

## **Creación de resistencia a los antibióticos en los fermentos lácticos del Yoghourt y Bioyoghourt, en la preparación de leches ácidas medicamentosas**

*Por Félix Rejas García*

A las leches agrias, originarias en su mayor parte de los pueblos orientales, se les han atribuido numerosas propiedades beneficiosas, significándolas incluso, la longevidad característica de algunos pueblos caucásicos amplios consumidores de las mismas.

Entre las cualidades más importantes de estas leches fermentadas se señalan, su amplia digestibilidad, su capacidad antipútrida y estimulante para el aparato digestivo a causa de su riqueza en ácido láctico, y la adaptabilidad de su flora a los diferentes segmentos del tubo digestivo.

Esta última característica es quizá la más interesante desde el punto de vista biológico, ya que al adaptarse y desarrollarse los fermentos lácticos en el tubo digestivo, especialmente en el colon, actúan como bacterias simbióticas con el resto de la flora normal del mismo, inhibiendo el crecimiento de los organismos extraños, y elaborando vitaminas del complejo B.

Sin embargo pueden aceptarse a partir de los clásicos trabajos de MECHNIKOFF, MORO, RETTGER, ORLA-JENSEN, HENNEBERG, VIRTANEN, TARNANEN, etc., y los más modernos de MAINZER, CARRAZ, MOULIN, etc., que solamente los lactobacilos bifidus y acidophilus presentan caracte-

rísticas netamente fecales, tolerando el ambiente del intestino grueso, mientras que es dudoso que el *Lact. bulgaricus* y el resto de la flora láctica de las leches agrias pueda adaptarse a las condiciones climáticas del intestino, incluso del intestino delgado.

A la vista de estos conocimientos es lógico pensar que el prestigio de las leches agrias clásicas como productos terapéuticos, regeneradores de la flora láctica intestinal, hayan sufrido un crudo golpe, y que como consecuencia la investigación se centrara en la preparación de leches fermentadas medicamentosas con el *Lact. acidophilus*. Surgió en primer lugar en Estados Unidos la leche acidófila, sin embargo, y a causa de su consistencia defectuosa y especialmente por el sabor y aroma anormales y totalmente diferentes al del yoghourt, su utilización en la alimentación fue escaso. Más tarde y tras una serie de intentos desafortunados para crear una leche agria con el *Lact. acidophilus* en cultivo simbiótico con *Strep. lactis* o *thermophilus*, DEMETER y KUNDRAT, en 1955, lograron por una simbiosis perfecta del *Lact. acidophilus* y un *Strep. thermophilus* procedente del Taete, leche agria escandinava, la creación del yoghourt acidófilo, biogurt o bioyoghourt, producto con características de consistencia, aroma y sabor idénticas al del yoghourt clásico.

Una de las utilidades terapéuticas actuales del bioyoghourt, es la de restituir la flora láctica normal del intestino, alterada o destruida por el tratamiento por vía oral de sustancias antibióticas. Es bien sabido que con la administración por esta vía de antibióticos de la serie de las tetracilinas y en menor escala por la cloromicetina, estreptomycin y sulfamidas de difícil absorción, se suprime o altera la flora normal del intestino, con lo que a la vez que aparecen síntomas de avitaminosis, complejo B, surge una flora anormal, especies extrañas al intestino, resistentes a los quimioterápicos y patógenas facultativas, *Staf. aureus*, *Prot. vulgaris*, *Ps. aeruginosa*, paracolis, enterococos, *Candida albicans* y monilias, responsables de trastornos digestivos, enterocolitis, y en ocasiones verdaderas enterotoxemias. El tratamiento preventivo o terapéutico para evitar o combatir estos trastornos será, aparte de la implantación de colibacilos, la restitución de la flora láctica por preparados entre los que se encuentre el *Lact. acidophilus*.

Ahora bien, dada la gran sensibilidad a los antibióticos, especialmente a los de amplio espectro, tetracilinas y cloranfenicol, de los fermentos lácticos, es razonable pensar que la concentración antibiótica del contenido intestinal, del orden 500-600  $\gamma$ /gram, de heces, tras una inges-

ción de 0,5 gr. de producto activo, será más que suficiente para destruir a parte de la flora láctica normal que vamos incorporando en el curso del tratamiento, con lo que la restitución de la misma será harto difícil en tratamientos prolongados de antibióticos.

La única forma de obviar este grave inconveniente sería el incorporar fermentos lácticos resistentes a estos antibióticos, mediante leches agrias, yoghourt y especialmente bioyoghourt preparados con cepas resistentes a los mismos.

En vista del extraordinario interés que tendría la fabricación de estas leches fermentadas medicamentosas, decidimos investigar sobre la posibilidad de creación de resistencia, en los fermentos lácticos del yoghourt y bioyoghourt, a los antibióticos de amplio espectro.

En el desarrollo de este trabajo describiremos en primer lugar las técnicas empleadas, seguidamente analizaremos los resultados obtenidos tanto en la creación de resistencia como en la conservación de la misma, para terminar con la descripción de las técnicas más adecuadas en el mantenimiento de las cepas y la preparación de los inóculos en la producción industrial de yoghourt y bioyoghourt medicamentosos.

## TECNICAS EMPLEADAS

a) Gérmenes lácticos empleados: Una cepa de *Lact. bulgaricus* aislado de un yoghourt comercial, y dos cepas simbióticas, una de *Strep. thermophilus* y otra de *Lact. acidophilus*, amablemente facilitadas para este estudio por el Laboratorio Lactológico Rosell de Tuy, Pontevedra.

b) Técnicas: La creación de resistencia la hemos realizado mediante pases de los gérmenes lácticos sobre leche esteril a la que se incorporaron los antibióticos en cantidades crecientes, con arreglo a la siguiente pauta:

Preparación de la leche: Distribución de leche fresca a razón de 10 cc. sobre tubos de 18x180. Esterilización a 115°-15m.

Preparación de la solución concentrada de antibiótico: Diaria, y bajo condiciones estériles, la tetracilina sobre tampón pH 4,5 y la cloromicetina sobre agua destilada, ambas en concentración de 2.000 mcg, o, u/ cc.

Preparación de la leche con antibiótico: La incorporación de los antibióticos a la leche fue realizada, a partir de las soluciones concentra-

das, o de diluciones al 1/10 sobre agua destilada estéril para las concentraciones bajas.

Concentraciones de antibióticos utilizadas: Las concentraciones, por cc. de leche, de cloromicetina y tetraciclina empleadas en la creación de resistencia fueron las que siguen: 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, y 200 mcg., o unidades.

Siembra e incubación: La siembra, a razón del 5%, se realizó a partir del cultivo en leche con la más alta concentración de antibióticos resistida hasta el momento. Incubación a 37° en baño maría con circulación forzada de agua.

c) Pauta de la creación de resistencia: La creación de la resistencia se realizó por pases sucesivos de los gérmenes lácticos sobre leche con concentración de antibióticos crecientes con arreglo a la pauta dada anteriormente. Se consideró adaptados los gérmenes a una concentración determinada cuando la coagulación de la leche con dicha concentración de antibiótico se realizó en un tiempo máximo de seis horas. En la primera exposición no es frecuente tiempos tan cortos, esto se consigue mediante pases sucesivos sobre leche con idéntica concentración. Generalmente son suficientes dos o tres.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla número 1 y las gráficas I, II y III, se expresan los resultados encontrados, en el transcurso de los 15 pases dados a los gérmenes lácticos al objeto de crear en los mismos resistencia a los antibióticos. Las concentraciones reseñadas son las máximas obtenidas en cada pase.

De su análisis podemos deducir inmediatamente el idéntico comportamiento de los *Lact. bulgaricus* y *acidophilus*, completamente dispar del *Strep. thermophilus*, así como la mayor facilidad de adaptación a la tetraciclina que a la cloromicetina.

Efectivamente la adaptación a la tetraciclina, previa una primera fase de dificultad, los primeros tres o cuatro pases, es rápida en los tres gérmenes, presentando todos una fase de amplia adaptación, que decrece más tarde al aumentar la concentración de antibiótico. Este fenómeno se presenta más manifiesto en el *Strep. thermophilus* que en los dos lactobacilos. La resistencia creada es también más amplia en el estreptococo, 200 u/cc., que en los lactobacilos, 150 u/cc.

La adaptación a la cloromicetina es más lenta en los tres gérmenes y especialmente en los lactobacilos. En el estreptococo, debido probablemente a su mayor rapidez de adaptación se presenta el mismo fenómeno que para la tetraciclina, presentando una zona de mayor rapidez de adaptación, que decrece al aumentar la concentración de antibiótico. La resistencia conseguida al término de los 15 pases, fue de 100 mcg./cc., para el estreptococo, y de 35 y 40 mcg./cc., para el *Lact. acidophilus* y *Lact. bulgaricus*, respectivamente.

La adaptación a mezclas de cloromicetina y tetraciclina, a partes iguales, es muy parecida en los tres gérmenes, y más lentas que a ambos antibióticos por separado, a causa probablemente de una acción sinérgica de los dos antibióticos. Este sinergismo se manifiesta con mayor intensidad frente al estreptococo que frente a los lactobacilos, contrariamente a lo que se pudiera suponer si recordamos los resultados obtenidos frente a cada uno de los dos antibióticos. La resistencia conseguida al final de la investigación, 15 pases, fue de 20 mcg. y u./cc., para el estreptococo, y de 25 y 30 mcg. y u./cc., para el *Lact. acidophilus* y el *Lact. bulgaricus*, respectivamente.

Al objeto de comprobar que la facultad de crecimiento y metabolismo de los gérmenes lácticos en presencia de antibiótico, era debida a la creación de una verdadera resistencia y no a una destrucción del antibiótico por factores ambientales, temperatura, incorporación de ácido láctico durante la siembra etc., hemos realizado valoraciones de tetraciclina sobre los cultivos una vez terminada plenamente la fermentación. Los resultados han sido plenamente satisfactorios, pudiéndose detectar alrededor del 80% del antibiótico. a pesar de las dificultades que encierra la valoración a causa del estímulo que por una parte representa la leche en el crecimiento del germen sensible, y por otra la inhibición que sobre el mismo ejerce el ácido láctico, lo que nos hace suponer que apenas existe desactivación antibiótica. Suponemos que el comportamiento de la cloromicetina, sea muy similar al de la tetraciclina, a causa de la gran estabilidad al calor y a los pH neutros y ácidos.

## PERDIDA DE RESISTENCIA

Con el fin de comprobar si la resistencia obtenida frente a los antibióticos era perdurable, y podía ser aplicada fácilmente en la práctica industrial, la comprobamos después de 1, 5, 10 pases a través de leche des-

provista de antibiótico, observando que se mantenía intacta aunque los tiempos necesarios para la coagulación neta de la leche aumentaban ligeramente y en forma proporcional al número de pases.

#### CARACTERISTICAS DEL YOGHOURT Y BIOYOGHOURT FABRICADO CON CEPAS RESISTENTES

Hemos podido comprobar en diversos ensayos efectuados, la similitud de los yoghourts y los bioyoghourts fabricados con las cepas antes y después de hacerlas resistentes a los antibióticos, la similitud es total, en cuanto a temperaturas óptimas, tiempo de coagulación, estructura del coagulo, acidez, aroma y sabor.

#### TECNICA PROPUESTA PARA EL MANTENIMIENTO DE CEPAS, Y PREPARACION DE INOCULOS EN LA PRODUCCION INDUSTRIAL DE YOGHOURT Y BIOYOGOURT MEDICAMENTOSOS

En vista de los resultados obtenidos, creación de resistencia de los gérmenes lácticos a los antibióticos, conservación de esta resistencia tras un número de pases sobre leches sin antibiótico, y obtención con las mismas de yoghourts y bioyoghourts de idénticas características organolépticas a los clásicos, creemos que es técnicamente posible la obtención de estas leches fermentadas medicamentosas con las suficientes garantías. Para lo cual estimamos que la pauta a seguir en el laboratorio industrial será la que sigue:

- a) Creación de resistencia con las cepas lácticas frente a los antibióticos de elección.
- b) Comprobación por pases en leche sin antibiótico de la conservación de la resistencia.
- c) Conservación de las cepas resistentes mediante liofilización.
- d) Apertura de liofilizados, y adaptación de las cepas al cultivo en leche.
- e) A partir de estos cultivos preparación de los inóculos para la fabricación industrial, y sucesivos subcultivos para la preparación de nuevos inóculos. El número de pases estará en dependencia con los resultados obtenidos en el apartado b. Cuando el número de pases se aproxime al que comienza la pérdida de resistencia, se abrirá un nuevo liofilizado, siguiendo idéntica pauta.

f) Cuando el stock de liofilizados decrezca, se prepararán nuevos a partir de cultivos directos de liofilizado en leche con una concentración de antibiótico igual a la máxima soportada por el germen.

Se observará que propugnamos, para la conservación de las cepas, el cultivo liofilizado. Lo hacemos en primer lugar porque es la más idónea y segura, aparte de que el equipo necesario, liofilizador, bomba de vacío, etc., y los gastos de la operación, para las necesidades de un laboratorio láctológico, no son excesivamente onerosos.

La técnica de liofilización usada por nosotros en la preparación de liofilizados de las cepas resistentes ha sido la siguiente:

A partir de un cultivo de la cepa en leche, perfectamente coagulada, hemos realizado una dilución al 1/10 sobre leche descremada estéril, al objeto de incorporar proteínas no digeridas y proteger a los gérmenes durante el proceso, al mismo tiempo que rebajamos la tasa de ácido láctico. El envasado se realizó en ampollas esféricas, para dar mayor superficie de sublimación, a razón de 0,5 cc. por ampolla. Liofilizamos en aparato Torres Quevedo, con congelación a menos de 50° C con una presión de 5 micras de mercurio. El cierre de las ampollas se realizó con soplete de gas. El tiempo total de la operación es de 5 horas.

## CREACION DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS

Pasos N.º	Lact. acidophilus			Lact. bulgaricus			Strep. thermophilus		
	mcg./cc. y u. Clorom. Tetrac.	mcg./cc. Clorom.	u./cc. Tetrac.	mcg./cc. y u. Clorom. Tetrac.	mcg./cc. Clorom.	u./cc. Tetrac.	mcg./cc. y u. Clorom. Tetrac.	mcg./cc. Clorom.	u./cc. Tetrac.
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	3	1	3	1
3	1	1	5	1	1	5	1	5	3
4	1	1	10	1	3	10	1	10	5
5	1	3	20	1	5	20	1	20	10
6	1	3	30	3	5	30	3	25	20
7	3	5	50	3	5	50	3	30	30
8	3	5	70	5	10	70	5	50	50
9	5	10	80	5	10	80	5	60	90
10	5	10	100	5	15	100	5	70	150
11	10	15	100	10	15	100	5	80	150
12	10	20	125	15	20	125	10	80	175
13	15	25	125	20	25	125	10	90	175
14	20	30	125	25	30	125	15	90	175
15	25	35	150	30	40	150	20	100	200

## RESUMEN

Se ha realizado un estudio sobre creación de resistencia a los antibióticos de amplio espectro de los fermentos lácticos del yoghourt y bio-yoghourt con el objeto de poder preparar leches fermentadas medicamentosas y poder restituir la flora láctica normal del intestino humano alterada o destruida por terapéuticas antibióticas prolongadas.

Se analizan en primer lugar el papel que las bacterias lácticas juegan en la fisiología intestinal y especialmente la simbiosis del *Lact. acidophilus* con el resto de la flora normal del intestino.

La adaptación de los lactobacilos tanto el *bulgaricus* como del *acidophilus*, a los antibióticos, es más lenta que para el *Strep. thermophilus*. Todos ellos se adaptan con mayor facilidad a la tetraciclina que a la cloromicetina. La adaptación a mezclas de cloromicetina y tetraciclina, a partes iguales, es muy parecida en los tres gérmenes y más lenta que a ambos antibióticos por separado, a causa probablemente de una acción sinérgica de los dos antibióticos.

La resistencia obtenida en los tres gérmenes se mantiene intacta por lo menos después de 10 pases por leche desprovista de antibiótico.

Los yoghourts y bioyoghourts fabricados con las cepas resistentes presentan idénticas características físicas y organolépticas a los preparados con las cepas normales.

En vista de los resultados obtenidos y ante la creencia de que es técnicamente posible la obtención de estas leches fermentadas medicamentosas, se dan normas para la creación de resistencia a los antibióticos en los fermentos lácticos, mantenimiento de las cepas y preparación de inóculos para la producción industrial de las mismas.

## RESUME

On a réalisé une étude pour la création d'une résistance des germes lactiques du yoghourt et du bioyoghourt contre les antibiotiques de grand spectre, á fin de pouvoir préparer du lait fermenté et médicamenteux pour rétablir la flore lactique normale dans l'intestin humain, flore altérée ou détruite par des thérapeutiques prolongées.

On analyse d'abord le rôle des bactéries lactiques dans la physiologie intestinale et spécialement la symbiose du *Lact. acidophilus* avec le reste de la flore normale de l'intestin.

L'adaptation des *Lactobacilli*, aussi bien le *Lact. bulgaricus* que le *Lact. acidophilus*, aux antibiotiques est plus lente qu'au *Streptococcus Thermophilus*. Tous les trois s'adaptent plus facilement à la Tétracycline et à la Chloromycétine. L'adaptation à des mélanges de Chloromycétine et de Tétracycline, à parties égales, est très semblable dans les trois germes et plus lente qu'aux deux antibiotiques par séparé, à cause probablement d'une action synergique des deux antibiotiques.

Les yoghourts et bioyoghourts fabriqués avec des souches résistantes présentent des caractéristiques physiques et organoleptiques semblables à celles des produits préparés avec des souches normales.

Vus les résultats obtenus et croyant qu'il est techniquement possible d'obtenir des laits fermentés et médicamenteux, on donne des directives pour la formation de la résistance aux antibiotiques dans les ferments lactiques, pour la conservation des souches et la préparation des germes pour la production industrielle de ces souches.

#### SUMMARY

A study has been carried out on the resistance of latic organisms from yoghurt and bioyoghurt to wide spectre Antibiotics in order to prepare fermented and medicinal milk and so replace the normal lactic flora in the human intestine, altered or destroyed by prolonged antibiotic therapeutics.

The author first analyzes the role that lactic bacteria play in the intestinal physiology and especially the symbiosis of *Lact. acidophilus* with the remaining part of normal flora in the intestine.

The adaptation of *Lact. bulgaricus* as well as *Lact. acidophilus* to antibiotics is slower than that of *Streptococcus thermophilus*. The three organisms are more easily adapted to Tetracycline and to Chloromycetine. Their adaptation to mixtures of Tetracycline and Chloromycetine, in equal portions, is very similar in the three organisms and slower than to the two mentioned antibiotics, probably due to a synergic action of both antibiotics.

The resistance obtained in the three organisms is maintained intact at least after ten runs against milk containing no antibiotics.

Yoghurt and bioyoghurt manufactured with resistant strains present identical physical and inorganoleptic characteristics as preparations manufactured with normal strains.

In consideration of the results which were obtained and believing that it is technically possible to obtain such fermented medicinal milk, the author gives some rules to form resistant lactic organisms to antibiotics, to maintain strains and to prepare organisms for the industrial production of those strains.

#### BIBLIOGRAFIA

- CARRAZ, M. MOULIN, A., 1958.—C. R. Soc. Biol. 152, 1.505-1.508.  
 CARRAZ, M. y MOULIN, A., 1958.—C. R. Soc. Biol., 152, 1.520-1.523.  
 DEMETER, K. J. y KUNDRAT, W., 1959.—XV Cong. Intern. Lech., Vol. 2, Sec. 3, 854-859.  
 LAVERGNE, E., BURDIN, J. C., SCHMITT, J. y MANCIAUX, M. 1959. A. Inst. Pasteur, 97, 104-107.  
 MAINZER, J., 1957.—Milchwissenschaft, 12, 220.  
 ROSELL, J. M., 1960.—Rev. Esp. Lech., 173-175.  
 SHAHANI, K. M. y HARPER, W. J. 1958.—Milk Prod. J., 49, 3, 15-16.

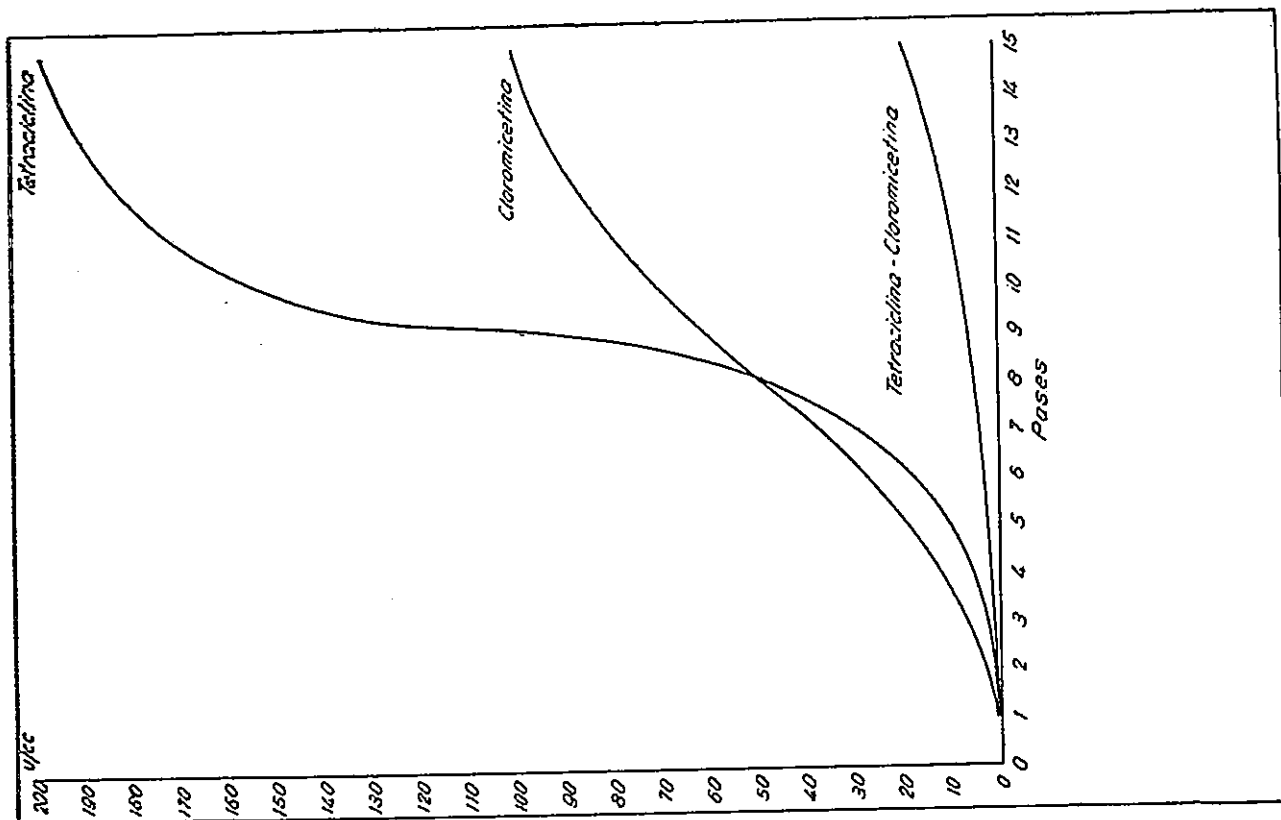


Fig. 1. Aumento de resistencia del *Streptococcus thermophilus* frente a los antibióticos.

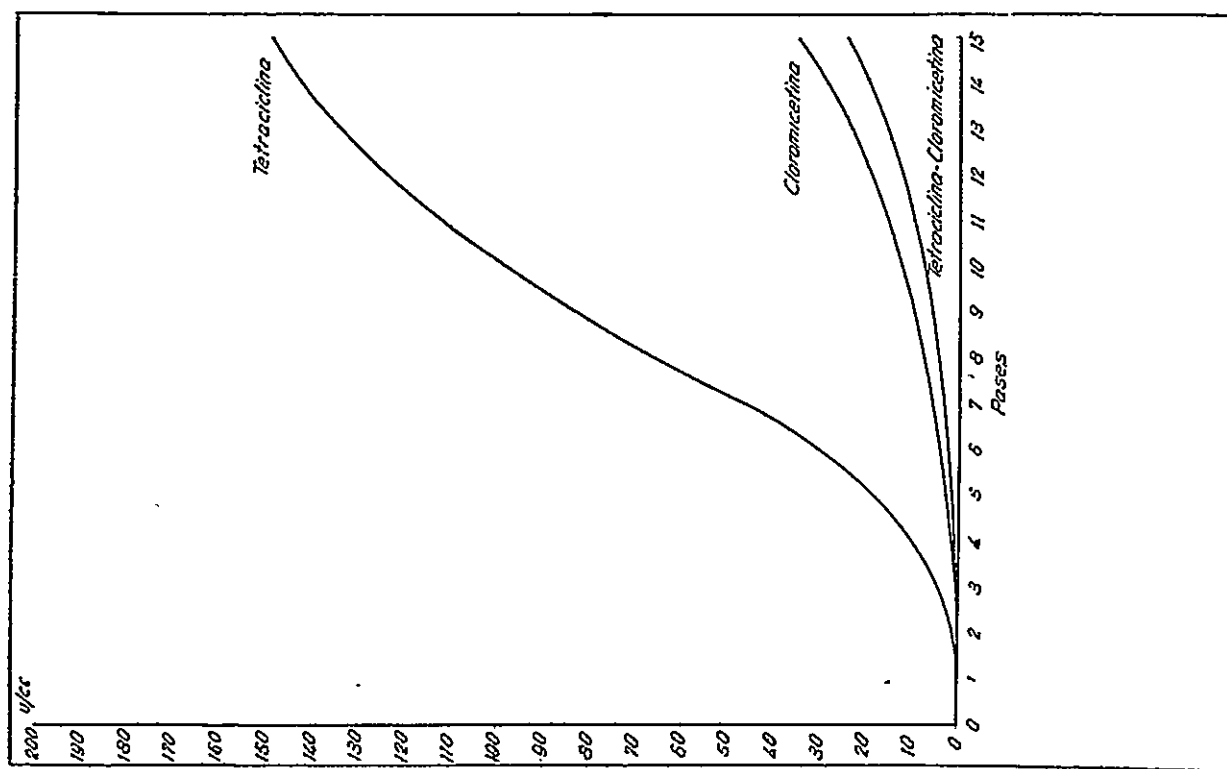


Fig. 2. Aumento de la resistencia del *Lactobacillus acidophilus* a los antibióticos.

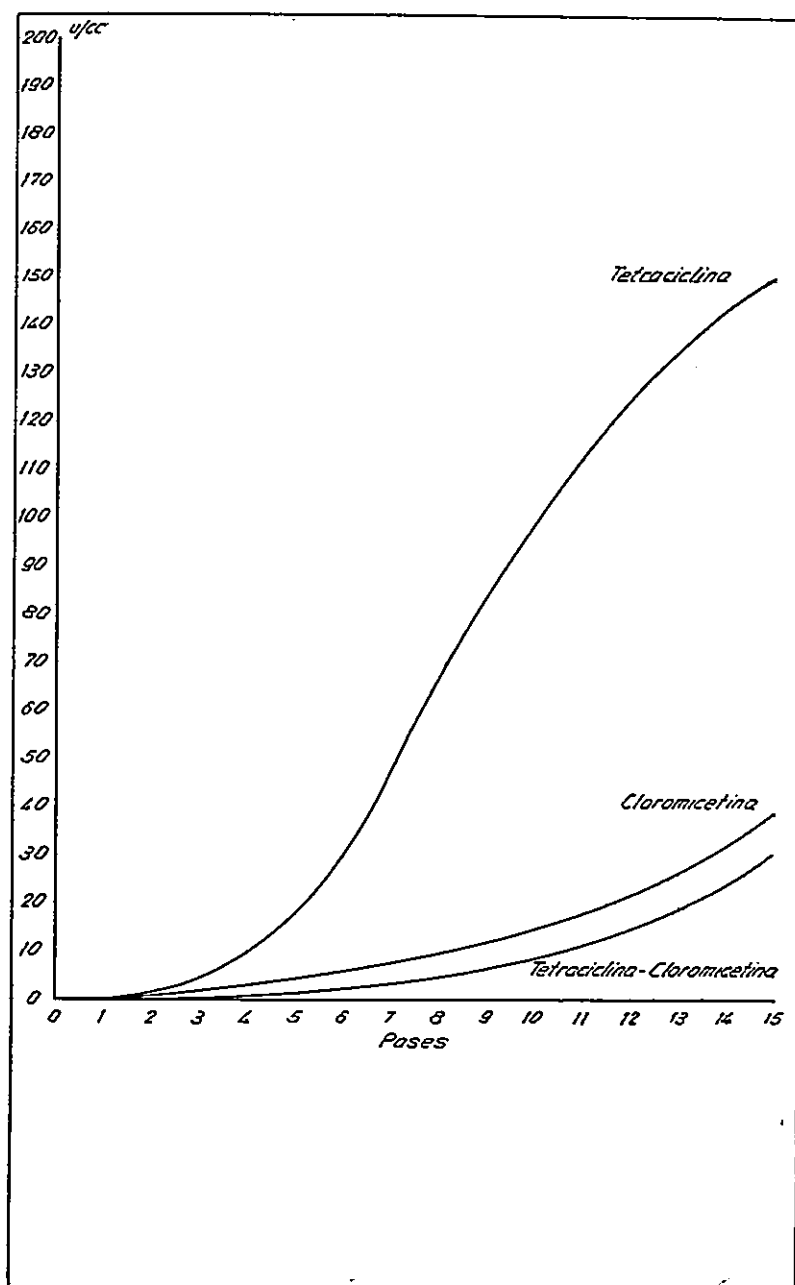


Fig. 3. Aumento de resistencia del *Lactobacillus bulgaricus* frente a los antibióticos.