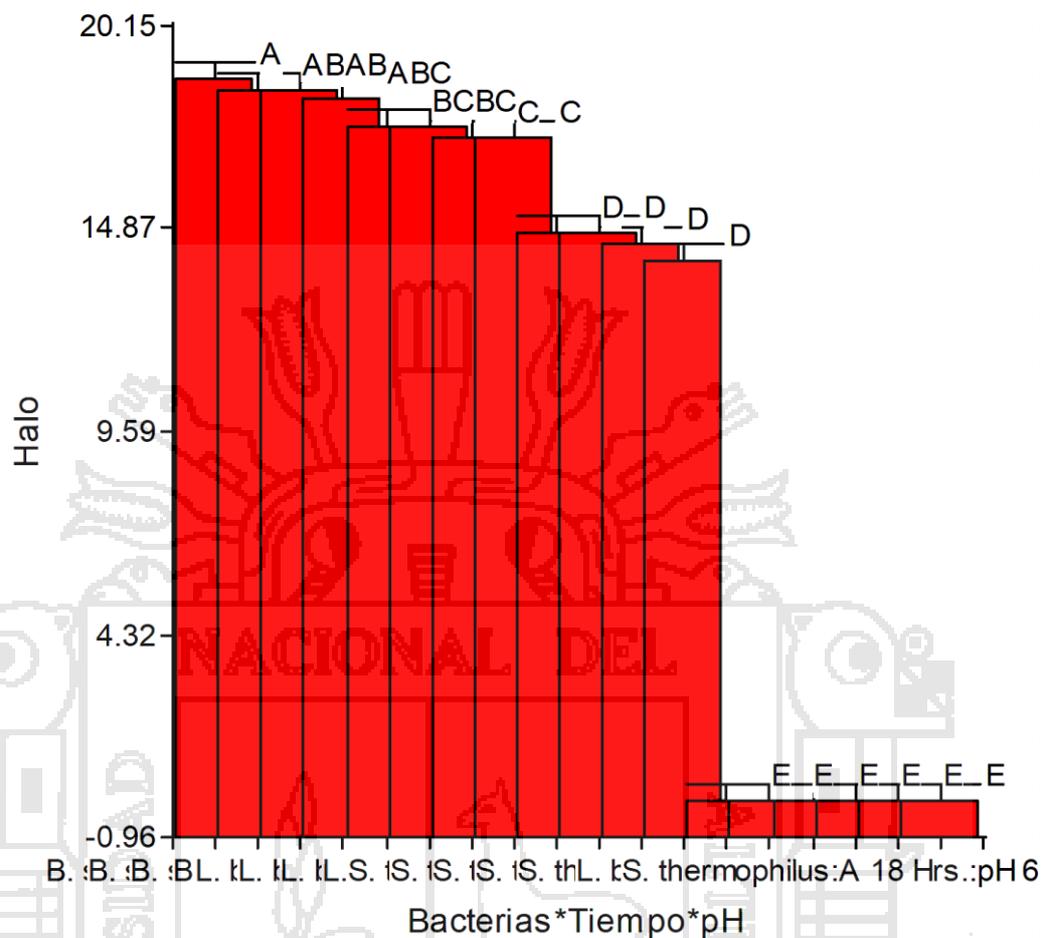


Figura 24. Halo de inhibición de oxitetraciclina en diferentes bacterias, tiempos y pH

La línea recta nos muestra la relación lineal esperada y los puntos dispersos en torno a esa línea muestran la divergencia entre los datos reales y los esperados. Este análisis indica la precisión de la correlación de un conjunto de resultados con una entrada determinada, y la magnitud de la variación con respecto al modelo ideal, los resultados se pueden observar en la Figura 25 que corresponden al Anexo 4 y Anexo 5.

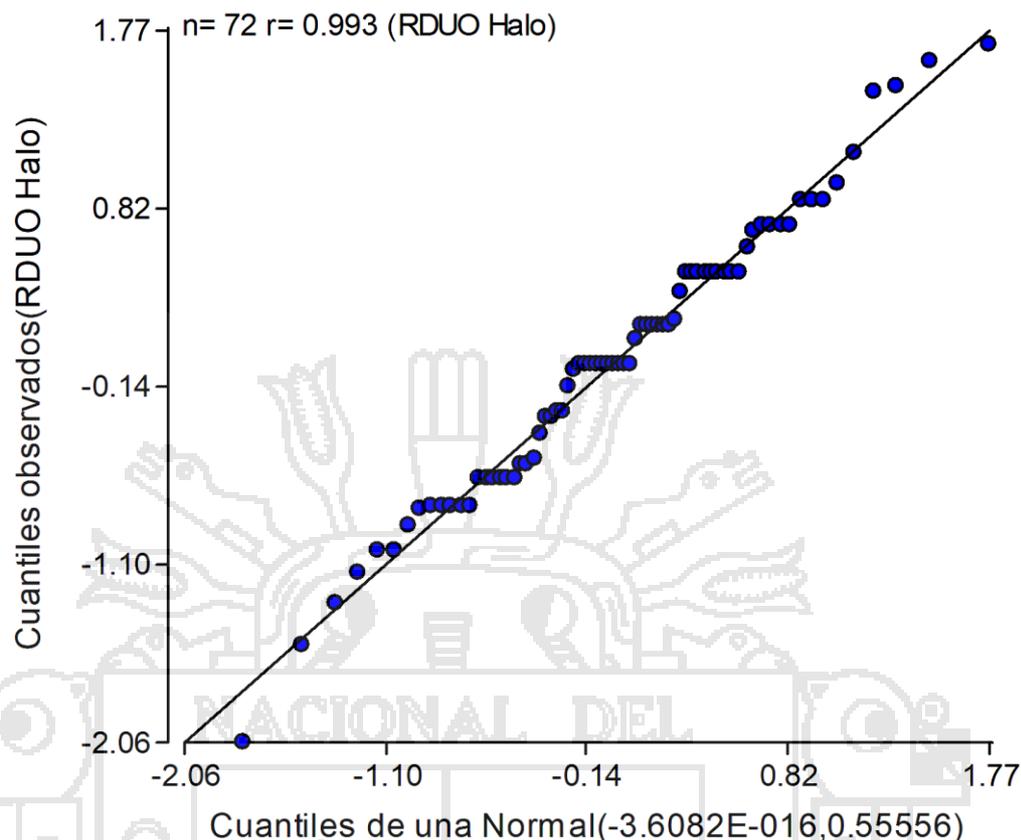


Figura 25. Homogeneidad del experimento con el antibiótico oxitetraciclina

#### 4.1.3 Halo de inhibición de tilosina en diferentes bacterias

El halo de inhibición para tilosina (dosis de 0.25  $\mu\text{L}$ ) por análisis de varianza de efecto simple muestra diferencia altamente significativa a las bacterias (*Bacillus subtilis*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*) y pH del medio de cultivo (6, 7 y 8) expuesto en Anexo 6 ( $p < 0.0001$ ), resultado expuesto en Anexo 7, se pueden observar en la Figura 26 y Figura 27 respectivamente, el tiempo de incubación (18 y 24 Hrs.) expuesto en Anexo 6, no presenta diferencia significativa ( $p = 0.2699$ ), resultado expuesto en Anexo 7, se puede observar en la Figura 28.

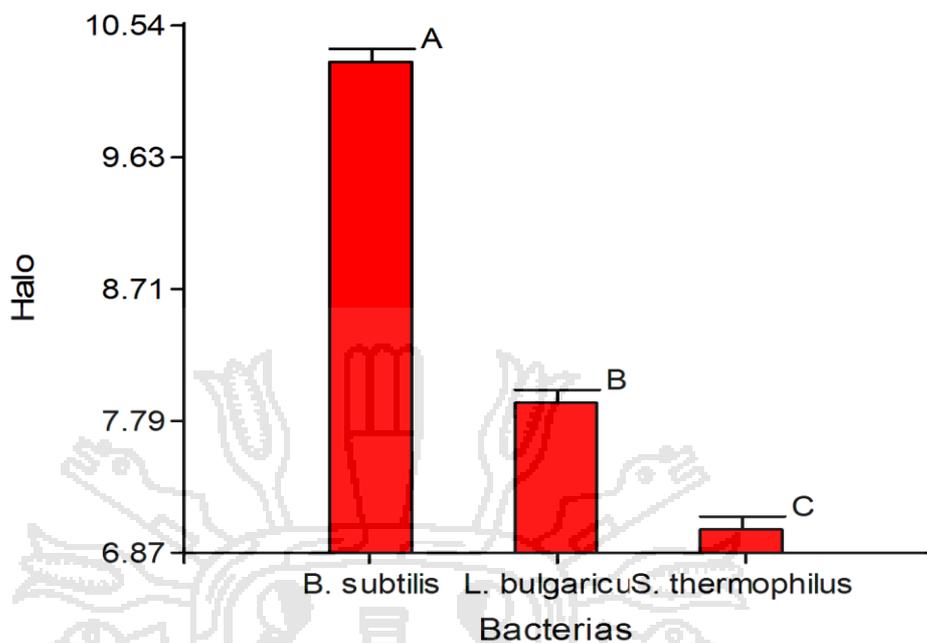


Figura 26. Halo de inhibición de tilosina en diferentes bacterias

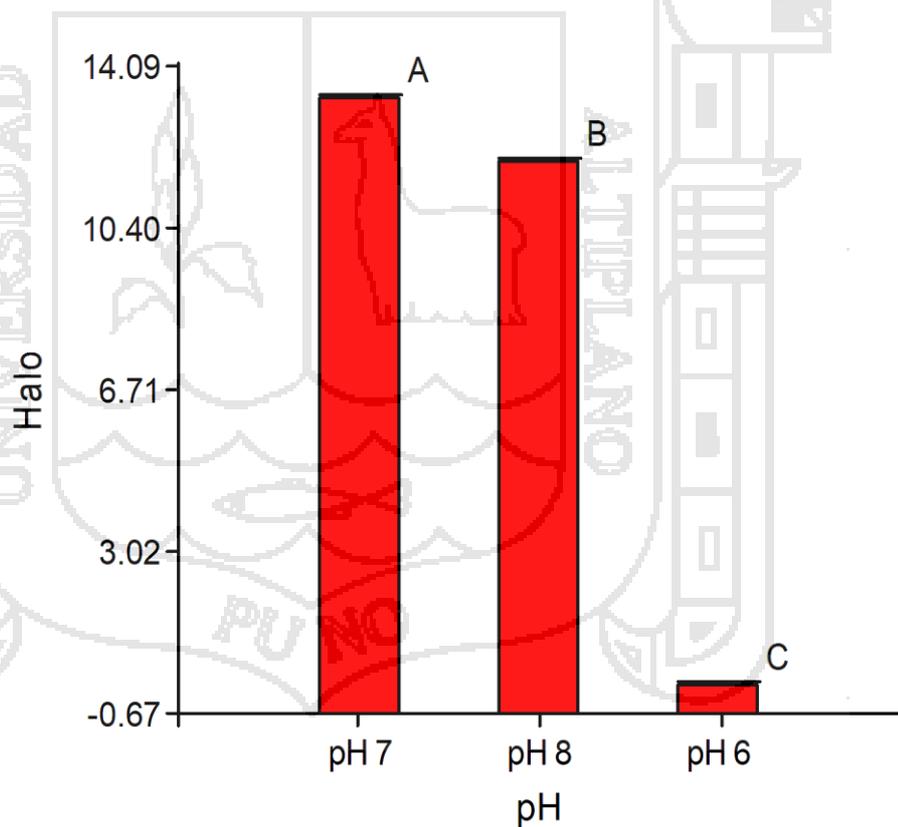


Figura 27. Halo de inhibición de tilosina en diferentes pH

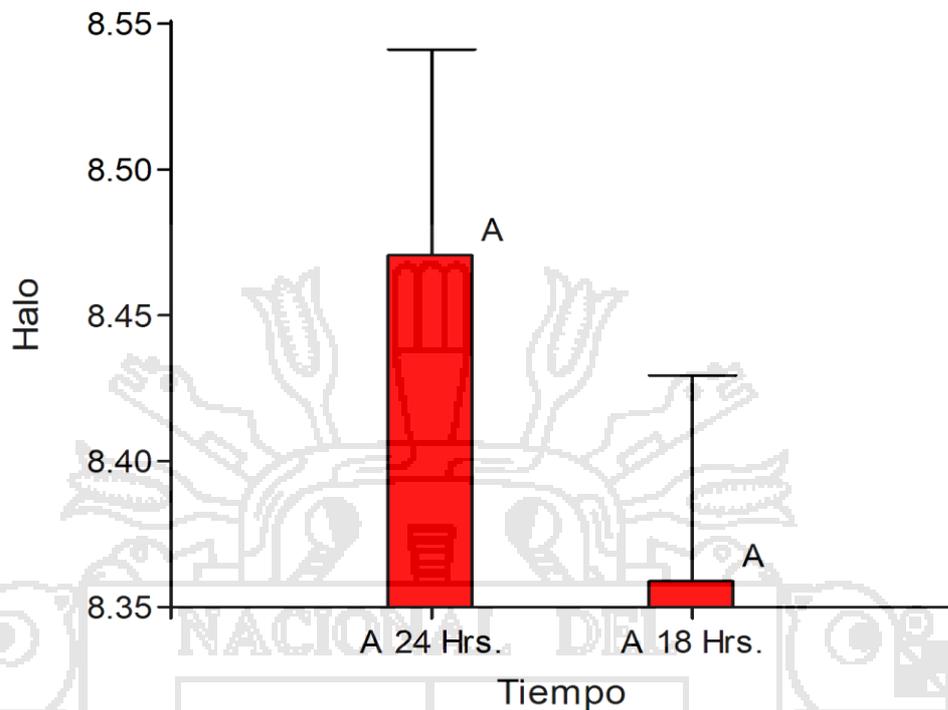


Figura 28. Halo de inhibición de tilosina en diferentes tiempos

El nivel de significancia de los factores en estudio, revela que la interacción de los factores Bacterias\*pH presenta diferencia estadística altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) resultado expuesto en Anexo 7, se puede observar en la Figura 29, mientras que la interacción Bacterias\*Tiempo ( $p = 0.9253$ ) y Tiempo\*pH ( $p = 0.7341$ ) resultados expuestos en Anexo 7, se pueden observar en la Figura 30 y Figura 31 respectivamente, mostraron diferencia estadística no significativa.

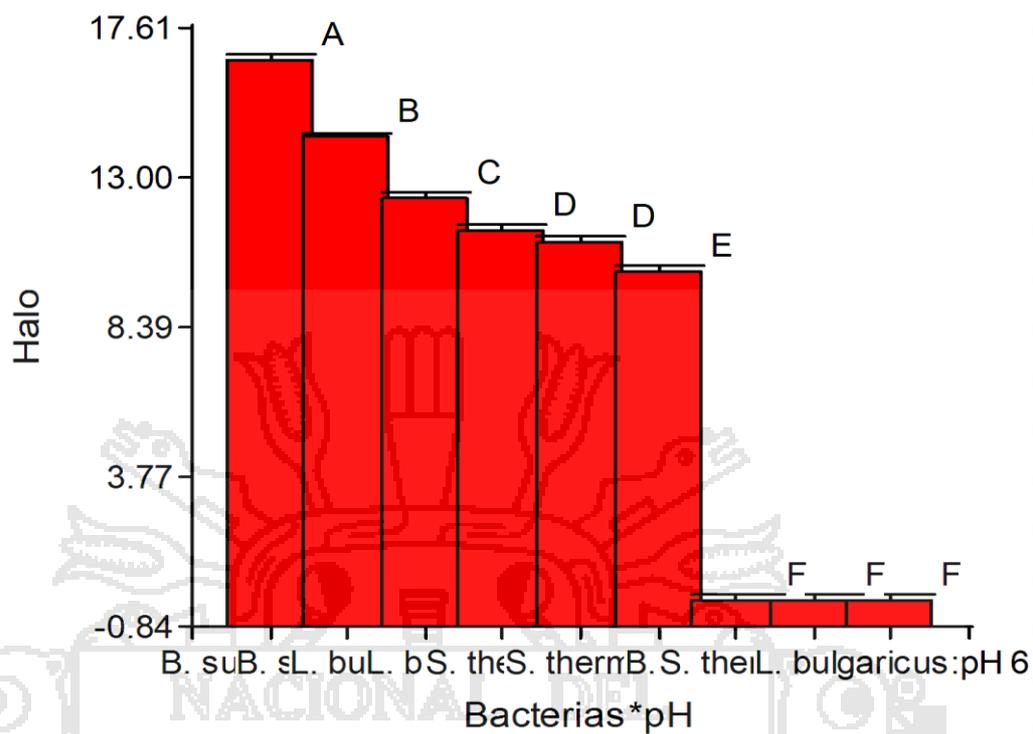


Figura 29. Halo de inhibición de tilosina en diferentes bacterias y pH

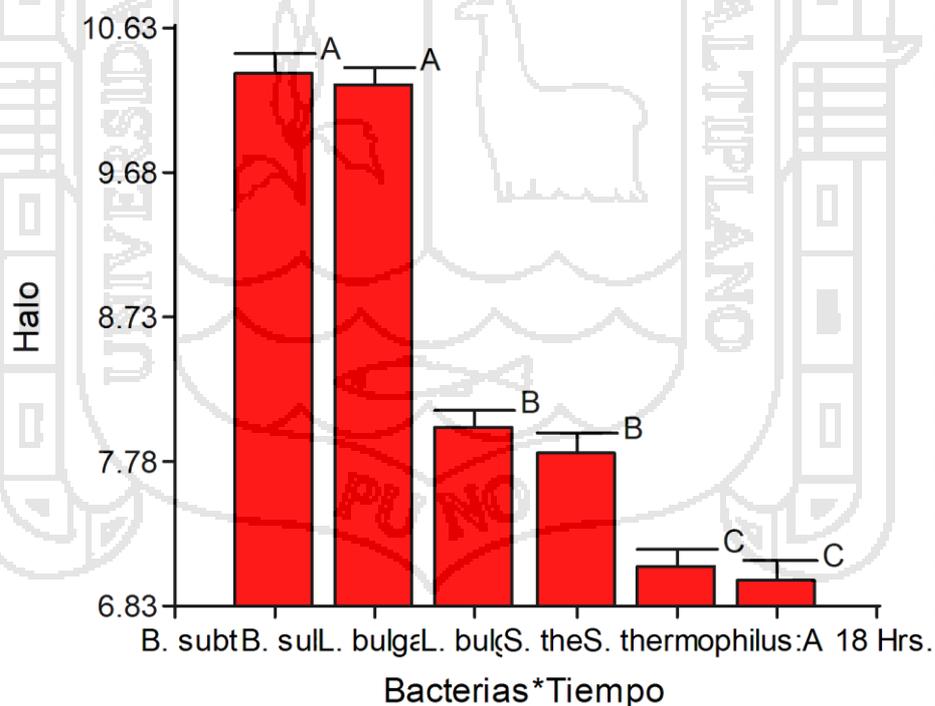


Figura 30. Halo de inhibición de tilosina en diferentes bacterias y tiempo

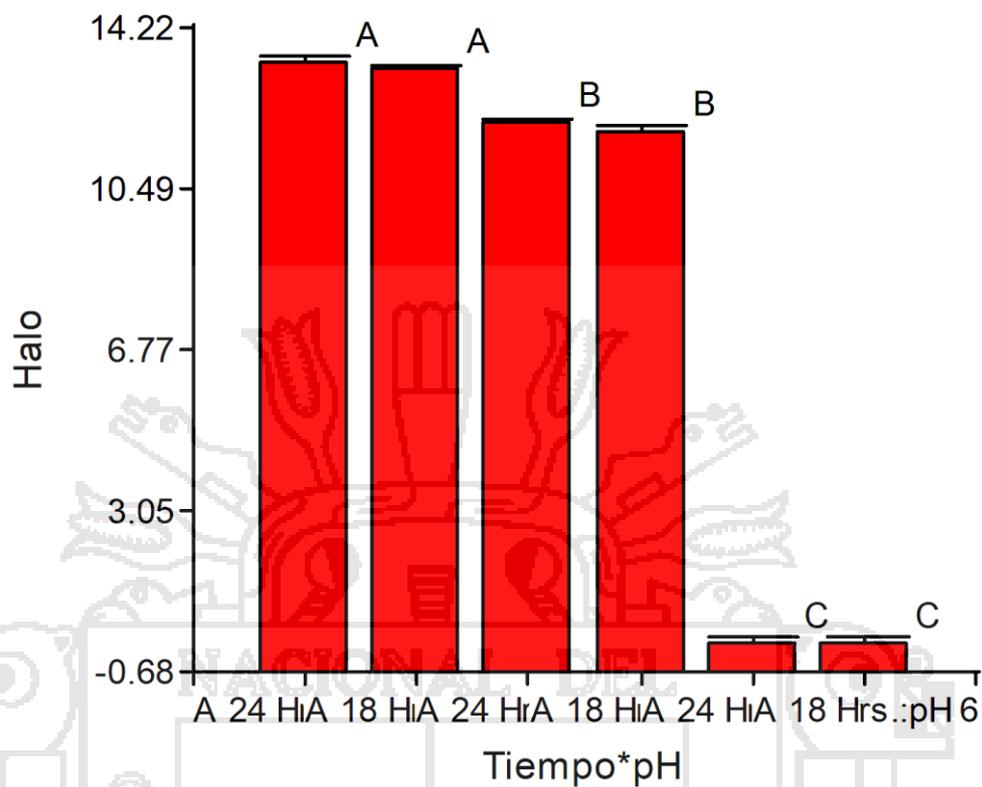


Figura 31. Halo de inhibición de tilosina en diferentes tiempos y pH

La interacción de los 3 factores Bacteria\*Tiempo\*pH ( $p = 0.9402$ ) resultado expuesto en Anexo 5, se puede observar en la Figura 32, indica que no existe diferencia significativa por lo que no existe interacción de los 3 factores.

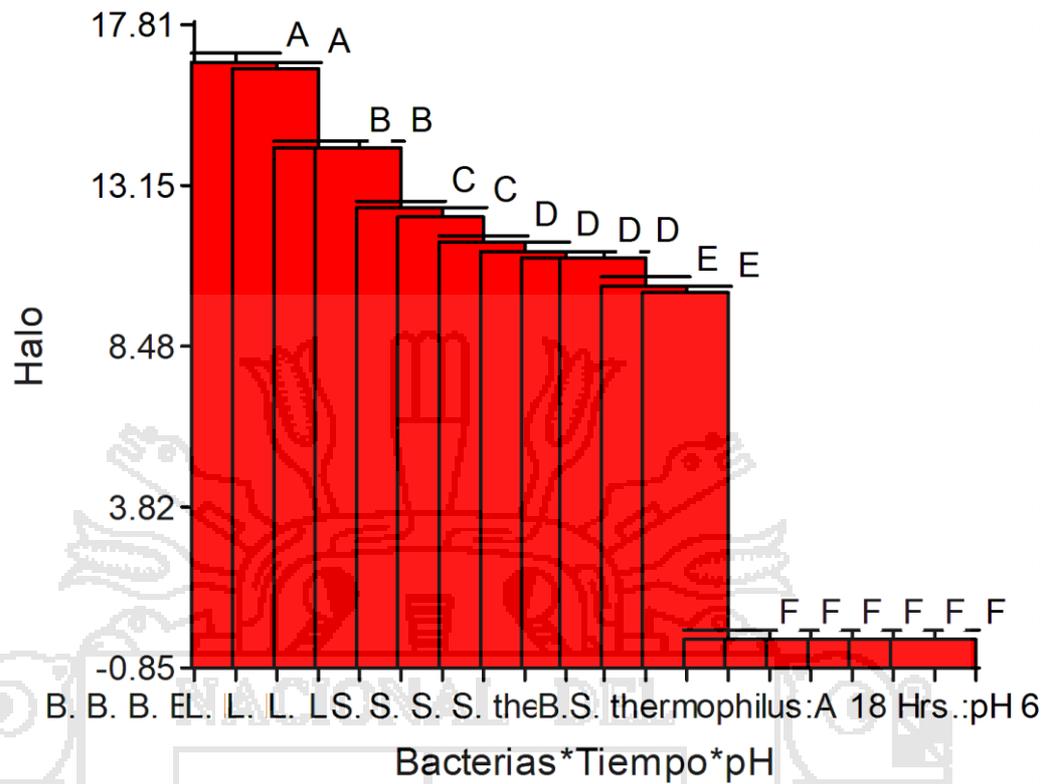


Figura 32. Halo de inhibición de tilosina en diferentes bacterias, tiempos y pH

La línea recta nos muestra la relación lineal esperada y los puntos dispersos en torno a esa línea muestran la divergencia entre los datos reales y los esperados. Este análisis indica la precisión de la correlación de un conjunto de resultados con una entrada determinada, y la magnitud de la variación con respecto al modelo ideal, los resultados se pueden observar en la Figura 33 que corresponden al Anexo 6 y Anexo 7.

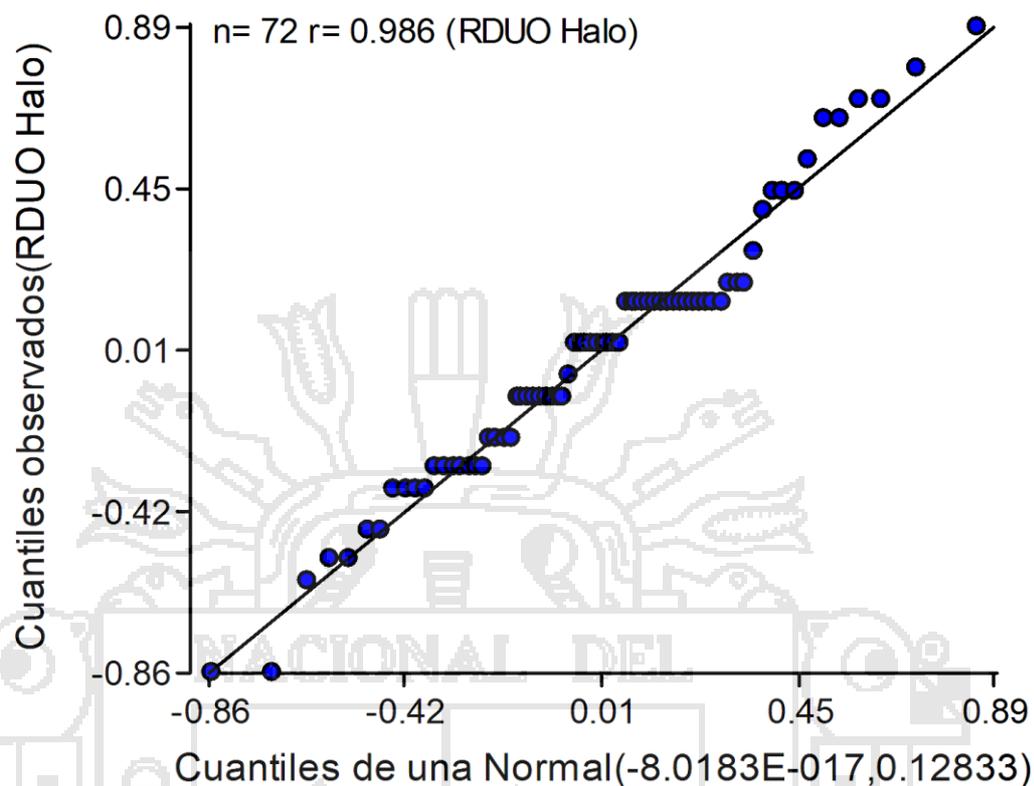


Figura 33. Homogeneidad del experimento con el antibiótico tilosina

#### 4.1.4 Punto óptimo del tratamiento en la bacteria más sensible

Para identificar la bacteria más sensible se evalúan diferentes Anexos a través del Test: LSD Fisher, a fin de identificar las medias del halo de inhibición del antibiótico penicilina, del Anexo 3 se observa que en *B. subtilis* es 13.38, *S. thermophilus* 12.21 y en *L. bulgaricus* 12.04; del Anexo 5 a fin de identificar las Medias del halo de inhibición del antibiótico oxitetraciclina se observa que en *B. subtilis* es 12.33, en *L. bulgaricus* 11.58 y en *S. thermophilus* es 9.67; del Anexo 7 a fin de identificar las Medias del halo de inhibición del antibiótico tilosina se observa que en *B. subtilis* es 10.29, en *L. bulgaricus* 7.92 y *S. thermophilus* es 7.04. De los resultados mostrados se observa que la bacteria más sensible es *B. subtilis*.

En la bacteria más sensible se optimiza el pH del medio de cultivo y el tiempo de incubación, para el cual se realiza el experimento en laboratorio, las pruebas se han realizado a la misma dosis (0.25  $\mu$ L) los tres antibióticos ajustando el pH (a 5.59,

6, 7, 8 y 8.41) y el tiempo (a 16.76, 18, 21, 24 y 25.24) de acuerdo al modelo estadístico de diseños compuestos centrales.

Se realiza la evaluación de la curvatura del diseño factorial para el halo de inhibición de tres antibióticos (penicilina, oxitetraciclina y tilosina) en la bacteria más sensible (*Bacillus subtilis*), el resultado se muestra en los análisis de varianza del Anexo 8 en donde se puede observar que en los tres antibióticos el valor p es 0.000 lo que indica que la curvatura del diseño aplicado es altamente significativo los que se pueden observar en las Figura 34, Figura 35 y Figura 36 respectivamente.

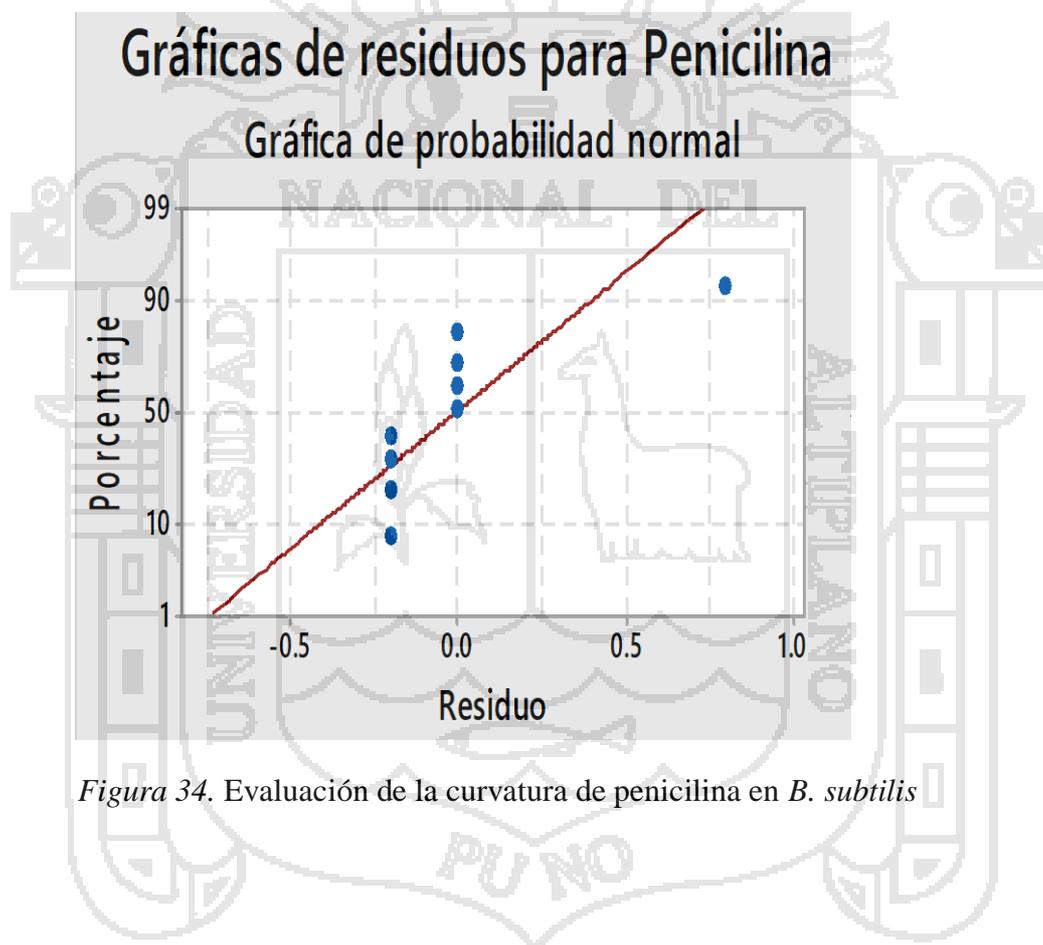


Figura 34. Evaluación de la curvatura de penicilina en *B. subtilis*

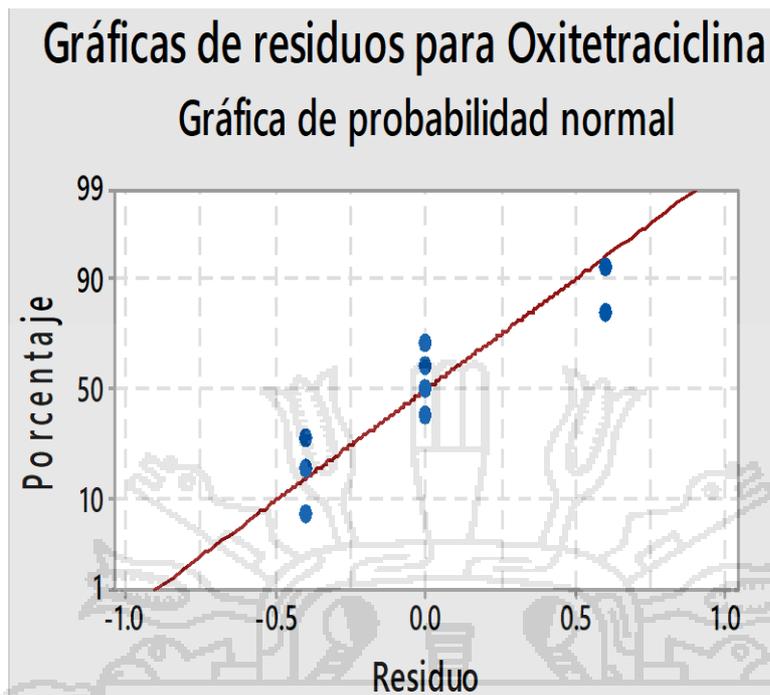


Figura 35. Evaluación de la curvatura de oxitetraciclina en *B. subtilis*

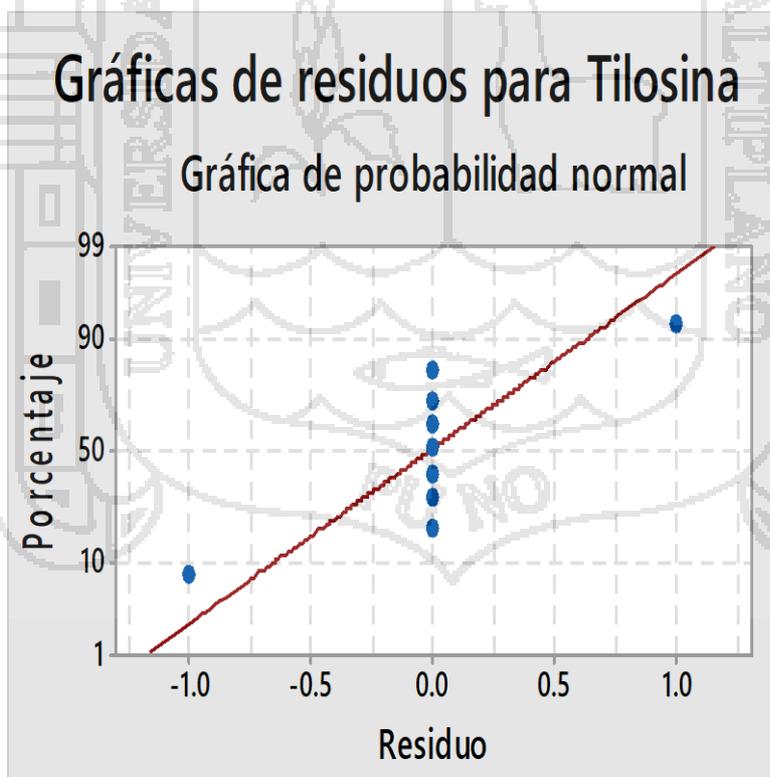


Figura 36. Evaluación de la curvatura de tilosina en *B. subtilis*

Para determinar el rango óptimo del tratamiento para penicilina, oxitetraciclina y tilosina se observa en el análisis de varianza del Anexo 10, Anexo 11 y Anexo 12 respectivamente, en donde el pH del medio de cultivo (valor p entre 0.000 y 0.001) es considerado como altamente significativo y el factor Tiempo presenta el valor  $p = 0.818$  para penicilina, valor  $p = 1.000$  para oxitetraciclina y valor  $p = 0.757$  para tilosina, los que se pueden observar en la Figura 37, Figura 38 y Figura 39 respectivamente, que el rango del punto óptimo se encuentra a un pH de 6.8 a 7.2 del medio de cultivo MRS a un tiempo de 18 horas en la bacteria *B. subtilis*, al respecto Gatica & Gesche (2007) refiere rangos de pH similares para la *B. subtilis*. Por otro lado Andino & Castillo (2010) refiere que la mayoría de los microorganismos crecen mejor a valores de pH en torno a 7,0 (6,6-7,5) mientras que son pocos los que crecen por debajo de 4,0.

Gráfica de superficie de Penicilina vs. pH; Tiempo

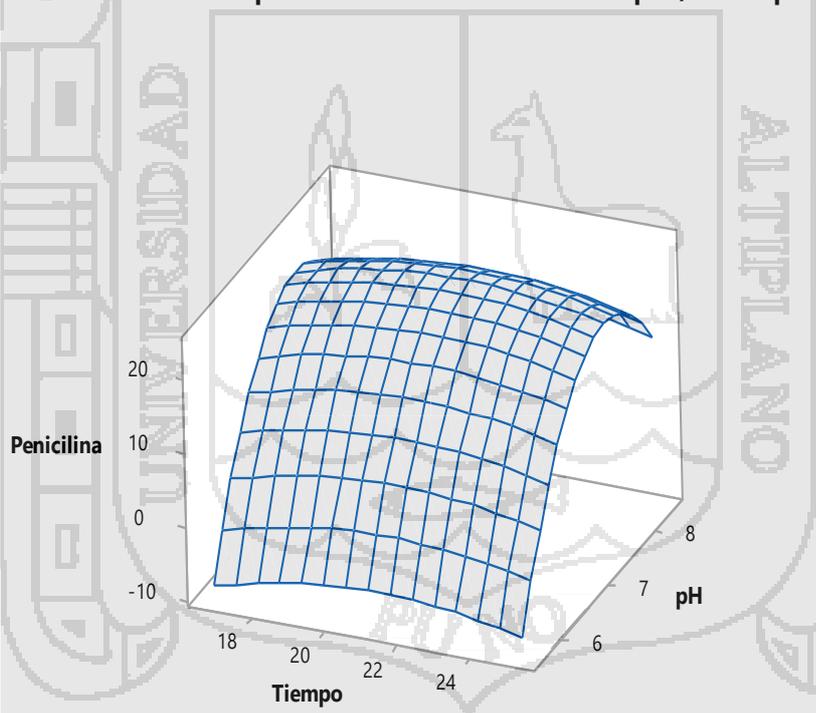


Figura 37. Determinación del rango óptimo del halo de inhibición de penicilina en la bacteria *B. subtilis*

Gráfica de superficie de Oxitetraciclina vs. pH; Tiempo

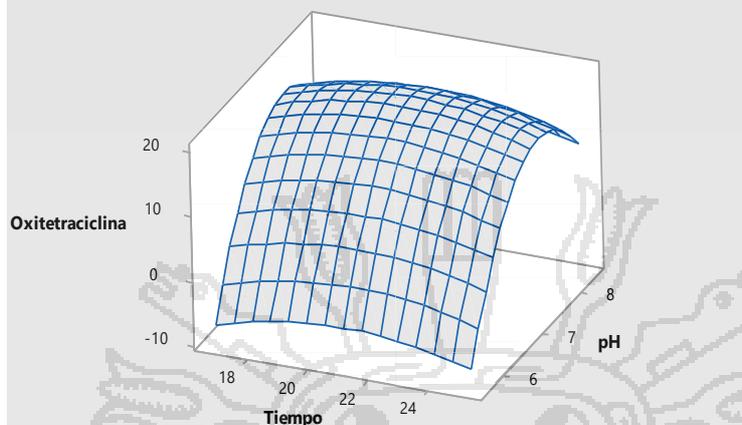


Figura 38. Determinación del rango óptimo del halo de inhibición de oxitetraciclina en la bacteria *B. subtilis*

Gráfica de superficie de Tilosina vs. pH; Tiempo

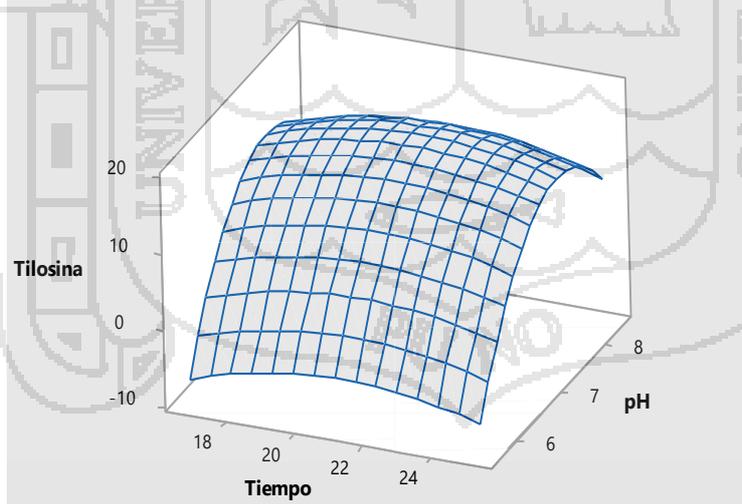


Figura 39. Determinación del rango óptimo del halo de inhibición de tilosina en la bacteria *B. subtilis*

## 4.2 Concentración inhibitoria mínima de tres antibióticos

Las pruebas se han realizado a diferentes dosis de los tres antibióticos penicilina, oxitetraciclina y tilosina (2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125  $\mu$ L) en agar MRS a pH 7, una turbidez equivalente al 0.5 Mc. Farland que representa  $10^8$  Ufc/ml, se examinan después de incubar 18 Horas a 35°C para *B. subtilis* y 37°C para *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM). La CIM se registra como el valor de la menor dilución que inhibe completamente el desarrollo bacteriano formando un halo de inhibición.

### 4.2.1 Concentración inhibitoria mínima para penicilina en tres bacterias *B. subtilis*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*.

El resultado del análisis de varianza se muestra en el Anexo 13 su significancia es verificado de acuerdo al modelo estadístico de regresión donde  $p=0.0387$  para *B. subtilis* que se observa en la Figura 40,  $p = 0.0467$  para *L. bulgaricus* que se observa en la Figura 41 y  $p = 0.0425$  para *S. thermophilus* que se observa en la Figura 42, los tres p-valores indican que es altamente significativo la metodología empleada y la línea recta de dispersión que se muestran en las figuras mencionadas. Finalmente se observa que las tres bacterias mencionadas son sensibles a 0.125  $\mu$ L. Al respecto Pasterán & Galas (2008) indica que este tipo de métodos es una alternativa aceptable para la estandarización del inóculo en las pruebas de sensibilidad de bacterias de rápido crecimiento. Los resultados de estos métodos alternativos pueden ser igualmente útiles; sin embargo, a veces son más difíciles de controlar.

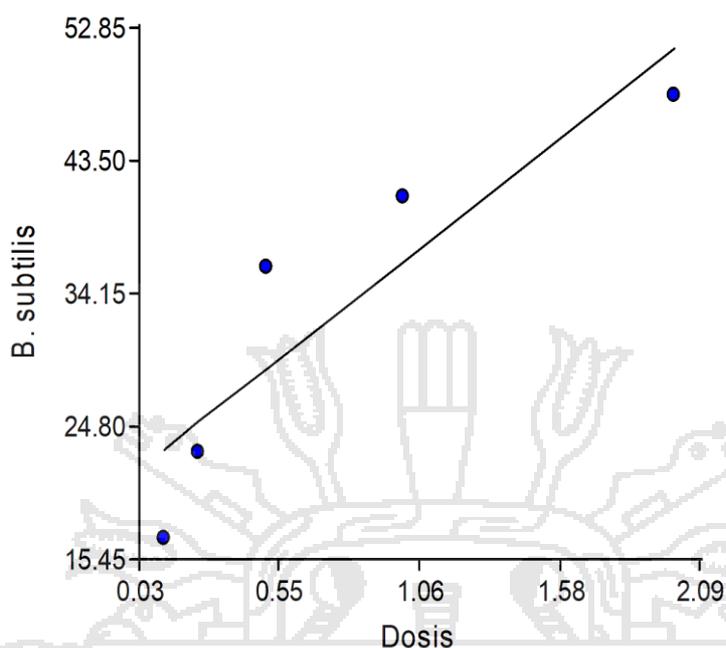


Figura 40. Concentración inhibitoria mínima de penicilina en la bacteria *B. subtilis*

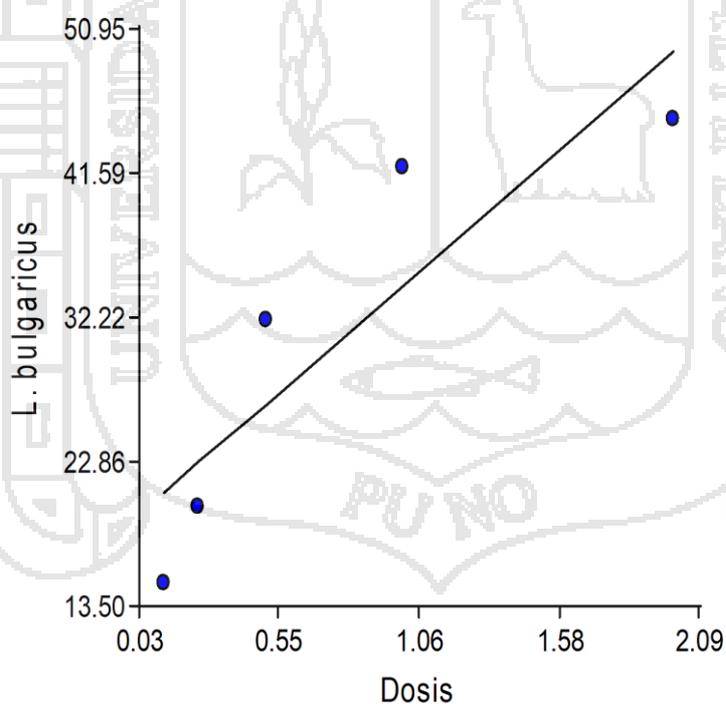


Figura 41. Concentración inhibitoria mínima de penicilina en la bacteria *L. bulgaricus*

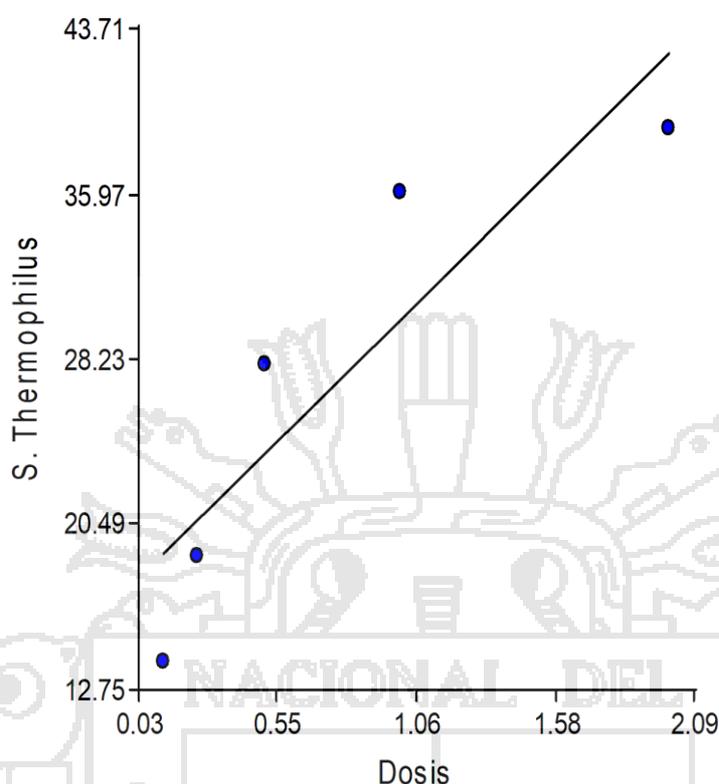


Figura 42. Concentración inhibitoria mínima de penicilina en la bacteria *S. thermophilus*

#### 4.2.2 Concentración inhibitoria mínima para oxitetraciclina en tres bacterias *B. subtilis*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*

El resultado del análisis de varianza se muestra en el Anexo 14 su significancia es verificado de acuerdo al modelo estadístico de regresión donde  $p=0.0480$  para *B. subtilis* que se observa en la Figura 43,  $p = 0.0460$  para *L. bulgaricus* que se observa en la Figura 44 y  $p = 0.0407$  para *S. thermophilus* que se observa en la figura 45, los tres p-valores indican que es altamente significativo la metodología empleada y la línea recta de dispersión que se muestran en las figuras mencionadas. Finalmente se observa que las tres bacterias mencionadas son sensibles a  $0.125 \mu\text{L}$ .

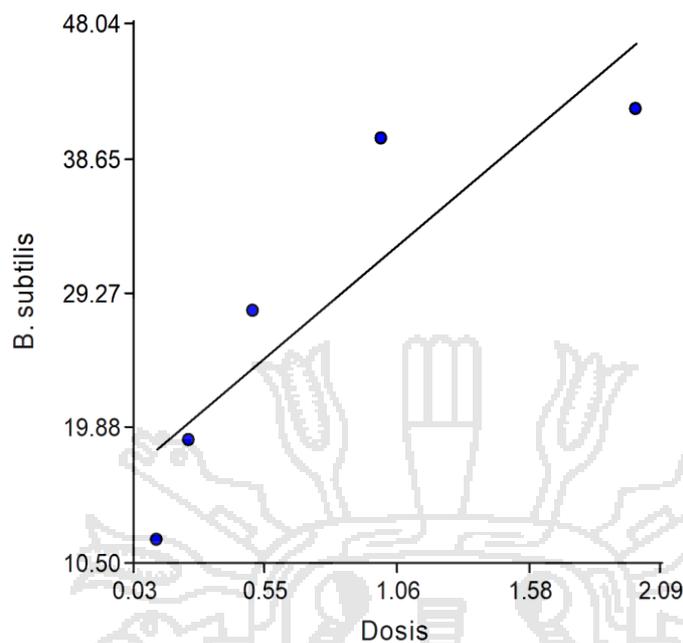


Figura 43. Concentración inhibitoria mínima de oxitetraciclina en la bacteria *B. subtilis*

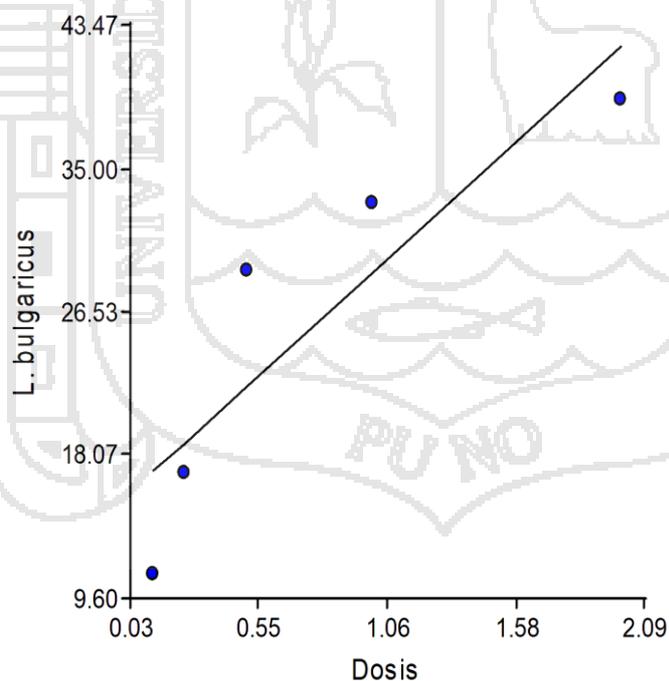


Figura 44. Concentración inhibitoria mínima de oxitetraciclina en la bacteria *L. bulgaricus*

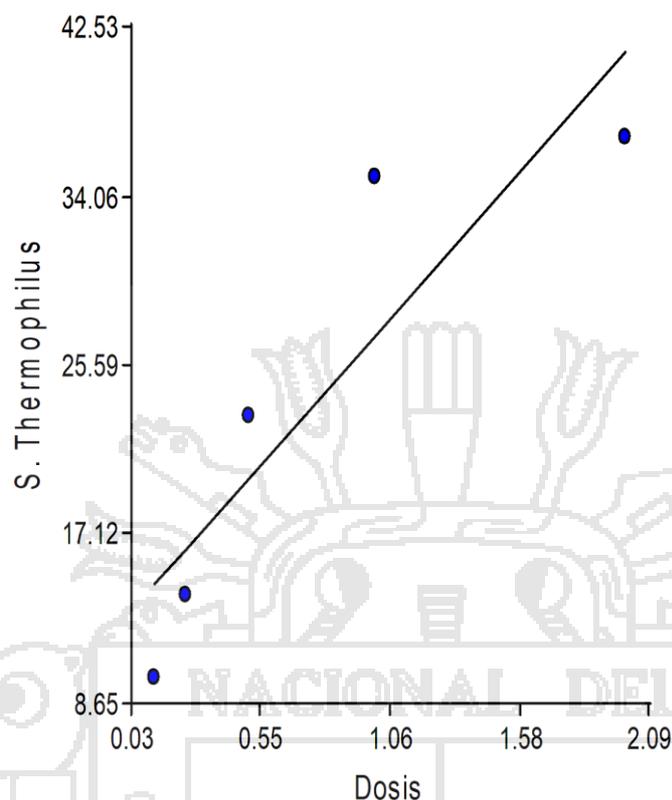


Figura 45. Concentración inhibitoria mínima de oxitetraciclina en la bacteria *S. thermophilus*

Según Cavalieri *et al.* (2005) refiere que la línea recta nos muestra la relación lineal esperada y los puntos dispersos en torno a esa línea muestran la divergencia entre los datos reales y los esperados. Este análisis indica la precisión de la correlación de un conjunto de resultados con una entrada determinada, y la magnitud de la variación con respecto al modelo ideal.

#### 4.2.3 Concentración inhibitoria mínima para tilosina en tres bacterias *B. subtilis*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*

El resultado del análisis de varianza se muestra en el Anexo 15 su significancia es verificado de acuerdo al modelo estadístico de regresión donde  $p=0.0399$  para *B. subtilis* que se observa en la Figura 46,  $p = 0.0410$  para *L. bulgaricus* que se observa en la Figura 47 y  $p = 0.0430$  para *S. thermophilus* que se observa en la Figura 48, los tres p-valores indican que es altamente significativo la metodología empleada y la línea recta de dispersión que se muestran en las figuras

mencionadas. Finalmente se observa que las tres bacterias mencionadas son sensibles a 0.125  $\mu$ L.

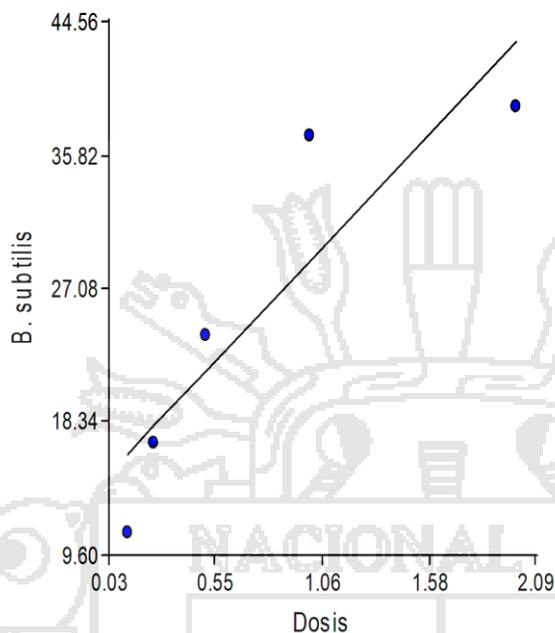


Figura 46. Concentración inhibitoria mínima de tilosina en la bacteria *B. subtilis*

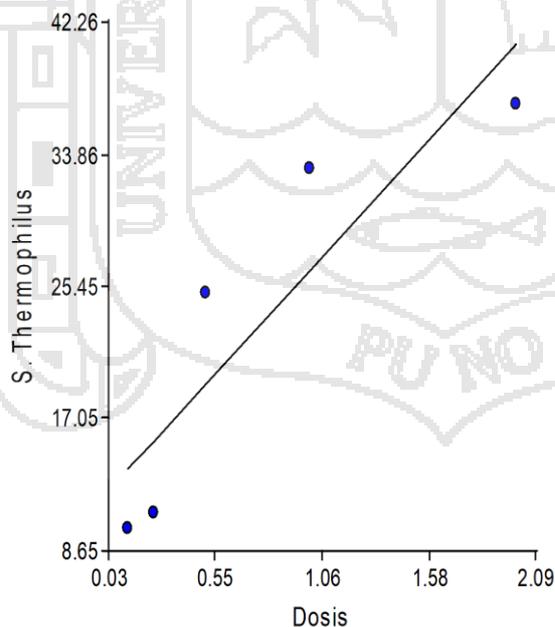


Figura 47. Concentración inhibitoria mínima de tilosina en la bacteria *S. thermophilus*

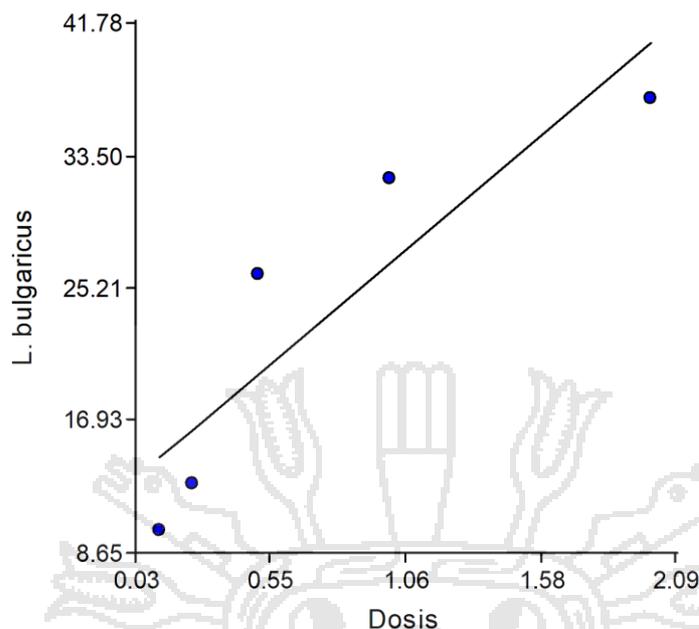


Figura 48. Concentración inhibitoria mínima de tilosina en la bacteria *L. bulgaricus*

### 4.3 Especificidad y sensibilidad del método biológico

#### 4.3.1 Especificidad del método biológico

Para determinar la especificidad de los métodos microbiológicos, se analizaron por triplicado 32 muestras de quesos, elaborados de leche de vacas mejoradas, sanas, no tratadas con ningún antibiótico por más de un mes y los resultados se muestran en la Tabla 8, donde se resumen las frecuencias de resultados negativos, dudosos y positivos. Considerando la siguiente ecuación:

$$Especificidad = \frac{VN}{VN + FP} \times 100$$

Tabla 8

*Especificidad del método biológico*

| Métodos de<br>detección de<br>residuos de<br>antibióticos | Bacteria                   | Total de<br>muestras | Resultados (Materia prima sin antibiótico) |         |           |       |
|---|----------------------------|----------------------|--|---------|-----------|-------|
|   |                            |                      | Negativos                                  | Dudosos | Positivos | %     |
| Inhibición del<br>queso tipo<br>paria                     | <i>B. subtilis</i>         | 32                   | 32   | 0       | 0         | 100   |
| Inhibición del<br>queso tipo<br>paria                     | <i>L.<br/>bulgaricus</i>   | 32                   | 30   | 2*      | 0         | 93.75 |
| Inhibición del<br>queso tipo<br>paria                     | <i>S.<br/>thermophilus</i> | 32                   | 31   | 1*      | 0         | 96.88 |

\* Las muestras que resultaron dudosos al análisis se considera positivo

La Tabla nos muestra los resultados de especificidad, para la prueba de Inhibición del queso tipo paria en *Bacillus subtilis* es del 100% y para *Lactobacillus bulgaricus* 93.75% y *Streptococcus thermophilus* 96.88%, en medio de cultivo MRS con pH 7 en 18 horas a 35°C y 37°C respectivamente.

El resultado dudoso que se presenta en la prueba de inhibición del queso tipo paria, no se debe a la presencia de antibióticos, considerado como “falso positivo” debido a que las muestras de leche utilizadas, fueron obtenidas de vacas que no han recibido ningún tratamiento con medicamentos.

Se debe tener en cuenta que en caso de los resultados dudosos, la determinación del resultado está basado en el halo de inhibición contenido en el medio de cultivo de los métodos microbiológicos, y los resultados están sujetos a un elevado nivel de subjetividad, motivo por el cual algunos autores sugieren la aplicación del tratamiento térmico a la leche previo a su elaboración de los sub productos y su

posterior análisis es recomendado, ya que este procedimiento reduce los resultados falsos positivos (Gatica & Gesche, 2007).

Para disminuir el porcentaje de “Falsos positivos” Yamaki, Berruga, Althaus, Molina, & Molina (2011) consideran el calentamiento de la leche a 82°C durante 10 minutos, que reduce el porcentaje de resultados positivos hasta un 0,9%, lo que indica que algunos de estos resultados podían ser causados por la presencia de inhibidores naturales.

### 4.3.2 Sensibilidad del método biológico

Para determinar la sensibilidad de la prueba biológicas para los diferentes antibióticos se ha utilizado leche con antibiótico (concentraciones equivalentes a LMRs) para procesar queso tipo paria, se realizaron 32 repeticiones para cada uno y se muestra el resumen en la siguiente Tabla 9. Considerando la siguiente ecuación:

$$Sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN} \times 100$$

Para determinar la sensibilidad los resultados que se interpretaron como dudosos se han contabilizado en todos los casos como positivos, considerando que las muestras de leche contenían LMRs de antibióticos.

Tabla 9

*Sensibilidad del método biológico*

| Métodos de<br>detección<br>de residuos<br>de<br>antibióticos | Bacteria               | (% Sensibilidad (LMRs de antibiótico en materia prima)) |          |       |                 |          |       |          |          |        |
|--|------------------------|---|----------|-------|-----------------|----------|-------|----------|----------|--------|
|  |                        | Penicilina  |          |       | Oxitetraciclina |          |       | Tilosina |          |        |
|  |                        | Total   | Positivo | %     | Total           | Positivo | %     | Total    | Positivo | %      |
| Inhibición<br>del queso<br>tipo paria                        | <i>B. subtilis</i>     | 32  | 32       | 100   | 32              | 31       | 96.87 | 32       | 31       | 96.875 |
|  | <i>L. bulgaricus</i>   | 32  | 31       | 96.87 | 32              | 29       | 90.62 | 32       | 31       | 96.875 |
|  | <i>S. thermophilus</i> | 32  | 32       | 100   | 32              | 30       | 93.75 | 32       | 30       | 93.75  |

En la tabla 9, se observa que la sensibilidad para penicilina es del 100% en la bacteria *B. subtilis*, 96.875% en *L. bulgaricus* y 100% en *S. thermophilus*; para oxitetraciclina es del 96.875% en la bacteria *B. subtilis*, 90.625% en *L. bulgaricus* y 93.75% en *S. thermophilus*; para tilosina es del 96.875% en la bacteria *B. subtilis*, 96.875% en *L. bulgaricus* y 93.75% en *S. thermophilus*; el estudio se ha realizado en medio de cultivo MRS con pH 7 en 18 horas a 35°C y 37°C respectivamente.

#### 4.3.2.1 Sensibilidad para penicilina

La sensibilidad para penicilina es del 100% en *B. subtilis* y *S. thermophilus*, y en *L. Bulgaricus* es 96.875, al respecto encontramos similitud con resultados de otras técnicas biológicas para detectar sustancias antimicrobianas que utilizan microorganismos tales como *Sarcina lutea*, *Bacillus stearothermophilus*. Otra prueba más reciente es un ensayo inmunoenzimático de competición, que detecta cuantitativamente la cantidad de residuo de antibiótico presente en la leche. Esta es una prueba rápida y eficaz con un nivel de sensibilidad del 95%, y que es usada actualmente como método «screening» en las normas sobre leche pasteurizada (Salas et al., 2013).

#### 4.3.2.2 Sensibilidad para oxitetraciclina

La sensibilidad para oxitetraciclina es del 96.875% en *B. subtilis*, 90.625% en *L. Bulgaricus* y 93.75% en *S. thermophilus*, según refiere Gatica & Gesche (2007) el criterio de sensibilidad a un determinado antibiótico es a través de los halos de inhibición o aquella que presentase el halo de mayor tamaño.

De acuerdo a algunos estudios de sensibilidad de la prueba demostró que penicilina fue detectable a 0.002UI/ml; oxitetraciclina a 0.005µg/ml y cloramfenicol a 1,25 µg/ ml, la misma se evidencia con los resultados mostrados en las diferentes bacterias (Máttar et al., 2009).

En algunos estudios refieren también que la bacteria *S. thermophilus* presenta sensibilidad a la presencia de determinadas sustancias indican que es muy sensible a la presencia de inhibidores y en especial de antibióticos, por

ejemplo su crecimiento es inhibido por 0,01 U.I de penicilina o 5 µg de estreptomicina por mL de leche (Romero del Castillo & Mestres, 2004).

#### 4.3.2.3 Sensibilidad para tilosina

La sensibilidad para tilosina es del 96.875% en *B. subtilis*, 96.875% en *L. bulgaricus* y 93.75% en *S. thermophilus*, se observa también que la bacteria *L. bulgaricus* presente sensibilidad significativa a la presencia de determinadas sustancias inhibidoras, es inhibido por 0,3-0,6 U.I de penicilina (Romero del Castillo & Mestres, 2004).

Refieren algunos estudios que el método microbiológico de difusión por excavación en agar permite estimar la potencia antibiótica de la tilosina tartrato de manera confiable y precisa. Hallándose los límites inferior y superior de confianza, de los tres lotes analizado, dentro del rango de 95% al 105% referido por la BP2008 (Cárdenas & Asencios, 2008).

#### 4.3.3 Residuos de antibióticos en queso tipo paria expandida en los mercados de la ciudad de Puno.

Utilizando las pruebas microbiológicas con la bacteria más sensible *Bacillus subtilis*, se determinó la presencia de residuos de antibióticos en queso tipo paria en la ciudad de Puno, para lo cual se tomaron tres muestras mayores a 100 gr cada uno de acuerdo a la NTP-ISO707 (1998) en los mercados laykakota, unión y dignidad, central y bellavista, expandidas en forma ambulatoria en la ciudad de Puno, los cuales se analizaron por triplicado, considerando positivos aquellas muestras que al menos resultaron positivos en dos repeticiones, sin considerar los dudosos.

Los resultados de dichos análisis se muestran en la Tabla a continuación:

Tabla 10

*Residuos de antibióticos en queso tipo paria expendida en la ciudad de Puno*

| Detección de<br>residuos de<br>antibióticos          | Muestras<br>analizadas | Positivos |       | Dudosos |      | Negativos |       |
|--|------------------------|-----------|-------|---------|------|-----------|-------|
|  |                        | Total     | %     | Total   | %    | Total     | %     |
| Queso tipo<br>paria (Mercado<br>Laykakota)           | 27                     | 2         | 7.41  | 0       | 0.00 | 25        | 92.59 |
| Queso tipo<br>paria (Mercado<br>Unión y<br>Dignidad) | 27                     | 3         | 11.11 | 2       | 7.41 | 22        | 81.48 |
| Queso tipo<br>paria (Mercado<br>Central)             | 27                     | 1         | 3.70  | 0       | 0.00 | 26        | 96.30 |
| Queso tipo<br>paria (Mercado<br>Bellavista)          | 27                     | 2         | 7.41  | 1       | 3.70 | 24        | 88.89 |

Los resultados que se muestran en Tabla precedente de presencia de residuos de antibióticos, detectados con la prueba microbiológica en la bacteria *B. subtilis* son: 7.41% en mercado laykakota, 11.11% en mercado unión y dignidad, 3.7% en mercado central y 7.41% en el mercado bellavista.

Es posible que los porcentajes bajos de presencia de residuos de antibióticos en las muestras procesadas, se deban a que los productores no utilizan frecuentemente antibióticos, porque sus animales al no ser de alta producción láctea, son menos susceptibles a infecciones, además el clima frío y seco del altiplano no permite el desarrollo de microorganismos y por ende las infecciones en animales son menores.

Pero aun así no es menos importante los porcentajes de presencia de antibióticos en queso tipo paria, expendidas en mercados y de forma ambulatoria en la ciudad de Puno, debido a los problemas que se presentan en la salud humana, cuando se consume queso y otros productos alimenticios que contiene penicilina, oxitetraciclina, tilosina y otros. En el mundo Samandoulougou *et al.* (2015) informa que entre los contaminantes químicos que se encuentran en los alimentos, los residuos de antibióticos ocupan un lugar destacado. Las infecciones serias transmitidas por los alimentos de proporciones epidemiológicas han sido reportadas globalmente en las últimas décadas, mostrando su importancia tanto para salud pública y plan social.

Otro aspecto importante Quizhpe, Encalada, & Sacoto (2014) refieren que la salud pública enfrenta una crisis global a causa de la resistencia bacteriana. Esta crisis tiene diversas dimensiones, todas igualmente importantes: sobre uso inapropiado de los antibióticos existentes que acelera exageradamente la resistencia; falta de disponibilidad de antibióticos efectivos para las poblaciones pobres y necesitadas; ausencia de innovación y desarrollo de nuevos antibióticos. Además Babapour, Azami, & Fartashmehr (2012), refieren que los antibióticos pueden influir en las culturas iniciales en la industria alimentaria y provocar daños económicos.

## CONCLUSIONES

- El mayor halo de inhibición para determinar la cantidad de antimicrobianos está influenciado directamente por el pH del medio del cultivo utilizado, la bacteria más sensible (*Bacillus subtilis*) y el tiempo de incubación.
- La concentración inhibitoria mínima en los tres antibióticos es 0.125  $\mu$ L y el mayor halo de inhibición está influenciado directamente por la bacteria utilizada, siendo la bacteria *Bacillus subtilis* que presenta la mayor sensibilidad.
- La especificidad y sensibilidad del método biológico es mayor al 90% así como también resulta adecuada para detectar presencia de penicilina, oxitetraciclina y tilosina en el queso tipo paria, utilizando la prueba biológica se detectó bajos porcentajes de residuos de antibióticos en queso tipo paria expandidas en mercados y en forma ambulatoria de la ciudad de Puno.

### RECOMENDACIONES

- Que se realice la revisión de las Normas Técnicas Peruanas y se especifiquen las cantidades de residuos de antimicrobianos permisibles en queso tipo paria y otros derivados de la leche.
- Que se realicen trabajos de investigación, utilizando otros microorganismos sensibles, determinando su especificidad y sensibilidad para detectar residuos de antibióticos en queso tipo paria y otros derivados de la leche.
- Que se realicen trabajos de investigación de determinación de cantidad de antibióticos en las diferentes cuencas lecheras de la región Puno con la metodología propuesta.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Acosta, S. M., Romero, M., & Tabora, G. (2014). Determinación de residuos de oxitetraciclina en muestras de carne bovina, 143–152. <https://doi.org/10.5944/educxx1.17.1.10708>
- Agudelo, N., Torres, M. M., Alvarez, C., & Vélez, L. M. (2015). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos, 23, 186–205. Retrieved from [alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/download/356/306](http://alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/download/356/306)
- Aguila, C. M. (2000). *Aplicación de una prueba microbiológica de detección de residuos de antibióticos en peces usando suero sanguíneo y músculo*. Universidad Austral de Chile. Retrieved from <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2000/fva283a/doc/fva283a.pdf>
- Aguilar, D. A. (2006). *Validación del “FAST” como método de “SCREENING” microbiológico para la pesquisa de residuos de antimicrobianos en productos de origen animal*. Universidad de Chile. Retrieved from <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/133788/Validación-del-fast-como-método-de-screening-microbiológico-para-la-pesquisa-de-residuos-de-antimicrobianos-en-productos-de-origen-animal.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Alpízar, Y. (2000). La penicilina y sus derivados como agentes desencadenantes de la respuesta inmune. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 16, 99–104. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/hih/v16n2/hih03200.pdf>
- Andino, F., & Castillo, Y. (2010). *Microbiología de los alimentos: Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria*. Lima, Perú: Universidad Nacional de Ingeniería.

- Retrieved from <https://avdiaz.files.wordpress.com/2010/02/documento-microbiologia.pdf>
- Aquiahuatl, M. de los A., & Pérez, M. de L. (2004). *Manual de prácticas del laboratorio de microbiología general* (1ra.). Iztapalapa, Mexico, D.F.: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Babapour, A., Azami, L., & Fartashmehr, J. (2012). Overview of antibiotic residues in beef and mutton in Ardebil, North West of Iran. *World Applied Sciences Journal*, 19, 1417–1422. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2012.19.10.1802>
- Barrera, A. M., & Ortez, E. M. (2012). *Determinación de residuos de antibióticos  $\beta$ -lactámicos y Tetraciclinas en leche cruda de cinco ganaderías ubicadas en el Municipio de San Luis Talpa y en leche pasteurizada*. Universidad de El Salvador. Retrieved from <http://ri.ues.edu.sv/2198/1/13101313.pdf>
- Belloso, W. H. (2002). Historia de los antibióticos. *Revista Del Hospital Italiano*, 7. Retrieved from <http://revista.hospitalitaliano.org.ar>
- Briones, P. G. (2005). *Detección de residuos de antimicrobianos, en leche bovina procesada, mediante Métodos de "SCREENING"*. Universidad de Chile. Retrieved from <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/130782/Detección-de-residuos-de-antimicrobianos-en-leche-bovina-procesada-mediante-métodos-de-screening.pdf?sequence=1>
- Brousett, M., Torres, A., Chambi, A., Mamani, B., & Gutiérrez, H. (2015). Calidad fisicoquímica, microbiológica y toxicológica de leche cruda en las cuencas ganaderas de la región Puno - Perú. *Scientia Agropecuaria*, 6, 165–176. Retrieved from <http://www.scielo.org.pe/pdf/agro/v6n3/a03v6n3.pdf>
- Cabrera, C. (2015). *Validación de método microbiológico cilindro en placa para determinación de la potencia de neomicina en producto farmacéutico triconjugado (neomicina, clotrimazol y betametasona)*. Universidad Católica de Manizales. Retrieved from <http://repositorio.ucm.edu.co:8080/jspui/bitstream/handle/10839/1244/CarolinaCabreraPazmino.pdf?sequence=1>
- Camacho, L. M., Cipriano, M., Cruz, B., Gutiérrez, I., Hernández, P. E., Peñaloza, I., &

- Nambo, O. (2010). Residuos de antibióticos en leche cruda comercializada en la región Tierra Caliente, de Guerrero, México. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 11, 1–12. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63613118006>
- Cancho, B., García, M. S., & Simal, J. (2000). El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3, 39–47. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=72430206>
- Cárdenas, D. M., & Asencios, D. G. (2008). *Evaluación de un método de ensayo microbiológico para determinar la potencia antibiótica de tirosina*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Retrieved from [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1217/1/Cardenas\\_sd.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1217/1/Cardenas_sd.pdf)
- Cavalieri, S. J., Harberk, R. J., McCarter, Y. S., Ortez, J. H., Rankin, I. D., Sautter, R. L., ... Spiegel, C. A. (2005). *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiano*. Seattle, Washington: University of Washington. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Manual+de+Pruebas+de+Susceptibilidad+Antimicrobiana#0>
- Cerón, M. F., Agudelo, E. J., & Maldonado, J. G. (2007). Relación entre el recuento de células somáticas individual o en tanque de leche y la prueba CMT en dos fincas lecheras del departamento de Antioquia (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 20, 472–483. Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-06902007000400006&lang=pt](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902007000400006&lang=pt)
- Cetraro, C. (2008). *Estudios de base*. Puno, Perú. Retrieved from [http://www.bibliotecacentral.uni.edu.pe/pdfs/IECOS/6,2008/art\\_006.pdf](http://www.bibliotecacentral.uni.edu.pe/pdfs/IECOS/6,2008/art_006.pdf)
- Chamorro, J., López, E. J., Astaiza, J. M., Benavides, C. J., & Hidalgo, A. (2010). Determinación de la calidad composicional y de residuos antibióticos betalactámicos en leche cruda expendida en el sector urbano del municipio de Ipiales. *Revista Universidad y Salud*, 1, 89–101. Retrieved from <http://revistas.udenar.edu.co/index.php/usalud/article/view/190/pdf>
- Cuevas, V., Espinosa, J. A., Flores, A. B., Romero, F., Vélez, A., Jolalpa, J. L., & Vázquez, R. (2007). Diagnóstico de la cadena productiva de leche de vaca en el

- estado de Hidalgo. *Tecnica Pecuaria En México*, 45, 25–40. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61345103>
- Dávila, N., & Hernández, J. E. (2006). Métodos de ensayos rápidos de detección de microorganismos en la leche, VII, 1–18. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63612753003>
- De la Fuente, N. M., & Barboza, J. E. (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal*, 20, 43–52. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/416/41613084005.pdf>
- Denobile, M., & Nascimento, E. de S. (2004). Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40, 209–218. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v40n2/10.pdf>
- Dianda, M. (2005). *Elaboración de quesos artesanales* (Segunda). Argentina: Hemisferio Sur S.A.
- Díez, V., Pérez, J. E., Olivera, M., Restrepo, J. G., & Villar, D. (2013). Evaluation of screening tests for antimicrobial residues in milk from individual cows treated with a combination of penicillins G and streptomycin, 8, 52–60. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321430040005>
- Early, R. (2000). *Tecnología de los productos lácteos*. Zaragoza, España: Acribia, S.A.
- Embid, A. (2000). Resistencia de las bacterias a los antibióticos. *Revista de Medicinas Complementarias, Medicina Holística.*, 15. Retrieved from <http://amcmh.org/PagAMC/medicina/articulospdf/53ResistenciaBacterias.pdf>
- Falcón, M. A. (2014). *Determinación de antibióticos en músculo e hígado de reses faenados en el camal municipal de Ambato*. Universidad Estatal de Bolívar. Retrieved from <http://dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/723/1/0.34.pdf>
- Fernández, A., García, C., Saéz, J. A., & Valdezate, S. (2010). Metodos de identificacion bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Procedimientos En Microbiología Clínica*, 1–52. Retrieved from

- <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
- Flores, C. (2015). Productores de leche triunfan en el sector agropecuario de la región Puno. *Los Andes*, p. 1. Retrieved from <http://www.losandes.com.pe/Nacional/20150511/88390.html>
- Gatica, C., & Gesche, E. (2007). “Método de las 5 placas” para la detección de residuos de antibacterianos en leche, *XVII*, 231–238. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95917304>
- Gesche, E., Madrid, E., & Aguila, C. (2001). Efecto del pH, cepa bacteriana y tipo de muestra, en la detección microbiológica, de ácido oxolínico y oxitetraciclina en peces, 10. Retrieved from [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-732X2001000100002](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2001000100002)
- González, I., Vega, J., & Castillo, R. (2002). Estudio de la calidad físico-químico de la leche entera de vaca en un sistema silvopastoril, *1*. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93911238004>
- Granados, R., & Villaverde, C. (2002). *Microbiología* (Segunda). Madrid, España: Paraninfo.
- Ibañez, V. (2009). *Análisis y Diseño de Experimentos*. Universitaria UNA - Puno.
- Lagunas, S., & Vega, L. F. (2013). *Manual de prácticas de laboratorio de bacteriología y micología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México*. Toluca, México. Retrieved from [http://veterinaria.uaemex.mx/\\_docs/607\\_970\\_MP Bacteriología y Micología.pdf](http://veterinaria.uaemex.mx/_docs/607_970_MP Bacteriología y Micología.pdf)
- León, V. E. (2013). *Validación del método artesanal propuesto por José Ducbach, para la detección de diferentes tipos de antibióticos en leche de fincas ganaderas de los cantones Cayambe y Pedro Moncayo*. Universidad Politécnica Salesiana. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/4062/6/UPS-YT00181.pdf>
- López, L., & Torres, C. (2006). *El tamaño, forma y tipos de agrupaciones bacterianas*. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. Retrieved from

- <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp6.pdf>
- López, M. A. (2011). *Niveles de cloruro de calcio líquido y en polvo en la elaboración de queso fresco pasteurizado de MARCO'S*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/900/1/27T069.pdf>
- Maluf, R., Castro, R., & Braga, A. (2012). Resíduos de antibióticos em leite. *SaBios: Rev. Saúde e Biol.*, 30–44. Retrieved from <http://www.revista.grupointegrado.br/sabios/>
- Máttar, S., Calderón, A., Sotelo, D., Sierra, M., & Tordecilla, G. (2009). Detección de antibióticos en leches: un problema de salud pública. *Revista de Salud Pública*, 11, 579–590. Retrieved from <http://www.scielosp.org/pdf/rsap/v11n4/v11n4a09.pdf>
- Mendía, E., & Barrientos, A. E. (2014). *Manual de prácticas de Microbiología I*. Guatemala. Retrieved from <https://microinmuno.files.wordpress.com/2014/01/manual-de-microbiologia-i-medicina-2014.pdf>
- MINAGRI. (2008). *Plan regional de desarrollo ganadero de Puno al 2015*. Puno, Perú. Retrieved from [http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con3\\_uibd.nsf/FA221753B21CAEF2052579520073EFBB/\\$FILE/plan\\_ganadero\\_2015.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con3_uibd.nsf/FA221753B21CAEF2052579520073EFBB/$FILE/plan_ganadero_2015.pdf)
- MINAGRI. (2015). *Ministerio de Agricultura y Riego - Sistema integrado de estadística agraria SIEA*. Lima, Perú. Retrieved from <http://infolactea.com/wp-content/uploads/2016/01/SIEA-SET-2015.pdf>
- MINCETUR. (2006). *Plan estratégico regional de exportación de Puno*. Puno, Perú. Retrieved from [https://www.mincetur.gob.pe/wp-content/uploads/documentos/comercio\\_exterior/Sites/Pecex/avance\\_regiones/Puno/PERX\\_puno.pdf](https://www.mincetur.gob.pe/wp-content/uploads/documentos/comercio_exterior/Sites/Pecex/avance_regiones/Puno/PERX_puno.pdf)
- Monroy, R., Linares, B., & Ramírez, X. S. (2015). Desarrollo de una técnica para la detección in vitro de la presencia de antibióticos en muestras de hígado de res , cerdo y pollo. *CienciaUAT*, 9, 68–73. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-78582015000100068](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-78582015000100068)

- Muñoz, K., Arango, G. J., & Jaramillo, M. C. (2014). Los antibióticos y su situación actual, *11*, 21–33. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/1698/169818259003.pdf>
- NTP-ISO707. (1998). *Leche y productos lácteos . Lineamientos para el muestreo*. Lima, Perú.
- NTP202.001. (2003). *Leche y productos lácteos. Leche cruda. Requisitos*. Lima, Perú. Retrieved from <http://infolactea.com/wp-content/uploads/2015/03/723.pdf>
- Olivas, E. (2012). *Manual de prácticas laboratorio de microbiología*. Juarez, México. Retrieved from <http://bivir.uacj.mx/Reserva/Documentos/rva2011296.pdf>
- Ordoñez, M. (2014). *Guías prácticas para los laboratorios de bacteriología clínica* (Editorial). Bogota Colombia: Medica Internacional LTDA.
- Orós, O. D. (2014). *Potencia antimicrobiana de la penicilina, tetraciclina y tilosina, inyectables de uso veterinario y sensibilidad contra cepas de staphylococcus spp y streptococcus spp aisladas en vacunos Puno*. Universidad Nacional del Altiplano.
- Ortiz, C., Concha, A., & Cayro, J. (2011). Recuento de células somáticas en leche contaminada con residuos de antibióticos. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, *22*, 151–154. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371838855011>
- Pardo, M., & Almanza, F. (2005). *Guía de procesos para la elaboración de productos lácteos*. Colombia: Quebecor World Bogotá S.A.
- Pasterán, F., & Galas, M. (2008). *Manual de Procedimientos. Sensibilidad a los antimicrobianos en Salmonella, Shigella y E. coli*. Retrieved from [http://bvs.panalimentos.org/local/File/manual\\_sensibilidad\\_salmshigecoli\\_2008.pdf](http://bvs.panalimentos.org/local/File/manual_sensibilidad_salmshigecoli_2008.pdf)
- Pellegrino, M. S., Frola, I. D., Odierno, L. M., & Bogni, C. I. (2011). Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de Staphylococcus aureus aisladas de leche. *Revista Electronica de Veterinaria*, *12*, 1–14. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63622567006>
- Pita, S., & Pértegas, S. (2003). Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y Especificidad.

- Retrieved from  
[http://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas\\_diagnosticas/pruebas\\_diagnosticas.asp#Tabla3](http://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas_diagnosticas/pruebas_diagnosticas.asp#Tabla3)
- Poggio, G., Gomes, A., Fonseca, J. A., Silva, R., Ribeiro, M., & Jager, L. M. (2009). Antibiotic residues in Brazilian UHT milk: a screening study. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29, 451–453. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/3959/395940092035.pdf>
- Prado, A., Rodríguez, G., Figueroa, I., & Shirai, K. (2013). *Manual de prácticas de laboratorio Microbiología de los alimentos*. Iztapalapa, Mexico, D.F.: Universidad Autónoma Metropolitana. Retrieved from <http://www.izt.uam.mx/ceu/publicaciones/MMBA/microalimentos.pdf>
- Quezada, N. (2010). *Estadística para ingenieros*. Lima, Perú: Macro.
- Quizhpe, A., Encalada, L., & Sacoto, A. (2014). *Uso apropiado de antibióticos y resistencia bacteriana*. Cuenca, Ecuador: Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Cuenca. Retrieved from <https://www.reactgroup.org/wp-content/uploads/2016/10/Uso-Apropiado-de-Antibioticos-y-Resistencia-Bacteriana.pdf>
- Reglamentos. (2010). *REGLAMENTO (UE) No 37/2010 DE LA COMISIÓN: Relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. Diario Oficial de la Unión Europea (Vol. 15)*. Union Europea. Retrieved from <https://www.boe.es/doue/2010/015/L00001-00072.pdf>
- Reyes, J., Villar, D., & Olivera, M. (2010). Evaluacion de residuos de antimicrobianos por la prueba Delvotest en una cuenca lechera de Antioquia con alto indice de mastitis subclinica., 11, 11. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63616936006>
- Robinson, R. K., & Wilbey, R. A. (2010). *Fabricación de Queso R. SCOTT (2° ed)*. Zaragoza, España: Editorial ACRIBIA, S.A.
- Romero del Castillo, R., & Mestres, J. (2004). *Productos lácteos Tecnología*. Barcelona, España: Ediciones UPC.

- Sabah, S. (2015). Diarrea asociada a antibióticos. *Revista Clínica Las Condes*, 26, 687–695. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/283954955\\_DIARREA\\_ASOCIADA\\_A\\_ANTIBIOTICOS](https://www.researchgate.net/publication/283954955_DIARREA_ASOCIADA_A_ANTIBIOTICOS)
- Salas, P., Calle, S., Falcón, N., Pinto, C., & Espinoza, J. (2013). Determinación de residuos de antibióticos betalactámicos mediante un ensayo inmunoenzimático en leche de vacas tratadas contra mastitis. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 24, 252–255. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371838875017>
- Samandoulougou, S., Ilboudo, A. J., Bagre, T. S., Tapsoba, F. W., Savadogo, A., Scippo, M. L., & Traore, A. S. (2015). Screening of antibiotics residues in beef consumed in Ouagadougou , Burkina Faso. *African Journal of Food Sciences*, 9, 367–371. <https://doi.org/10.5897/AJFS2015.1291>
- San Martín, B., Cañón, H., Quiróz, A., & Hernández, P. (2000). Comparación del método microbiológico con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en la detección de residuos de quinolonas y fluoroquinolonas en musculo de peces salmonideos, 15, 8. Retrieved from <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/122579/comparacion-del-metodo-microbiologico-con-cromatografia-liquida-de-alta-resolucion-HPLC.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sánchez, C. (2006). ¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana ...?, 2, 1–15. Retrieved from <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n2/sanchez.pdf>
- SENAMHI. (2011). *Mapas Balance hídrico superficial del Titicaca*. Lima, Perú. Retrieved from <http://www.senamhi.gob.pe/load/file/docTec-2013-balance-hidr-supe-titicaca-2011.pdf>
- Sotelo, A. (2011). Legado tecnológico transferido por la Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación – COSUDE , al sector lácteo , después de 46 años de presencia en el Perú, 1–37. Retrieved from [http://www.iheal.univ-paris3.fr/sites/www.iheal.univ-paris3.fr/files/12aCosude\\_lácteos.pdf](http://www.iheal.univ-paris3.fr/sites/www.iheal.univ-paris3.fr/files/12aCosude_lácteos.pdf)
- Sumano, H., & Ocampo, L. (2006). *Farmacología Veterinaria*. *Farmacología*

*Veterinaria* (Tercera Ed). Mexico: McGraw-Hill.

- Ujueta, S., & Araque, A. (2016). Detección de residuos antimicrobianos en músculo, hígado y riñón de cerdo expendidos en Bogotá, Colombia, 371–379. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v19n2/v19n2a14.pdf>
- Vargas, J. Y., & Vigo, S. H. (2016). *CHACHAPOYAS-PERÚ*. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas. Retrieved from [http://repositorio.untrm.edu.pe/bitstream/handle/UNTRM/1187/Tesis-Sandy\\_Vigo\\_portocarrero.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.untrm.edu.pe/bitstream/handle/UNTRM/1187/Tesis-Sandy_Vigo_portocarrero.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Vela, K. L., Tafur, M. A., Vela, M. P., & Suárez, M. C. (2014). Evaluación preliminar del bioensayo para la detección de antimicrobianos en músculo bovino. *Vitae*, 21, 178–190. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/1698/169833713003.pdf>
- Yamaki, M., Berruga, M. I., Althaus, R. L., Molina, P., & Molina, A. (2011). Screening of antibiotic residues in ewe milk destined to cheese by a commercial microbiological inhibition assay, (June 2016), 29. Retrieved from <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00578285/document>
- Yapuchura, A. (2006). *Producción y comercialización de truchas en el departamento de Puno y nuevo paradigma de producción*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Retrieved from [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/2674/1/Yapuchura\\_sa.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/2674/1/Yapuchura_sa.pdf)



**Anexo 1.** Especificaciones técnicas de Lyofast Y 456 B

Distribuidor par :

Z.A de Gesvrine – 4 rue Képler – B.P.4125  
44241 La Chapelle-sur-Erdre Cedex – France  
t. : +33 (0)2 40 93 53 53 | f. : +33 (0)2 40 93 41 00  
commercial@humeau.com



w w w . h u m e a u . c o m

## Lyofast Y 456 B

**Description** **Lyofast Y 456 B** consists of specifically selected strains of a mild acidifying *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and of a fast acidifying *Streptococcus thermophilus* which produces EPS enhancing viscosity, to ensure a uniform and controlled production of very mild set and stirred yoghurt with high viscosity.

**Application** Sprinkle the culture powder directly into process milk under aseptic conditions ensuring that the culture is well dispersed by gentle stirring. The following may be used as inoculation guidelines:

| Product            | UC/100 l | Product           | UC/100 l |
|--------------------|----------|-------------------|----------|
| Yoghurt, short set | 2.0-3.0  | Yoghurt, long set | 0.5-1.0  |

**Rotation** The recommended rotations are Y 450 B/Y 452 B.

**Acidification information** Standardised laboratory acidification test is conducted in milk powder, reconstituted at 9%, at defined temperature.  
Acidification profile: inoculation level corresponding to 1 UC per 100 litres milk.  
Standard activity: expressed as temperature/time/pH relations: 43°C/7 hours/pH 4.5 ± 0.15.

| Optimal temperature for growth | 43 °C  | Urease activity    | +           |
|--------------------------------|--------|--------------------|-------------|
| Acidification capability       | pH 4.0 | Texture formation  | 7 ± 1 sec/g |
| Aroma formation for yoghurt    | +(+)   | Post-acidification | Δ pH 0.3    |

**Culture information** Data are obtained under standardised laboratory conditions, and consequently, should be considered as guidelines.

**Storage** Unopened pouches should be kept below -17°C.

**Package data** The freeze-dried culture is packed in waterproof and airproof aluminium pouches. The packaging material is food grade. Lyofast Y 456 B is available in 10 and 50 UC.

M91Y456B/4/UK/0 Issue: 13/09/2010 Review: 4 of 19/08/2014 1/2

**Anexo 2.** Diámetro (mm) de halo de inhibición producido por la penicilina a diferentes tratamientos

| MICROORGANISMO | <i>Bacillus subtilis</i> |    |    |    |    |    | <i>Lactobacillus bulgaricus</i> |    |    |    |    |    | <i>Streptococcus thermophilus</i> |    |    |    |    |    |
|----------------|--------------------------|----|----|----|----|----|---------------------------------|----|----|----|----|----|-----------------------------------|----|----|----|----|----|
|                | 18                       |    |    | 24 |    |    | 18                              |    |    | 24 |    |    | 18                                |    |    | 24 |    |    |
| TIEMPO (Hrs)   | 6                        | 7  | 8  | 6  | 7  | 8  | 6                               | 7  | 8  | 6  | 7  | 8  | 6                                 | 7  | 8  | 6  | 7  | 8  |
| 1              | 0                        | 22 | 20 | 0  | 22 | 20 | 0                               | 21 | 18 | 0  | 21 | 19 | 0                                 | 19 | 18 | 0  | 19 | 19 |
| 2              | 0                        | 22 | 19 | 0  | 22 | 19 | 0                               | 19 | 16 | 0  | 19 | 16 | 0                                 | 19 | 19 | 0  | 20 | 19 |
| 3              | 0                        | 21 | 17 | 0  | 21 | 18 | 0                               | 20 | 14 | 0  | 21 | 15 | 0                                 | 19 | 16 | 0  | 19 | 16 |
| 4              | 0                        | 21 | 18 | 0  | 21 | 18 | 0                               | 18 | 17 | 0  | 18 | 17 | 0                                 | 18 | 17 | 0  | 18 | 18 |



**Anexo 3.** Análisis de varianza de halo de inhibición de penicilina a diferentes tratamientos

**Análisis de la varianza**

| Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|----|----------------|-------------------|------|
| Halo     | 72 | 0.99           | 0.99              | 6.80 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.                | SC      | gl | CM      | F       | p-valor |
|---------------------|---------|----|---------|---------|---------|
| Modelo.             | 5794.83 | 20 | 289.74  | 398.92  | <0.0001 |
| Bacterias           | 25.33   | 2  | 12.67   | 17.44   | <0.0001 |
| Tiempo              | 0.68    | 1  | 0.68    | 0.94    | 0.3376  |
| pH                  | 5730.25 | 2  | 2865.13 | 3944.78 | <0.0001 |
| Bloque              | 15.71   | 3  | 5.24    | 7.21    | 0.0004  |
| Bacterias*Tiempo    | 0.11    | 2  | 0.06    | 0.08    | 0.9265  |
| Bacterias*pH        | 22.17   | 4  | 5.54    | 7.63    | 0.0001  |
| Tiempo*pH           | 0.53    | 2  | 0.26    | 0.36    | 0.6971  |
| Bacterias*Tiempo*pH | 0.06    | 4  | 0.01    | 0.02    | 0.9993  |
| Error               | 37.04   | 51 | 0.73    |         |         |
| Total               | 5831.87 | 71 |         |         |         |

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.49390**

Error: 0.7263 gl: 51

| Bacterias       | Medias | n  | E.E. |   |
|-----------------|--------|----|------|---|
| B. subtilis     | 13.38  | 24 | 0.17 | A |
| S. thermophilus | 12.21  | 24 | 0.17 | B |
| L. bulgaricus   | 12.04  | 24 | 0.17 | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.40327**

Error: 0.7263 gl: 51

| Tiempo    | Medias | n  | E.E. |   |
|-----------|--------|----|------|---|
| A 24 Hrs. | 12.64  | 36 | 0.14 | A |
| A 18 Hrs. | 12.44  | 36 | 0.14 | A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.49390**

Error: 0.7263 gl: 51

| pH   | Medias | n  | E.E. |   |
|------|--------|----|------|---|
| pH 7 | 20.00  | 24 | 0.17 | A |
| pH 8 | 17.63  | 24 | 0.17 | B |
| pH 6 | 0.00   | 24 | 0.17 | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.69849**

Error: 0.7263 gl: 51

| Bacterias       | Tiempo    | Medias | n  | E.E. |   |
|-----------------|-----------|--------|----|------|---|
| B. subtilis     | A 24 Hrs. | 13.42  | 12 | 0.25 | A |
| B. subtilis     | A 18 Hrs. | 13.33  | 12 | 0.25 | A |
| S. thermophilus | A 24 Hrs. | 12.33  | 12 | 0.25 | B |
| L. bulgaricus   | A 24 Hrs. | 12.17  | 12 | 0.25 | B |
| S. thermophilus | A 18 Hrs. | 12.08  | 12 | 0.25 | B |
| L. bulgaricus   | A 18 Hrs. | 11.92  | 12 | 0.25 | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.85547**

Error: 0.7263 gl: 51

| Bacterias       | pH   | Medias | n | E.E. |   |   |   |   |   |
|-----------------|------|--------|---|------|---|---|---|---|---|
| B. subtilis     | pH 7 | 21.50  | 8 | 0.30 | A |   |   |   |   |
| L. bulgaricus   | pH 7 | 19.63  | 8 | 0.30 |   | B |   |   |   |
| S. thermophilus | pH 7 | 18.88  | 8 | 0.30 |   | B |   |   |   |
| B. subtilis     | pH 8 | 18.63  | 8 | 0.30 |   |   | C |   |   |
| S. thermophilus | pH 8 | 17.75  | 8 | 0.30 |   |   |   | D |   |
| L. bulgaricus   | pH 8 | 16.50  | 8 | 0.30 |   |   |   |   | E |
| L. bulgaricus   | pH 6 | 0.00   | 8 | 0.30 |   |   |   |   | F |
| B. subtilis     | pH 6 | 0.00   | 8 | 0.30 |   |   |   |   | F |
| S. thermophilus | pH 6 | 0.00   | 8 | 0.30 |   |   |   |   | F |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.69849**

Error: 0.7263 gl: 51

| Tiempo    | pH   | Medias | n  | E.E. |   |
|-----------|------|--------|----|------|---|
| A 24 Hrs. | pH 7 | 20.08  | 12 | 0.25 | A |
| A 18 Hrs. | pH 7 | 19.92  | 12 | 0.25 | A |
| A 24 Hrs. | pH 8 | 17.83  | 12 | 0.25 | B |
| A 18 Hrs. | pH 8 | 17.42  | 12 | 0.25 | B |
| A 24 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 12 | 0.25 | C |
| A 18 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 12 | 0.25 | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1.20981**

Error: 0.7263 gl: 51

| Bacterias       | Tiempo    | pH   | Medias | n | E.E. |   |
|-----------------|-----------|------|--------|---|------|---|
| B. subtilis     | A 24 Hrs. | pH 7 | 21.50  | 4 | 0.43 | A |
| B. subtilis     | A 18 Hrs. | pH 7 | 21.50  | 4 | 0.43 | A |
| L. bulgaricus   | A 24 Hrs. | pH 7 | 19.75  | 4 | 0.43 | B |
| L. bulgaricus   | A 18 Hrs. | pH 7 | 19.50  | 4 | 0.43 | B |
| S. thermophilus | A 24 Hrs. | pH 7 | 19.00  | 4 | 0.43 | B |
| S. thermophilus | A 18 Hrs. | pH 7 | 18.75  | 4 | 0.43 | B |
| B. subtilis     | A 24 Hrs. | pH 8 | 18.75  | 4 | 0.43 | B |
| B. subtilis     | A 18 Hrs. | pH 8 | 18.50  | 4 | 0.43 | B |
| S. thermophilus | A 24 Hrs. | pH 8 | 18.00  | 4 | 0.43 | C |
| S. thermophilus | A 18 Hrs. | pH 8 | 17.50  | 4 | 0.43 | C |
| L. bulgaricus   | A 24 Hrs. | pH 8 | 16.75  | 4 | 0.43 | C |
| L. bulgaricus   | A 18 Hrs. | pH 8 | 16.25  | 4 | 0.43 | C |
| L. bulgaricus   | A 18 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 4 | 0.43 | D |
| L. bulgaricus   | A 24 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 4 | 0.43 | D |
| B. subtilis     | A 18 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 4 | 0.43 | D |
| B. subtilis     | A 24 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 4 | 0.43 | D |
| S. thermophilus | A 24 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 4 | 0.43 | D |
| S. thermophilus | A 18 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 4 | 0.43 | D |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )



**Anexo 4.** Diámetro (mm) de halo de inhibición producido por la oxitetraciclina a diferentes tratamientos

| MICROORGANISMO | <i>Bacillus subtilis</i> |    |    |    |    |    | <i>Lactobacillus bulgaricus</i> |    |    |    |    |    | <i>Streptococcus thermophilus</i> |    |    |    |    |    |
|----------------|--------------------------|----|----|----|----|----|---------------------------------|----|----|----|----|----|-----------------------------------|----|----|----|----|----|
|                | 18                       |    |    | 24 |    |    | 18                              |    |    | 24 |    |    | 18                                |    |    | 24 |    |    |
| TIEMPO (Hrs)   | 6                        | 7  | 8  | 6  | 7  | 8  | 6                               | 7  | 8  | 6  | 7  | 8  | 6                                 | 7  | 8  | 6  | 7  | 8  |
| 1              | 0                        | 19 | 19 | 0  | 19 | 20 | 0                               | 19 | 17 | 0  | 19 | 17 | 0                                 | 16 | 15 | 0  | 17 | 16 |
| 2              | 0                        | 18 | 17 | 0  | 18 | 17 | 0                               | 17 | 16 | 0  | 17 | 16 | 0                                 | 14 | 14 | 0  | 14 | 15 |
| 3              | 0                        | 17 | 19 | 0  | 18 | 19 | 0                               | 18 | 18 | 0  | 18 | 19 | 0                                 | 14 | 14 | 0  | 14 | 14 |
| 4              | 0                        | 20 | 18 | 0  | 20 | 18 | 0                               | 15 | 18 | 0  | 16 | 18 | 0                                 | 14 | 13 | 0  | 14 | 14 |



**Anexo 5. Análisis de varianza de halo de inhibición de oxitetraciclina a diferentes tratamientos**

**Análisis de la varianza**

| Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|----|----------------|-------------------|------|
| Halo     | 72 | 0.99           | 0.99              | 7.86 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.                | SC      | gl | CM      | F       | p-valor |
|---------------------|---------|----|---------|---------|---------|
| Modelo.             | 4661.83 | 20 | 233.09  | 301.38  | <0.0001 |
| Bacterias           | 90.78   | 2  | 45.39   | 58.69   | <0.0001 |
| Tiempo              | 0.89    | 1  | 0.89    | 1.15    | 0.2887  |
| pH                  | 4511.69 | 2  | 2255.85 | 2916.72 | <0.0001 |
| Bloque              | 12.06   | 3  | 4.02    | 5.20    | 0.0033  |
| Bacterias*Tiempo    | 0.11    | 2  | 0.06    | 0.07    | 0.9308  |
| Bacterias*pH        | 45.56   | 4  | 11.39   | 14.73   | <0.0001 |
| Tiempo*pH           | 0.53    | 2  | 0.26    | 0.34    | 0.7125  |
| Bacterias*Tiempo*pH | 0.22    | 4  | 0.06    | 0.07    | 0.9903  |
| Error               | 39.44   | 51 | 0.77    |         |         |
| Total               | 4701.28 | 71 |         |         |         |

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.50967**

Error: 0.7734 gl: 51

| Bacterias       | Medias | n  | E.E. |   |
|-----------------|--------|----|------|---|
| B. subtilis     | 12.33  | 24 | 0.18 | A |
| L. bulgaricus   | 11.58  | 24 | 0.18 | B |
| S. thermophilus | 9.67   | 24 | 0.18 | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.41615**

Error: 0.7734 gl: 51

| Tiempo    | Medias | n  | E.E. |   |
|-----------|--------|----|------|---|
| A 24 Hrs. | 11.31  | 36 | 0.15 | A |
| A 18 Hrs. | 11.08  | 36 | 0.15 | A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.50967**

Error: 0.7734 gl: 51

| pH   | Medias | n  | E.E. |   |
|------|--------|----|------|---|
| pH 7 | 16.88  | 24 | 0.18 | A |
| pH 8 | 16.71  | 24 | 0.18 | A |
| pH 6 | 0.00   | 24 | 0.18 | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.72079**

Error: 0.7734 gl: 51

| Bacterias       | Tiempo    | Medias | n  | E.E. |     |
|-----------------|-----------|--------|----|------|-----|
| B. subtilis     | A 24 Hrs. | 12.42  | 12 | 0.25 | A   |
| B. subtilis     | A 18 Hrs. | 12.25  | 12 | 0.25 | A B |
| L. bulgaricus   | A 24 Hrs. | 11.67  | 12 | 0.25 | B C |
| L. bulgaricus   | A 18 Hrs. | 11.50  | 12 | 0.25 | C   |
| S. thermophilus | A 24 Hrs. | 9.83   | 12 | 0.25 | D   |
| S. thermophilus | A 18 Hrs. | 9.50   | 12 | 0.25 | D   |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.88278**

Error: 0.7734 gl: 51

| Bacterias       | pH   | Medias | n | E.E. |   |
|-----------------|------|--------|---|------|---|
| B. subtilis     | pH 7 | 18.63  | 8 | 0.31 | A |
| B. subtilis     | pH 8 | 18.38  | 8 | 0.31 | A |
| L. bulgaricus   | pH 8 | 17.38  | 8 | 0.31 | B |
| L. bulgaricus   | pH 7 | 17.38  | 8 | 0.31 | B |
| S. thermophilus | pH 7 | 14.63  | 8 | 0.31 | C |
| S. thermophilus | pH 8 | 14.38  | 8 | 0.31 | C |
| S. thermophilus | pH 6 | 0.00   | 8 | 0.31 | D |
| B. subtilis     | pH 6 | 0.00   | 8 | 0.31 | D |
| L. bulgaricus   | pH 6 | 0.00   | 8 | 0.31 | D |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.72079**

Error: 0.7734 gl: 51

| Tiempo    | pH   | Medias | n  | E.E. |   |
|-----------|------|--------|----|------|---|
| A 24 Hrs. | pH 7 | 17.00  | 12 | 0.25 | A |
| A 24 Hrs. | pH 8 | 16.92  | 12 | 0.25 | A |
| A 18 Hrs. | pH 7 | 16.75  | 12 | 0.25 | A |
| A 18 Hrs. | pH 8 | 16.50  | 12 | 0.25 | A |
| A 24 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 12 | 0.25 | B |
| A 18 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 12 | 0.25 | B |

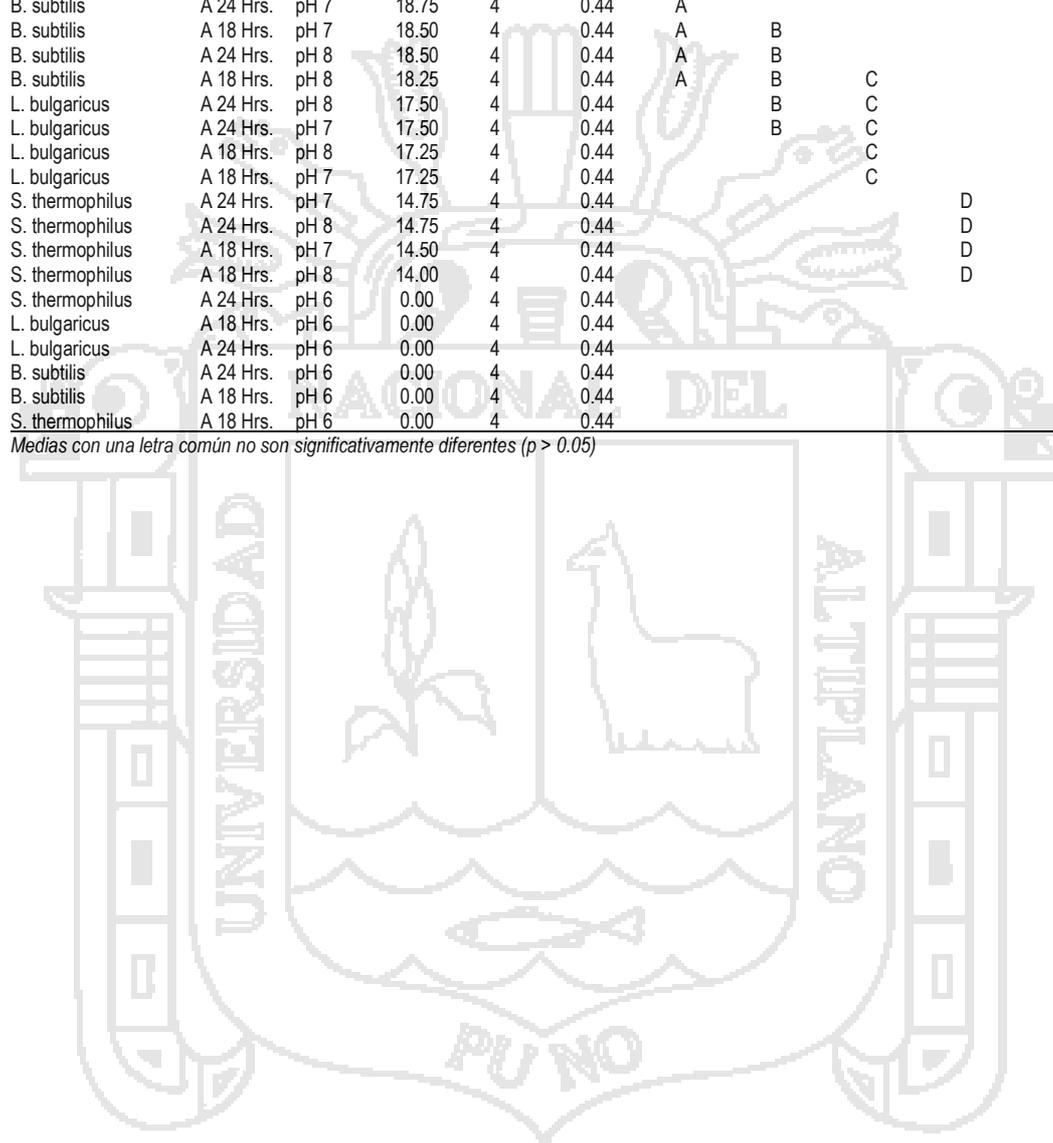
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1.24844**

Error: 0.7734 gl: 51

| Bacterias       | Tiempo    | pH   | Medias | n | E.E. |   |   |   |   |
|-----------------|-----------|------|--------|---|------|---|---|---|---|
| B. subtilis     | A 24 Hrs. | pH 7 | 18.75  | 4 | 0.44 | A |   |   |   |
| B. subtilis     | A 18 Hrs. | pH 7 | 18.50  | 4 | 0.44 | A | B |   |   |
| B. subtilis     | A 24 Hrs. | pH 8 | 18.50  | 4 | 0.44 | A | B |   |   |
| B. subtilis     | A 18 Hrs. | pH 8 | 18.25  | 4 | 0.44 | A | B | C |   |
| L. bulgaricus   | A 24 Hrs. | pH 8 | 17.50  | 4 | 0.44 |   | B | C |   |
| L. bulgaricus   | A 24 Hrs. | pH 7 | 17.50  | 4 | 0.44 |   | B | C |   |
| L. bulgaricus   | A 18 Hrs. | pH 8 | 17.25  | 4 | 0.44 |   |   | C |   |
| L. bulgaricus   | A 18 Hrs. | pH 7 | 17.25  | 4 | 0.44 |   |   | C |   |
| S. thermophilus | A 24 Hrs. | pH 7 | 14.75  | 4 | 0.44 |   |   |   | D |
| S. thermophilus | A 24 Hrs. | pH 8 | 14.75  | 4 | 0.44 |   |   |   | D |
| S. thermophilus | A 18 Hrs. | pH 7 | 14.50  | 4 | 0.44 |   |   |   | D |
| S. thermophilus | A 18 Hrs. | pH 8 | 14.00  | 4 | 0.44 |   |   |   | D |
| S. thermophilus | A 24 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 4 | 0.44 |   |   |   | E |
| L. bulgaricus   | A 18 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 4 | 0.44 |   |   |   | E |
| L. bulgaricus   | A 24 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 4 | 0.44 |   |   |   | E |
| B. subtilis     | A 24 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 4 | 0.44 |   |   |   | E |
| B. subtilis     | A 18 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 4 | 0.44 |   |   |   | E |
| S. thermophilus | A 18 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 4 | 0.44 |   |   |   | E |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )



**Anexo 6.** Diámetro (mm) de halo de inhibición producido por la tilosina a diferentes tratamientos

| MICROORGANISMO | <i>Bacillus subtilis</i> |    |    |    |    |    | <i>Lactobacillus bulgaricus</i> |    |    |    |    |    | <i>Streptococcus thermophilus</i> |    |    |    |    |    |
|----------------|--------------------------|----|----|----|----|----|---------------------------------|----|----|----|----|----|-----------------------------------|----|----|----|----|----|
|                | 18                       |    |    | 24 |    |    | 18                              |    |    | 24 |    |    | 18                                |    |    | 24 |    |    |
| TIEMPO (Hrs)   | 6                        | 7  | 8  | 6  | 7  | 8  | 6                               | 7  | 8  | 6  | 7  | 8  | 6                                 | 7  | 8  | 6  | 7  | 8  |
| 1              | 0                        | 17 | 14 | 0  | 17 | 14 | 0                               | 12 | 11 | 0  | 12 | 11 | 0                                 | 11 | 10 | 0  | 11 | 11 |
| 2              | 0                        | 16 | 14 | 0  | 16 | 14 | 0                               | 13 | 11 | 0  | 13 | 12 | 0                                 | 10 | 10 | 0  | 10 | 10 |
| 3              | 0                        | 17 | 15 | 0  | 17 | 15 | 0                               | 12 | 12 | 0  | 13 | 12 | 0                                 | 12 | 10 | 0  | 12 | 10 |
| 4              | 0                        | 16 | 14 | 0  | 17 | 14 | 0                               | 12 | 11 | 0  | 12 | 11 | 0                                 | 11 | 10 | 0  | 11 | 10 |



**Anexo 7.** Análisis de varianza de halo de inhibición de tilosina a diferentes tratamientos

**Análisis de la varianza**

| Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|----|----------------|-------------------|------|
| Halo     | 72 | 1.00           | 1.00              | 5.02 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.                | SC      | gl | CM      | F       | p-valor |
|---------------------|---------|----|---------|---------|---------|
| Modelo.             | 2786.39 | 20 | 139.32  | 779.85  | <0.0001 |
| Bacterias           | 135.75  | 2  | 67.88   | 379.93  | <0.0001 |
| Tiempo              | 0.22    | 1  | 0.22    | 1.24    | 0.2699  |
| pH                  | 2574.33 | 2  | 1287.17 | 7204.99 | <0.0001 |
| Bloque              | 2.39    | 3  | 0.80    | 4.46    | 0.0074  |
| Bacterias*Tiempo    | 0.03    | 2  | 0.01    | 0.08    | 0.9253  |
| Bacterias*pH        | 73.42   | 4  | 18.35   | 102.74  | <0.0001 |
| Tiempo*pH           | 0.11    | 2  | 0.06    | 0.31    | 0.7341  |
| Bacterias*Tiempo*pH | 0.14    | 4  | 0.03    | 0.19    | 0.9402  |
| Error               | 9.11    | 51 | 0.18    |         |         |
| Total               | 2795.50 | 71 |         |         |         |

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.24495**

Error: 0.1786 gl: 51

| Bacterias       | Medias | n  | E.E. |   |
|-----------------|--------|----|------|---|
| B. subtilis     | 10.29  | 24 | 0.09 | A |
| L. bulgaricus   | 7.92   | 24 | 0.09 | B |
| S. thermophilus | 7.04   | 24 | 0.09 | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.20000**

Error: 0.1786 gl: 51

| Tiempo    | Medias | n  | E.E. |   |
|-----------|--------|----|------|---|
| A 24 Hrs. | 8.47   | 36 | 0.07 | A |
| A 18 Hrs. | 8.36   | 36 | 0.07 | A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.24495**

Error: 0.1786 gl: 51

| pH   | Medias | n  | E.E. |   |
|------|--------|----|------|---|
| pH 7 | 13.33  | 24 | 0.09 | A |
| pH 8 | 11.92  | 24 | 0.09 | B |
| pH 6 | 0.00   | 24 | 0.09 | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.34642**

Error: 0.1786 gl: 51

| Bacterias       | Tiempo    | Medias | n  | E.E. |   |
|-----------------|-----------|--------|----|------|---|
| B. subtilis     | A 24 Hrs. | 10.33  | 12 | 0.12 | A |
| B. subtilis     | A 18 Hrs. | 10.25  | 12 | 0.12 | A |
| L. bulgaricus   | A 24 Hrs. | 8.00   | 12 | 0.12 | B |
| L. bulgaricus   | A 18 Hrs. | 7.83   | 12 | 0.12 | B |
| S. thermophilus | A 24 Hrs. | 7.08   | 12 | 0.12 | C |
| S. thermophilus | A 18 Hrs. | 7.00   | 12 | 0.12 | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.42427**

Error: 0.1786 gl: 51

| Bacterias       | pH   | Medias | n | E.E. |   |
|-----------------|------|--------|---|------|---|
| B. subtilis     | pH 7 | 16.63  | 8 | 0.15 | A |
| B. subtilis     | pH 8 | 14.25  | 8 | 0.15 | B |
| L. bulgaricus   | pH 7 | 12.38  | 8 | 0.15 | C |
| L. bulgaricus   | pH 8 | 11.38  | 8 | 0.15 | D |
| S. thermophilus | pH 7 | 11.00  | 8 | 0.15 | D |
| S. thermophilus | pH 8 | 10.13  | 8 | 0.15 | E |
| B. subtilis     | pH 6 | 0.00   | 8 | 0.15 | F |
| S. thermophilus | pH 6 | 0.00   | 8 | 0.15 | F |
| L. bulgaricus   | pH 6 | 0.00   | 8 | 0.15 | F |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.34642**

Error: 0.1786 gl: 51

| Tiempo | pH | Medias | n | E.E. |
|--------|----|--------|---|------|
|--------|----|--------|---|------|

|           |      |       |    |      |   |   |   |
|-----------|------|-------|----|------|---|---|---|
| A 24 Hrs. | pH 7 | 13.42 | 12 | 0.12 | A |   |   |
| A 18 Hrs. | pH 7 | 13.25 | 12 | 0.12 | A |   |   |
| A 24 Hrs. | pH 8 | 12.00 | 12 | 0.12 |   | B |   |
| A 18 Hrs. | pH 8 | 11.83 | 12 | 0.12 |   | B |   |
| A 24 Hrs. | pH 6 | 0.00  | 12 | 0.12 |   |   | C |
| A 18 Hrs. | pH 6 | 0.00  | 12 | 0.12 |   |   | C |

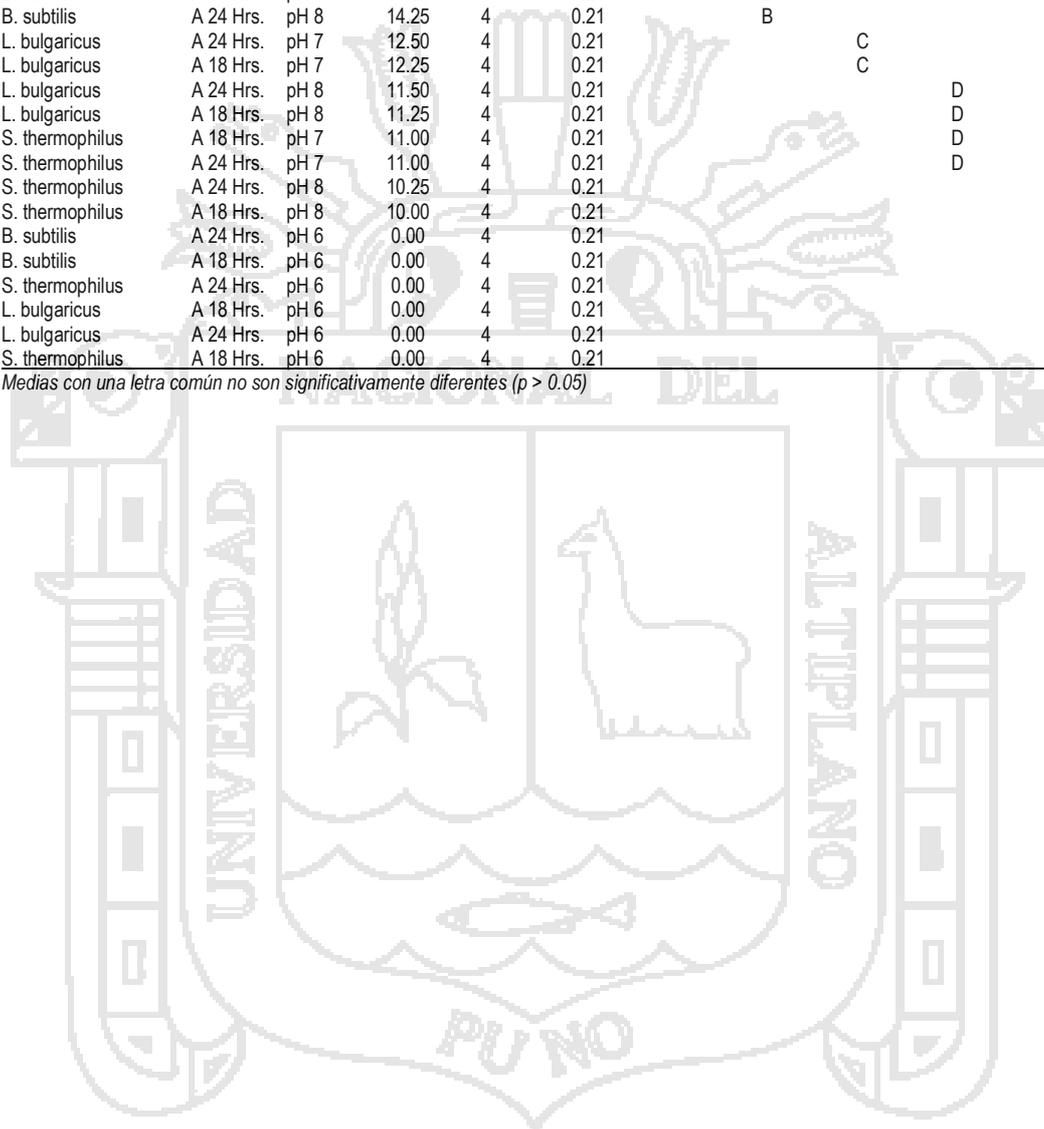
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.60001

Error: 0.1786 gl: 51

| Bacterias       | Tiempo    | pH   | Medias | n | E.E. |   |   |   |   |
|-----------------|-----------|------|--------|---|------|---|---|---|---|
| B. subtilis     | A 24 Hrs. | pH 7 | 16.75  | 4 | 0.21 | A |   |   |   |
| B. subtilis     | A 18 Hrs. | pH 7 | 16.50  | 4 | 0.21 | A |   |   |   |
| B. subtilis     | A 18 Hrs. | pH 8 | 14.25  | 4 | 0.21 |   | B |   |   |
| B. subtilis     | A 24 Hrs. | pH 8 | 14.25  | 4 | 0.21 |   | B |   |   |
| L. bulgaricus   | A 24 Hrs. | pH 7 | 12.50  | 4 | 0.21 |   |   | C |   |
| L. bulgaricus   | A 18 Hrs. | pH 7 | 12.25  | 4 | 0.21 |   |   | C |   |
| L. bulgaricus   | A 24 Hrs. | pH 8 | 11.50  | 4 | 0.21 |   |   |   | D |
| L. bulgaricus   | A 18 Hrs. | pH 8 | 11.25  | 4 | 0.21 |   |   |   | D |
| S. thermophilus | A 18 Hrs. | pH 7 | 11.00  | 4 | 0.21 |   |   |   | D |
| S. thermophilus | A 24 Hrs. | pH 7 | 11.00  | 4 | 0.21 |   |   |   | D |
| S. thermophilus | A 24 Hrs. | pH 8 | 10.25  | 4 | 0.21 |   |   |   | E |
| S. thermophilus | A 18 Hrs. | pH 8 | 10.00  | 4 | 0.21 |   |   |   | E |
| B. subtilis     | A 24 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 4 | 0.21 |   |   |   | F |
| B. subtilis     | A 18 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 4 | 0.21 |   |   |   | F |
| S. thermophilus | A 24 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 4 | 0.21 |   |   |   | F |
| L. bulgaricus   | A 18 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 4 | 0.21 |   |   |   | F |
| L. bulgaricus   | A 24 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 4 | 0.21 |   |   |   | F |
| S. thermophilus | A 18 Hrs. | pH 6 | 0.00   | 4 | 0.21 |   |   |   | F |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )



**Anexo 8.** Evaluación de la curvatura del diseño factorial para *Bacillus subtilis*

**Diseño factorial completo**

Factores: 2    Diseño de la base:                    2; 4  
Corridas: 9    Réplicas:    1  
Bloques: 1    Puntos centrales (total):                    5

**Regresión factorial: Penicilina vs. Tiempo; pH; PtCentral**

Análisis de Varianza

| Fuente                      | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|-----------------------------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Modelo                      | 4  | 708.756   | 177.189   | 885.94  | 0.000   |
| Lineal                      | 2  | 306.500   | 153.250   | 766.25  | 0.000   |
| Tiempo                      | 1  | 0.250     | 0.250     | 1.25    | 0.326   |
| pH                          | 1  | 306.250   | 306.250   | 1531.25 | 0.000   |
| Interacciones de 2 términos | 1  | 0.250     | 0.250     | 1.25    | 0.326   |
| Tiempo*pH                   | 1  | 0.250     | 0.250     | 1.25    | 0.326   |
| Curvatura                   | 1  | 402.006   | 402.006   | 2010.03 | 0.000   |
| Error                       | 4  | 0.800     | 0.200     |         |         |
| Total                       | 8  | 709.556   |           |         |         |

**Regresión factorial: Oxitetraciclina vs. Tiempo; pH; PtCentral**

Análisis de Varianza

| Fuente                      | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|-----------------------------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Modelo                      | 4  | 484.800   | 121.200   | 404.00  | 0.000   |
| Lineal                      | 2  | 196.000   | 98.000    | 326.67  | 0.000   |
| Tiempo                      | 1  | 0.000     | 0.000     | 0.00    | 1.000   |
| pH                          | 1  | 196.000   | 196.000   | 653.33  | 0.000   |
| Interacciones de 2 términos | 1  | 0.000     | 0.000     | 0.00    | 1.000   |
| Tiempo*pH                   | 1  | 0.000     | 0.000     | 0.00    | 1.000   |
| Curvatura                   | 1  | 288.800   | 288.800   | 962.67  | 0.000   |
| Error                       | 4  | 1.200     | 0.300     |         |         |
| Total                       | 8  | 486.000   |           |         |         |

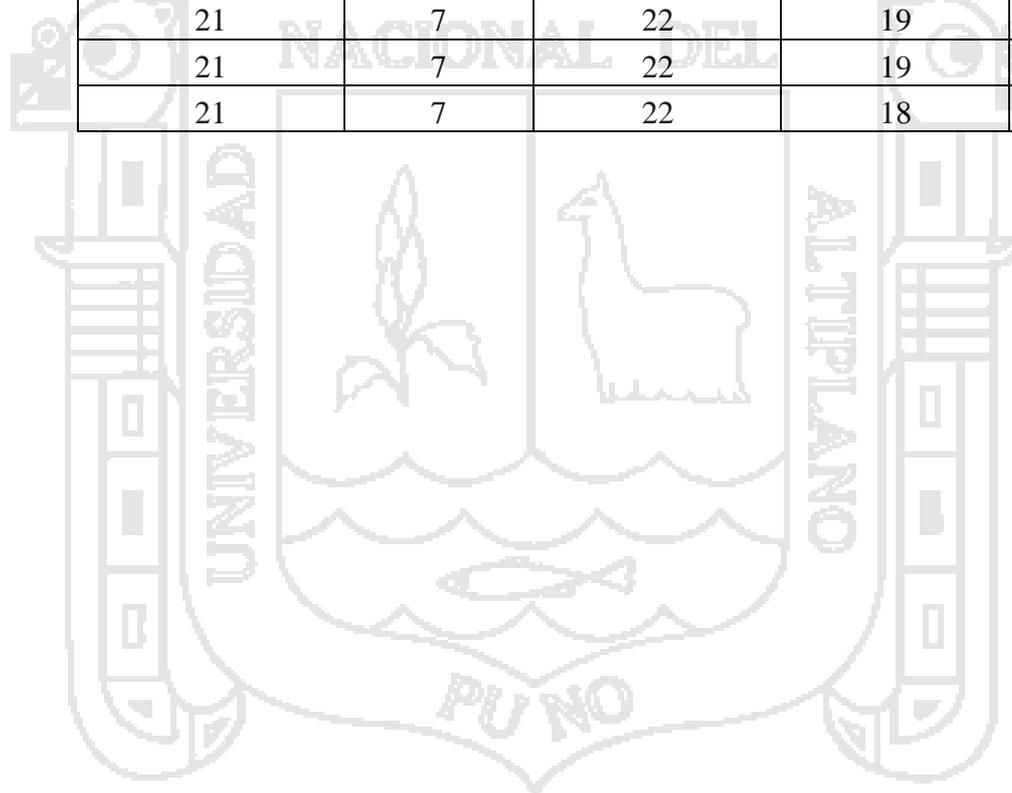
**Regresión factorial: Tilosina vs. Tiempo; pH; PtCentral**

Análisis de Varianza

| Fuente                      | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|-----------------------------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Modelo                      | 4  | 366.222   | 91.556    | 183.11  | 0.000   |
| Lineal                      | 2  | 132.500   | 66.250    | 132.50  | 0.000   |
| Tiempo                      | 1  | 0.250     | 0.250     | 0.50    | 0.519   |
| pH                          | 1  | 132.250   | 132.250   | 264.50  | 0.000   |
| Interacciones de 2 términos | 1  | 0.250     | 0.250     | 0.50    | 0.519   |
| Tiempo*pH                   | 1  | 0.250     | 0.250     | 0.50    | 0.519   |
| Curvatura                   | 1  | 233.472   | 233.472   | 466.94  | 0.000   |
| Error                       | 4  | 2.000     | 0.500     |         |         |
| Total                       | 8  | 368.222   |           |         |         |

**Anexo 9.** Diámetro (mm) de halo de inhibición producido por la penicilina, oxitetraciclina y tilosina a diferentes tratamientos

| <i>B. subtilis</i> |      |            |                 |          |
|--------------------|------|------------|-----------------|----------|
| Tiempo             | pH   | Penicilina | Oxitetraciclina | Tilosina |
| 18                 | 6    | 0          | 0               | 0        |
| 24                 | 6    | 0          | 0               | 0        |
| 18                 | 8    | 17         | 14              | 11       |
| 24                 | 8    | 18         | 14              | 12       |
| 16.76              | 7    | 22         | 18              | 15       |
| 25.24              | 7    | 23         | 18              | 16       |
| 21                 | 5.59 | 0          | 0               | 0        |
| 21                 | 8.41 | 15         | 13              | 12       |
| 21                 | 7    | 22         | 18              | 16       |
| 21                 | 7    | 23         | 18              | 15       |
| 21                 | 7    | 22         | 19              | 16       |
| 21                 | 7    | 22         | 19              | 16       |
| 21                 | 7    | 22         | 18              | 17       |



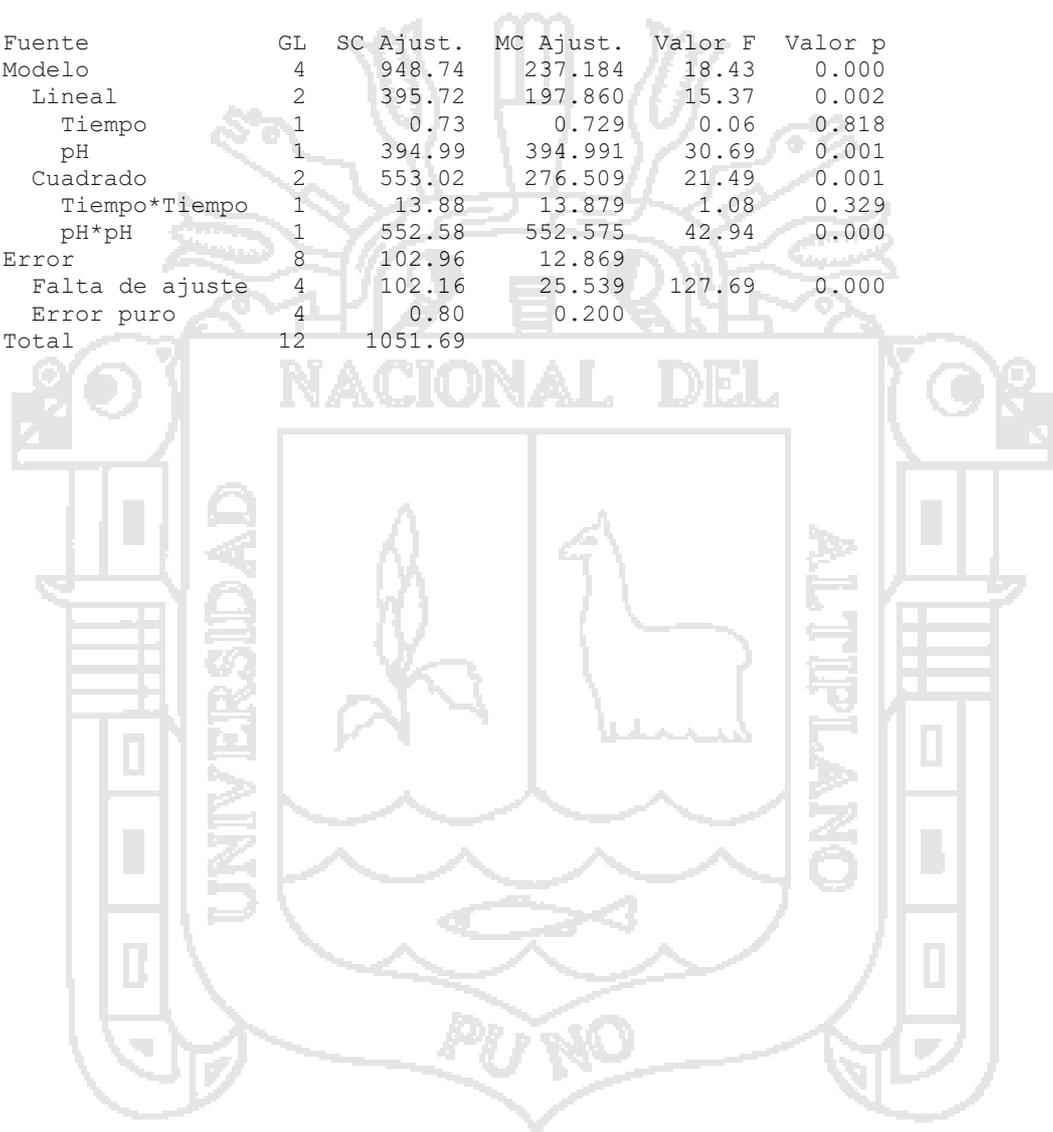
**Anexo 10.** Análisis de varianza para determinar el rango óptimo del tratamiento para penicilina

**Gráficas de residuos para Penicilina**

**Regresión de superficie de respuesta: Penicilina vs. Tiempo; pH**

Análisis de Varianza

| Fuente          | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|-----------------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Modelo          | 4  | 948.74    | 237.184   | 18.43   | 0.000   |
| Lineal          | 2  | 395.72    | 197.860   | 15.37   | 0.002   |
| Tiempo          | 1  | 0.73      | 0.729     | 0.06    | 0.818   |
| pH              | 1  | 394.99    | 394.991   | 30.69   | 0.001   |
| Cuadrado        | 2  | 553.02    | 276.509   | 21.49   | 0.001   |
| Tiempo*Tiempo   | 1  | 13.88     | 13.879    | 1.08    | 0.329   |
| pH*pH           | 1  | 552.58    | 552.575   | 42.94   | 0.000   |
| Error           | 8  | 102.96    | 12.869    |         |         |
| Falta de ajuste | 4  | 102.16    | 25.539    | 127.69  | 0.000   |
| Error puro      | 4  | 0.80      | 0.200     |         |         |
| Total           | 12 | 1051.69   |           |         |         |



**Anexo 11.** Análisis de varianza para determinar el rango optimo del tratamiento para oxitetraciclina

**Diseño central compuesto**

Factores: 2                      Réplicas: 1  
Corridas base: 13              Total de corridas: 13  
Bloques base: 1                Total de bloques: 1

Factorial de dos niveles: Factorial completo

Puntos del cubo: 4  
Puntos centrales en el cubo: 5  
Puntos axiales: 4  
Puntos centrales en axial: 0

$\alpha$ : 1.41421

**Regresión de superficie de respuesta: Oxitetraciclina vs. Tiempo; pH**

Análisis de Varianza

| Fuente          | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|-----------------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Modelo          | 4  | 638.118   | 159.530   | 18.80   | 0.000   |
| Lineal          | 2  | 268.943   | 134.472   | 15.85   | 0.002   |
| Tiempo          | 1  | 0.000     | 0.000     | 0.00    | 1.000   |
| pH              | 1  | 268.943   | 268.943   | 31.70   | 0.000   |
| Cuadrado        | 2  | 369.175   | 184.588   | 21.75   | 0.001   |
| Tiempo*Tiempo   | 1  | 15.914    | 15.914    | 1.88    | 0.208   |
| pH*pH           | 1  | 366.914   | 366.914   | 43.24   | 0.000   |
| Error           | 8  | 67.882    | 8.485     |         |         |
| Falta de ajuste | 4  | 66.682    | 16.670    | 55.57   | 0.001   |
| Error puro      | 4  | 1.200     | 0.300     |         |         |
| Total           | 12 | 706.000   |           |         |         |

**Anexo 12.** Análisis de varianza para determinar el rango optimo del tratamiento para tilosina

**Diseño central compuesto**

Factores: 2                      Réplicas: 1  
 Corridas base: 13              Total de corridas: 13  
 Bloques base: 1                Total de bloques: 1

Factorial de dos niveles: Factorial completo

Puntos del cubo: 4  
 Puntos centrales en el cubo: 5  
 Puntos axiales: 4  
 Puntos centrales en axial: 0

$\alpha$ : 1.41421

**Regresión de superficie de respuesta: Tilosina vs. Tiempo; pH**

Análisis de Varianza

| Fuente          | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|-----------------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Modelo          | 4  | 475.492   | 118.873   | 16.74   | 0.001   |
| Lineal          | 2  | 200.434   | 100.217   | 14.11   | 0.002   |
| Tiempo          | 1  | 0.729     | 0.729     | 0.10    | 0.757   |
| pH              | 1  | 199.706   | 199.706   | 28.12   | 0.001   |
| Cuadrado        | 2  | 275.058   | 137.529   | 19.36   | 0.001   |
| Tiempo*Tiempo   | 1  | 15.652    | 15.652    | 2.20    | 0.176   |
| pH*pH           | 1  | 271.739   | 271.739   | 38.26   | 0.000   |
| Error           | 8  | 56.816    | 7.102     |         |         |
| Falta de ajuste | 4  | 54.816    | 13.704    | 27.41   | 0.004   |
| Error puro      | 4  | 2.000     | 0.500     |         |         |
| Total           | 12 | 532.308   |           |         |         |

**Anexo 13.** Concentración inhibitoria mínima para penicilina en tres bacterias *B. subtilis*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*

**Análisis de regresión lineal**

***B. subtilis***

| Variable           | N | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | ECMP   | AIC   | BIC   |
|--------------------|---|----------------|-------------------|--------|-------|-------|
| <i>B. subtilis</i> | 5 | 0.81           | 0.74              | 242.58 | 36.37 | 35.20 |

**Coefficientes de regresión y estadísticos asociados**

| Coef  | Est.  | E.E. | LI(95%) | LS(95%) | T    | p-valor | CpMallows | VIF  |
|-------|-------|------|---------|---------|------|---------|-----------|------|
| const | 21.33 | 4.41 | 7.31    | 35.36   | 4.84 | 0.0168  |           |      |
| Dosis | 15.05 | 4.27 | 1.47    | 28.64   | 3.53 | 0.0387  | 10.58     | 1.00 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC     | gl | CM     | F     | p-valor |
|---------|--------|----|--------|-------|---------|
| Modelo. | 526.88 | 1  | 526.88 | 12.43 | 0.0387  |
| Dosis   | 526.88 | 1  | 526.88 | 12.43 | 0.0387  |
| Error   | 127.12 | 3  | 42.37  |       |         |
| Total   | 654.00 | 4  |        |       |         |

***L. bulgaricus***

| Variable             | N | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | ECMP   | AIC   | BIC   |
|----------------------|---|----------------|-------------------|--------|-------|-------|
| <i>L. bulgaricus</i> | 5 | 0.78           | 0.71              | 369.96 | 37.26 | 36.09 |

**Coefficientes de regresión y estadísticos asociados**

| Coef  | Est.  | E.E. | LI(95%) | LS(95%) | T    | p-valor | CpMallows | VIF  |
|-------|-------|------|---------|---------|------|---------|-----------|------|
| const | 18.96 | 4.82 | 3.62    | 34.29   | 3.93 | 0.0292  |           |      |
| Dosis | 15.28 | 4.67 | 0.42    | 30.14   | 3.27 | 0.0467  | 9.29      | 1.00 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC     | gl | CM     | F     | p-valor |
|---------|--------|----|--------|-------|---------|
| Modelo. | 542.81 | 1  | 542.81 | 10.71 | 0.0467  |
| Dosis   | 542.81 | 1  | 542.81 | 10.71 | 0.0467  |
| Error   | 151.99 | 3  | 50.66  |       |         |
| Total   | 694.80 | 4  |        |       |         |

***S. thermophilus***

| Variable               | N | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | ECMP   | AIC   | BIC   |
|------------------------|---|----------------|-------------------|--------|-------|-------|
| <i>S. Thermophilus</i> | 5 | 0.79           | 0.73              | 228.24 | 34.89 | 33.72 |

**Coefficientes de regresión y estadísticos asociados**

| Coef  | Est.  | E.E. | LI(95%) | LS(95%) | T    | p-valor | CpMallows | VIF  |
|-------|-------|------|---------|---------|------|---------|-----------|------|
| const | 17.50 | 3.80 | 5.40    | 29.60   | 4.60 | 0.0193  |           |      |
| Dosis | 12.52 | 3.68 | 0.80    | 24.24   | 3.40 | 0.0425  | 9.91      | 1.00 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC     | gl | CM     | F     | p-valor |
|---------|--------|----|--------|-------|---------|
| Modelo. | 364.22 | 1  | 364.22 | 11.55 | 0.0425  |
| Dosis   | 364.22 | 1  | 364.22 | 11.55 | 0.0425  |
| Error   | 94.58  | 3  | 31.53  |       |         |
| Total   | 458.80 | 4  |        |       |         |



**Anexo 14.** Concentración inhibitoria mínima para oxitetraciclina en tres bacterias *B. subtilis*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*

**Análisis de regresión lineal**

***B. subtilis***

| Variable           | N | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | ECMP   | AIC   | BIC   |
|--------------------|---|----------------|-------------------|--------|-------|-------|
| <i>B. subtilis</i> | 5 | 0.78           | 0.70              | 383.71 | 37.22 | 36.05 |

**Coefficientes de regresión y estadísticos asociados**

| Coef  | Est.  | E.E. | LI (95%) | LS (95%) | T    | p-valor | CpMallows | VIF  |
|-------|-------|------|----------|----------|------|---------|-----------|------|
| const | 16.54 | 4.80 | 1.27     | 31.81    | 3.45 | 0.0410  |           |      |
| Dosis | 15.04 | 4.65 | 0.25     | 29.83    | 3.24 | 0.0480  | 9.11      | 1.00 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC     | gl | CM     | F     | p-valor |
|---------|--------|----|--------|-------|---------|
| Modelo. | 526.13 | 1  | 526.13 | 10.48 | 0.0480  |
| Dosis   | 526.13 | 1  | 526.13 | 10.48 | 0.0480  |
| Error   | 150.67 | 3  | 50.22  |       |         |
| Total   | 676.80 | 4  |        |       |         |

***L. bulgaricus***

| Variable             | N | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | ECMP   | AIC   | BIC   |
|----------------------|---|----------------|-------------------|--------|-------|-------|
| <i>L. bulgaricus</i> | 5 | 0.78           | 0.71              | 215.03 | 35.89 | 34.71 |

**Coefficientes de regresión y estadísticos asociados**

| Coef  | Est.  | E.E. | LI (95%) | LS (95%) | T    | p-valor | CpMallows | VIF  |
|-------|-------|------|----------|----------|------|---------|-----------|------|
| const | 15.42 | 4.20 | 2.05     | 28.78    | 3.67 | 0.0350  |           |      |
| Dosis | 13.40 | 4.07 | 0.45     | 26.35    | 3.29 | 0.0460  | 9.38      | 1.00 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC     | gl | CM     | F     | p-valor |
|---------|--------|----|--------|-------|---------|
| Modelo. | 417.34 | 1  | 417.34 | 10.84 | 0.0460  |
| Dosis   | 417.34 | 1  | 417.34 | 10.84 | 0.0460  |
| Error   | 115.46 | 3  | 38.49  |       |         |
| Total   | 532.80 | 4  |        |       |         |

***S. thermophilus***

| Variable               | N | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | ECMP   | AIC   | BIC   |
|------------------------|---|----------------|-------------------|--------|-------|-------|
| <i>S. Thermophilus</i> | 5 | 0.80           | 0.73              | 308.99 | 35.98 | 34.81 |

**Coefficientes de regresión y estadísticos asociados**

| Coef  | Est.  | E.E. | LI (95%) | LS (95%) | T    | p-valor | CpMallows | VIF  |
|-------|-------|------|----------|----------|------|---------|-----------|------|
| const | 12.79 | 4.24 | -0.70    | 26.29    | 3.02 | 0.0569  |           |      |
| Dosis | 14.20 | 4.11 | 1.13     | 27.28    | 3.46 | 0.0407  | 10.22     | 1.00 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC     | gl | CM     | F     | p-valor |
|---------|--------|----|--------|-------|---------|
| Modelo. | 469.10 | 1  | 469.10 | 11.96 | 0.0407  |
| Dosis   | 469.10 | 1  | 469.10 | 11.96 | 0.0407  |
| Error   | 117.70 | 3  | 39.23  |       |         |
| Total   | 586.80 | 4  |        |       |         |



**Anexo 15.** Concentración inhibitoria mínima para tilosina en tres bacterias *B. subtilis*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*

**Análisis de regresión lineal**

***B. subtilis***

| Variable           | N | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | ECMP   | AIC   | BIC   |
|--------------------|---|----------------|-------------------|--------|-------|-------|
| <i>B. subtilis</i> | 5 | 0.80           | 0.74              | 312.11 | 36.02 | 34.85 |

**Coefficientes de regresión y estadísticos asociados**

| Coef  | Est.  | E.E. | LI (95%) | LS (95%) | T    | p-valor | CpMallows | VIF  |
|-------|-------|------|----------|----------|------|---------|-----------|------|
| const | 14.46 | 4.26 | 0.91     | 28.01    | 3.40 | 0.0426  |           |      |
| Dosis | 14.38 | 4.12 | 1.25     | 27.50    | 3.49 | 0.0399  | 10.36     | 1.00 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC     | gl | CM     | F     | p-valor |
|---------|--------|----|--------|-------|---------|
| Modelo. | 480.53 | 1  | 480.53 | 12.15 | 0.0399  |
| Dosis   | 480.53 | 1  | 480.53 | 12.15 | 0.0399  |
| Error   | 118.67 | 3  | 39.56  |       |         |
| Total   | 599.20 | 4  |        |       |         |

***L. bulgaricus***

| Variable             | N | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | ECMP   | AIC   | BIC   |
|----------------------|---|----------------|-------------------|--------|-------|-------|
| <i>L. bulgaricus</i> | 5 | 0.80           | 0.73              | 233.63 | 35.71 | 34.54 |

**Coefficientes de regresión y estadísticos asociados**

| Coef  | Est.  | E.E. | LI (95%) | LS (95%) | T    | p-valor | CpMallows | VIF  |
|-------|-------|------|----------|----------|------|---------|-----------|------|
| const | 12.92 | 4.13 | -0.21    | 26.05    | 3.13 | 0.0520  |           |      |
| Dosis | 13.78 | 4.00 | 1.07     | 26.50    | 3.45 | 0.0410  | 10.17     | 1.00 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC     | gl | CM     | F     | p-valor |
|---------|--------|----|--------|-------|---------|
| Modelo. | 441.81 | 1  | 441.81 | 11.90 | 0.0410  |
| Dosis   | 441.81 | 1  | 441.81 | 11.90 | 0.0410  |
| Error   | 111.39 | 3  | 37.13  |       |         |
| Total   | 553.20 | 4  |        |       |         |

***S. thermophilus***

| Variable               | N | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | ECMP   | AIC   | BIC   |
|------------------------|---|----------------|-------------------|--------|-------|-------|
| <i>S. Thermophilus</i> | 5 | 0.79           | 0.72              | 282.94 | 36.37 | 35.20 |

**Coefficientes de regresión y estadísticos asociados**

| Coef  | Est.  | E.E. | LI (95%) | LS (95%) | T    | p-valor | CpMallows | VIF  |
|-------|-------|------|----------|----------|------|---------|-----------|------|
| const | 12.00 | 4.41 | -2.03    | 26.03    | 2.72 | 0.0724  |           |      |
| Dosis | 14.45 | 4.27 | 0.86     | 28.04    | 3.38 | 0.0430  | 9.84      | 1.00 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC     | gl | CM     | F     | p-valor |
|---------|--------|----|--------|-------|---------|
| Modelo. | 485.57 | 1  | 485.57 | 11.45 | 0.0430  |
| Dosis   | 485.57 | 1  | 485.57 | 11.45 | 0.0430  |
| Error   | 127.23 | 3  | 42.41  |       |         |
| Total   | 612.80 | 4  |        |       |         |



Anexo 16. Fotografías







