

Tratamiento térmico de suero de leche contaminado con antibióticos para su posterior fermentación con *Kluyveromyces marxianus*

Eluk D., Nágel O., Althaus R., Gasparotti, M.L., Molina, M.P.

Cátedra de Biofísica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral (UNL).
ralthaus@fcv.unl.edu.ar

Proyecto CAI+D (PI 501201110152LI) de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Litoral y PICT 2012-455 de la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica: “Diseño de un sistema sustentable para el tratamiento de leche contaminada con antibióticos”

El suero de leche contaminado con residuos de antibióticos (ATBs) constituye un problema para la industria láctea y el medio ambiente, puesto que el vertido de este material (“*landfarming*”) ocasiona inconvenientes tales como fijación de algunos ATBs a las partículas del suelo, cambios en flora microbiana del suelo, desarrollo de antibiorresistencia, contaminación de aguas superficiales o subterráneas e incorporación de ciertos ATBs a los vegetales, pudiendo ingresar a la cadena alimentaria y al consumidor. Una alternativa interesante plantea la obtención de levadura utilizando este suero, de modo tal de emplear el concentrado proteico (biomasa) a los alimentos. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de tratamientos térmicos de suero contaminado con antibióticos sobre la posterior capacidad fermentativa de *K. marxianus*. En el presente estudio *in vitro* se procedió a evaluar el efecto de tres tratamientos térmicos (T1: 120°C-20’, T2: 120°C-40’ y T3: 120°C-60’) sobre muestras de suero contaminados con cinco cefalosporinas (cefadroxil, cefalexina, cefoperazone, cefuroxime, ceftiofur), tres tetraciclinas (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina) y cuatro quinolonas (ciprofloxacina, enrofloxacina, marbofloxacina, norfloxacina), debido a que estudios previos indican que *K. marxianus* es sensible a estas familias de antibióticos (Althaus et al., 2014). Para ello se preparó un medio semi-sintético (MSS) a pH=7,0 constituido por suero de leche (5% de lactosa), extracto de levadura (0,8%) y peptona de caseína (0,8%). El medio se fraccionó en 48 alícuotas que se fortificaron con 1000 mg/L de cada antibiótico (4 alícuotas por cada ATBs). A continuación, para cada antibiótico se conservó una alícuota sin calentar (S/C) y las otras tres se sometieron a los siguientes tratamientos en autoclave: T1: 120°C-20’, T2: 120°C-40’ y T3: 120°C-60’. Una vez atemperadas (25°C) las muestras, se evaluó la prueba de fermentación *K. marxianus* mediante la incorporación de 20% de inóculo de suspensión de la levadura y se agregó azul de bromotimol (50 mg/L). Se utilizó una microtécnica en placas ELISA para evaluar la capacidad fermentativa¹. Para cada antibiótico y tratamiento térmico se ensayaron 8 réplicas de cada una de las doce concentraciones (48 microplacas ELISA en total) de cefalosporinas (0, 20, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360, 400), tetraciclinas (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 µg/l) y quinolonas (0, 20, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360, 400). Las microplacas se colocaron en estufa a 37°C durante 7 horas y luego se midieron las absorbancias a 450 nm con un lector de microplacas Biotek ELx800TM. Se calcularon las concentraciones inhibitorias que producen el 10% de inhibición de la fermentación de *K. marxianus* utilizando el modelo de regresión logística. Para las muestras de suero que no fueron tratadas térmicamente se determinaron las concentraciones que inhiben el 10% de la fermentación de *K. marxianus* (CI10), obteniéndose los siguientes valores: cefalosporinas (CI10, cefadroxil= 5 µg/L, CI10, cefalexina= 1 µg/L, CI10, cefoperazone= 40 µg/L, CI10, cefuroxime= 24 µg/L, CI10, ceftiofur= 40 µg/L), tetraciclinas (CI10, clortetraciclina= 4 µg/L, CI10, oxitetraciclina= 19 µg/L, CI10, tetraciclina= 29 µg/L) y quinolonas (enrofloxacina (CI10, enrofloxacina = 20 µg/L, CI10, ciprofloxacina = 122 µg/L, CI10, marbofloxacina = 5 µg/L y CI10, norfloxacina = 80 µg/L). Todas estas concentraciones resultan inferiores (a excepción de ciprofloxacina) a los Límites Máximos de Residuos establecidos por la Comunidad Europea². Cuando se utilizaron las muestras de suero tratadas térmicamente (T1, T2 y T3) se observó crecimiento para las cinco cefalosporinas y las tres tetraciclinas utilizadas en este estudio, poniendo de manifiesto la

inestabilidad térmica de estas moléculas que son destruidas por la acción del calor⁴. No obstante, las muestras de suero conteniendo quinolonas permiten la fermentación de *K. marxianus* después de haberse tratado térmicamente a 120°C durante 20, 40 y 60 minutos, señalando la elevada estabilidad térmica de estos antibióticos a la acción del calor³. Se puede establecer que la esterilización a 120°C durante 20 minutos resulta suficiente para inactivar los residuos de cefalosporinas y tetraciclinas presentes en el suero de leche contaminado, pero no es aconsejable para desnaturalizar los residuos de quinolonas. AL respecto, otros tratamientos deberían ensayarse para eliminar estos residuos como por ejemplo la aplicación de radiación UV acompañada de ultrasonificación. A modo de síntesis, el suero de leche que contiene residuos de cefalosporinas y tetraciclinas se puede utilizar para fermentar *K. marxianus* cuando se esteriliza, puesto que no afecta al crecimiento de la levadura. Esta levadura obtenida se puede utilizar como biomasa para la alimentación del ganado vacuno. También resulta conveniente llevar a cabo estudios tendientes a purificar extractos de levaduras desnaturalizados de *K. marxianus* que podrían utilizarse como inmunomoduladores de la glándula mamaria para prevenir posibles infecciones del ganado vacuno. De esta forma, las pérdidas económicas que el productor percibe por entregar leche contaminada con residuos de ATBs, podrían retribuirse ya sea como biomasa para alimentación, o como vacuna para administrar antes del secado para evitar posible infecciones durante la lactación siguiente.

Bibliografía

1. **Althaus R., Nagel O., Molina, P.** (2014). Efecto de antibióticos en suero de leche sobre la fermentación de *Kluyveromyces Marxianus*. Proceedings International Conference on Food Innovation (Food Innova). Concordia, Argentina.
2. **EC.** (2010). Regulation (EU) N° 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Official Journal of European Communities, L. 15, 1e72.
3. **Roca M., Castillo M., Martí P., Althaus R. L., Molina M. P.** (2010). Effect of heating on the stability of quinolones in milk. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 58(9): 5427-5431.
4. Roca M., Villegas M., Korbitarte M., Althaus R.L., Molina M. P. (2011). Effect of heat treatments on stability on β -lactams in milk. *Journal of Dairy Science*. 94 (3): 1155-1164.