



TITULO DEL TRABAJO FIN DE MASTER

“ESTUDIO DE LA EFICACIA BIOCIDA DE
PRODUCTOS DE HIGIENIZACIÓN INDUSTRIAL DE
ÚLTIMA GENERACIÓN”

Nombre del autor/a

Lidia Camacho Raposo

Trabajo entregado para la obtención del grado de Master en
Tecnologías Ambientales
Modalidad: “Investigación”

06 / 2022

Director:

Francisco Navarro Roldán

El Dr. **Francisco Navarro Roldán** con DNI: 30524975L, Profesor Titular de Biología Celular del departamento de Ciencias Integradas,

INFORMA:

Que el trabajo titulado “**Estudio de la eficacia biocida de productos de higienización industrial de última generación**” presentado por **D^a. Lidia Camacho Raposo con D.N.I.: 75.547.316K**, ha sido realizado en el “**Departamento de Ciencias Integradas de la Universidad de Huelva**”, bajo mi dirección, y autorizo su presentación y defensa como **Trabajo Fin de Máster** (Modalidad: Investigación), para el Máster Universitario en Tecnología Ambiental de la Universidad de Huelva.

En Huelva, a 01 de septiembre de 2022

**NAVARRO
ROLDAN
FRANCISCO JUAN
- 30524975L**

Firmado digitalmente por NAVARRO
ROLDAN FRANCISCO JUAN - 30524975L
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES,
serialNumber=IDCES-30524975L,
givenName=FRANCISCO JUAN,
sn=NAVARRO ROLDAN, cn=NAVARRO
ROLDAN FRANCISCO JUAN - 30524975L
Fecha: 2022.09.18 21:10:56 +02'00'

Fdo: F. Navarro Roldán

RESUMEN

Objetivo principal del presente TFM consiste en evaluar la eficacia de dos productos biocidas de última generación para su utilización como higienizantes de superficies en la industria alimentaria, siguiendo la Norma UNE-EN-13697:2015+A1. Para ello hemos empleado a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis* como microorganismos de ensayo tal como especifica la misma UNE para su certificación oficial. En una primera fase de la evaluación, hemos calculado la CMI y la CMB de cada una de las sustancias biocidas a estudiar frente a cada uno de los microorganismos ensayados, empleando diferentes rangos de tiempo de contacto entre el desinfectante y los microorganismos evaluados. En una segunda fase, hemos evaluado la eficacia de los biocidas sobre superficies, aplicando la metodología fijada por la norma UNE tanto bajo condiciones limpias (0,3 g/L de albúmina de suero bovino) como en condiciones sucias (3 g/L de albúmina de suero bovino). Durante el proceso de evaluación, hemos comparado la metodología descrita en la citada Norma UNE con varias modificaciones realizadas por nosotros a fin de reducir los tiempos de obtención de resultados, demostrando que el establecimiento de las condiciones experimentales y de la metodología permiten evaluar la eficacia como desinfectantes de los agentes biocidas estudiados siendo totalmente compatible con los protocolos establecidos por la Norma UNE-EN-13697:2015+A1, pero de forma más rápida y conveniente para lograr la certificación oficial de eficacia de un producto biocida. Por otra parte, los resultados obtenidos demostraron que hay una eliminación de los microorganismos testados en todas las condiciones, evidenciando una buena acción bactericida de ambos productos biocidas.

ABSTRACT

The main objective of this TFM is to evaluate the efficacy of two latest generation biocidal products for use as surface sanitizers in the food industry, following the UNE-EN-13697:2015+A1 Standard. For this purpose, we have used *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis* as test microorganisms as specified by the same UNE for its official certification. In the first phase of the evaluation, we calculated the MIC and BMC of each of the biocidal substances to be studied against each of the microorganisms tested, using different ranges of contact time between the disinfectant and the microorganisms evaluated. In a second phase, we evaluated the efficacy of the biocides on surfaces, applying the methodology established by the UNE standard under both clean conditions (0.3 g/L bovine serum albumin) and dirty conditions (3 g/L bovine serum albumin). During the evaluation process, we have compared the methodology described in the aforementioned UNE Standard with several modifications made by us in order to reduce the time to obtain results, demonstrating that the establishment of the experimental conditions and the methodology allow us to evaluate the efficacy of the biocidal agents studied as disinfectants, being fully compatible with the protocols established by the UNE-EN-13697:2015+A1 Standard, but in a faster and more convenient way to achieve the official certification of efficacy of a biocidal product. On the other hand, the results obtained showed that there is an elimination of the microorganisms tested in all conditions, showing a good bactericidal action of both biocidal products.

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	21
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración mínima bactericida (CMB), para cada uno de los microorganismos a ensayar con un agente biocida dado.	25
3.2. Cálculo de la curva de letalidad respecto del tiempo, es decir, la determinación del tiempo que necesita un biocida para eliminar o matar a un microorganismo dado.	25
3.3. Determinación de la capacidad microbiocida de los agentes biocidas sobre superficies no porosas según Normas AENOR,	25
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
4.1. Adquisición y reconstitución de cultivos microbiológicos.	27
4.1.1. <i>Resuspensión y criopreservación del inóculo.</i>	27
4.1.2. <i>Medios de cultivos</i>	27
4.1.3.- <i>Microorganismos empleados:</i>	29
4.1.4.- <i>Agentes Biocidas Evaluados:</i>	30
4.3. Cálculo de la curva de letalidad respecto al tiempo.	31
4.4. Determinación de la efectividad de los agentes biocidas sobre superficies no porosas según Normas AENOR, con modificaciones.	32
4.4.1.- <i>Superficies de ensayo.</i>	32
4.4.2.- <i>Sustancias interfirientes.</i>	32
4.4.3.- <i>Neutralizador</i>	33
4.4.4.- <i>Suspensiones de los micoorganismos de ensayo.</i>	33
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
5.1.-Determinación de la dilución mínima efectiva de los agentes biocidas . 37	
5.2.-Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración mínima bactericida (CMB) para los dos agentes biocidas..... 38	
5.3. Cálculo de la curva de letalidad respecto al tiempo para los dos agentes biocidas dados.	49

5.4. Determinación de la capacidad microbiocida de los agentes biocidas sobre superficies no porosas según Normas AENOR, con modificaciones.	59
6. CONCLUSIONES	73
7. RECURSOS BIBLIOGRÁFICOS	75
7.1. Libros, revistas y artículos científicos	75
7.2. Normativas y otros textos	79
7.3. Páginas web	79

1. INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2020), la resistencia a los agentes antimicrobianos “*es una amenaza para la salud y el desarrollo mundial*” y ha sido declarada como una de las 10 amenazas de salud pública a las que se enfrentará la humanidad en las próximas décadas. Dicha resistencia a los antimicrobianos se ha llegado a convertir en un problema tan serio debido a la combinación de un uso incorrecto y excesivo de dichos productos y a la falta de prevención y control de las enfermedades infecciosas, lo que ha provocado la expansión de los microorganismos patógenos y la aparición de nuevos patógenos farmacorresistentes.

Se denomina “*fármacos antimicrobianos*”, a aquellos que matan a los microorganismos en el hospedador (bactericidas) o bien a los que controlan su crecimiento (bacteriostáticos). Los productos antimicrobianos deben presentar una toxicidad selectiva, de forma que puedan actuar sobre los microorganismos sin causar daño en las células del hospedador (Madigan et al., 2014). Este efecto es debido a las diferencias biológicas que existen entre las células de los organismos infectantes (patógenos) y las células del hospedador. Según Madigan (2014) en el mundo se fabrican y consumen anualmente más de 10.000 toneladas de agentes antimicrobianos, los cuales pueden actuar sobre bacterias (antibacterianos o antibióticos), virus (antivirales), hongos (antifúngicos) y parásitos (antiparasitarios) que infectan a seres humanos, animales y plantas, aunque dentro de éstos, el grupo más importante por su consumo es el de los antibióticos (OMS, 2020).

Para su estudio, podemos clasificar a los agentes antibacterianos en dos grandes grupos: a) los antimicrobianos producidos originariamente por microorganismos, los llamados antibióticos clásicos como la penicilina, las tetraciclinas, etc. y b) los antimicrobianos sintéticos o de nueva generación, capaces de actuar, no sólo contra bacterias, sino también contra hongos, virus y algunos parásitos simultáneamente.

Por otro lado, la actividad de una sustancia antimicrobiana está definida por su espectro de acción, es decir, el conjunto de agentes patógenos sobre los que puede actuar. En la actualidad la inmensa mayoría de los antibióticos actúan sobre varias bacterias y numerosas bacterias son afectadas por varios antibióticos diferentes que se consideran, por tanto, de amplio espectro (Flórez et al., 1992). Bajo esta perspectiva se desarrolla el problema de la resistencia a los antimicrobianos.

Desde el punto de vista farmacológico, podemos diferenciar dos tipos de resistencia antimicrobiana: a) la resistencia natural, que es el fenómeno por el que un

microorganismo no se ve afectado por el agente antimicrobiano ya que no posee el lugar de acción o receptor sobre el que actuar (Flórez et al., 1992) y b) la resistencia adquirida, que según la OMS, es la que pueden presentar los microorganismos a lo largo del tiempo, de forma que dejan de ser sensibles a los agentes antimicrobianos, haciendo más difícil el tratamiento de las infecciones, que se van a prolongar en el tiempo, lo que aumenta la capacidad de propagación de dichas infecciones e incluso la letalidad, de forma que cirugías que antes eran seguras se pueden convertir en mortales, e infecciones que antes se curaban con un antibiótico, ahora son más difíciles de tratar, necesitando del empleo de varios tipos de antibióticos diferentes.

Se ha descrito que la resistencia a los antibióticos se puede adquirir mediante dos mecanismos. Uno de ellos es mediante mutación cromosómica, que consiste en un cambio en la secuencia de nucleótidos de un gen del cromosoma bacteriano, por el que la bacteria desarrolla una resistencia a un antibiótico que antes no tenía. Estos son cambios espontáneos, de carácter adaptativo, que en principio pueden suceder sin la presencia del antibiótico. El problema aparece cuando exponemos las bacterias, que han sufrido una mutación, al antibiótico, produciéndose una selección de los mutantes resistentes, ya que el antibiótico elimina las que son sensibles. El otro mecanismo es por transferencia genética, en la que se transfieren, de una bacteria a otra, genes que portan la resistencia a antibióticos, a través de procesos de transformación, transducción por bacteriófagos y de conjugación por plásmidos, constituidos por fragmentos de ADN extracromosómicos o por transposones, que son elementos del ADN, que pueden ser movilizados de forma independiente al genoma bacteriano, pudiendo pasar de un plásmido a otro, de un plásmido a un cromosoma y ser vehiculizados por bacteriófagos, como ocurre con determinados géneros bacterianos como los *Staphylococcus*. Por otro lado, los transposones pueden transportar la resistencia a uno o bien a varios antibióticos (Flórez et al., 1992).

La existencia de bacterias resistentes ha permitido la aparición de cepas multirresistentes, denominadas “superbacterias”, que no pueden tratarse con los agentes antimicrobianos actuales y que pueden surgir a partir de viajes internacionales donde los viajeros retornan a su país de origen colonizados o infectados por microorganismos resistentes a los antimicrobianos, como es el caso del gen de la β -lactamasa NDM que se expandió a Gran Bretaña y otros países, a través de viajeros que necesitaron asistencia médica en la India (Ruiz, 2022). Pero estas cepas multirresistentes también pueden surgir por el uso indiscriminado de los antibióticos por parte de la población, mediante la automedicación o la prescripción masiva, es decir, sin realizar un diagnóstico adecuado, sino que se prescriben antibióticos de amplio espectro en lugar de hacer una identificación previa del microorganismo causante de la patología infecciosa. Un artículo publicado en El País (Criado, 2018), explica que España es el país avanzado que más antibióticos consume del mundo. Estas afirmaciones están basadas en un artículo publicado en la revista científica PNAS (Klein et al., 2018) donde se analiza el consumo global de antibióticos

a nivel mundial desde el año 2000 al 2015. Según este estudio, el aumento del consumo de antibióticos a nivel global en el periodo analizado ha sido de un 65% y estima que se doblará para el año 2030.

Muchos de los antibióticos utilizados en la práctica clínica derivan de bacterias, sobre todo de bacterias ambientales, entre las que predominan las actino-bacterias del género *Streptomyces*. Para poder competir con éxito en ecosistemas con una alta densidad bacteriana y una lucha constante por los recursos, algunas bacterias desarrollan la capacidad de producir sustancias que matan a sus competidoras. Para que esta ventaja competitiva de producir antibióticos fuera eficaz, tuvo que ir necesariamente acompañada de la capacidad de sobrevivir en su presencia, es decir, la aparición de los primeros genes de resistencia, probablemente fuera sincrónica a la de los antibióticos, como adaptación a un medio con moléculas antibacterianas elaboradas por bacterias vecinas o como protección de las que ellas mismas producían (Perry et al, 2016).

Hay varios factores que agravan la amenaza de la resistencia a antibióticos a nivel global. Por un lado, las bacterias poseen una elevada velocidad de reproducción, de forma que en media hora y en las condiciones óptimas, son capaces de duplicar su población. Este hecho facilita la selección natural y la adaptación a un medio hostil en poco tiempo (Oteo, 2019). Por otro lado, está la gran capacidad de las bacterias de acumular diferentes mecanismos de resistencia, haciendo que haya bacterias multirresistentes, frente a las cuales no tenemos un tratamiento antibiótico adecuado (Falco et al., 2015). Pero además, las bacterias poseen una elevada capacidad de diseminación entre diferentes pacientes, instituciones y regiones geográficas. Algunos ejemplos son la existencia de clones multirresistentes de alto riesgo epidemiológico, como las cepas ST258 de *Klebsiella pneumoniae* (Mathers et al, 2015) o las cepas ST175 de *Pseudomonas aeruginosa* (Oliver et al, 2015), que contienen plásmidos portadores de varios genes de resistencia que se transfieren entre bacterias incluso de diferentes especies. Así mismo, se ha descrito que las bacterias han desarrollado mecanismos para hacerle frente a los biocidas, como es la utilización de bombas de eflujo, que son utilizadas por éstas para expulsar de su interior sustancias que les son tóxicas y que fueron descubiertas cuando se estudiaban los mecanismos de resistencias a determinados antibióticos como las tetraciclinas (Li, Livermore y Nikaido, 1994). De todo lo anterior se deduce que la resistencia a los antimicrobianos es un problema complejo, multifactorial y de rápida evolución, que no sólo depende del hombre, sino también de la cadena alimentaria, el medio ambiente y los animales, ya sean los domésticos, los salvajes o los de granjas (Oteo, 2019).

Por iniciativa de la OMS, en 2015 se establece un Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos (PAM). El Plan fue posteriormente refrendado por los órganos rectores de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

En España y a tenor la Resolución del Parlamento Europeo del 9 de mayo de 2011, en la Comunicación de la Comisión Europea del 17 de noviembre de 2011 se establece un Plan de Acción sobre Resistencias Antimicrobianas y cómo se debe abordar conjuntamente desde la salud humana y veterinaria. En el Plan de Acción sobre Resistencias Antimicrobianas, se incluyen 12 acciones que se identifican como vitales para la lucha contra las resistencias, que deberán ser abordadas en periodos de 5 años, con revisiones de los objetivos alcanzados y modificaciones que se tienen que llevar a cabo para aquellos objetivos fijados que no se han alcanzado. El “Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de resistencias a los antibióticos” (PRAN) en España, es aprobado por la Secretaría General de Sanidad y Consumo y la Secretaría General de Agricultura y Alimentación, y su coordinación se realiza a través de la AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios) con la colaboración de Organizaciones Colegiales, Universidades y Sociedades Científicas (Seimc, 2014). Las líneas de acción del PRAN se centran en los siguientes puntos : a) Vigilancia del consumo y de las resistencias a los antibióticos, mediante el control y conocimiento de los hábitos de prescripción y de consumo, y categorización de los antibióticos, no sólo a nivel de personas sino también a nivel veterinario, b) Control de la resistencia a los antibióticos, con la publicación de Guías Terapéuticas de Antimicrobianos tanto en sanidad animal como en salud humana, c) Puesta en marcha de medidas alternativas de prevención y tratamiento, como recomendaciones de actuación, a todos los niveles, para prevenir infecciones, programas de prevención y promoción de pruebas de diagnóstico rápido, para mejorar la prescripción antibiótica, d) Fomento de la investigación, para mejorar el conocimiento sobre la resistencia antibiótica e) Formación de los profesionales sanitarios y veterinarios y por último f) Campañas de comunicación, dirigidas tanto a la población en general como a población específica, mediante redes sociales, campañas publicitarias, etc.

Esta situación es pronosticada en el llamado Informe O’Neill (2014) que, encargado por el Gobierno británico, considera que en 2050 la resistencia a los antimicrobianos supondrá la primera causa de muerte en el mundo y estima que cada año mueren en torno a 700.000 personas por resistencias a los antimicrobianos, por enfermedades como infecciones bacterianas, VIH, malaria o tuberculosis. Además, el informe aporta datos y cifras del coste económico que dichas resistencias pueden generar para las economías de los países, y establece unas líneas de actuación para tratar de frenar el problema de las resistencias microbianas, que podríamos resumir en las siguientes:

- Campañas públicas de concienciación, cuyo objetivo sea que la población demande menos antibióticos y los médicos y veterinarios sólo los prescriban si son realmente necesarios.
- Mejorar la higiene y prevenir la propagación de infecciones, primero facilitando a las personas el acceso a agua limpia y a los servicios sanitarios y segundo

limitando las estancias en los hospitales, para evitar que aparezcan las superbacterias. Se recomienda el gesto más simple de higiene, como es el lavado de manos frecuentemente.

- Reducir el uso innecesario de antibióticos en la ganadería y su diseminación por el medio ambiente, ya que una parte importante de los antibióticos empleados en la agricultura y ganadería está destinada a prevenir enfermedades o bien a mejorar el crecimiento animal. Además, el consumo de alimentos tratados con antimicrobianos afecta a la salud de personas y animales, aumentando la resistencia a los antibióticos. Así, para esta línea de acción concreta, dicho informe O'Neill propone reducir en un plazo de 10 años, el uso innecesario de antibióticos en la agricultura y la ganadería, apoyando el desarrollo económico de los países, restricciones en el uso de determinados tipos de antibióticos y por último, mejorar la transparencia de los productores de alimentos, obligando a indicar qué han utilizado, para que seamos los consumidores los que decidamos qué comprar. Pero el problema de las resistencias a los antibióticos es todavía mayor, ya que los antibióticos pueden llegar al medio ambiente mediante los sistemas de alcantarillado de fábricas de medicamentos, hospitales, escorrentías de unidades productoras de alimentos, etc. Por lo tanto, es necesario establecer medidas para evitar esta "contaminación ambiental", aumentando los controles y bajando los niveles máximos permitidos que se pueden detectar por ejemplo en las aguas residuales.

- Mejorar la vigilancia global del consumo de antimicrobianos y de su resistencia tanto de personas como de animales. Hasta hace poco los países no han investigado la resistencia a los antibióticos y por tanto no han establecido programas de vigilancia. En este sentido, es necesario aprovechar los avances informáticos, para desarrollar un buen sistema de vigilancia y mejorar los sistemas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. A raíz del informe O'Neill, son numerosos los artículos donde se documenta la relación directa que hay en el empleo de antibióticos en la agricultura, ganadería y pesca con el aumento de la resistencia a los antibióticos en humano, debido a la diseminación de las bacterias resistentes por el medio ambiente, y el paso al hombre a través del contacto con animales (O'Neill, 2015), el contacto directo e indirecto con desechos (Graham et al, 2009) y el consumo de alimentos (Grace, 2015), de forma que los gobiernos deberían limitar o regular la cantidad de estiércol procedente de las macrogranjas, rico en restos de antibióticos, que es utilizado como abono por los agricultores, sobre todo en vegetales que se consumen crudos (O'Neill, 2015). Este hecho tiene más importancia en los países de bajos y medianos ingresos, donde la prescripción por parte de los profesionales es indiscriminada, así como su uso por parte de agricultores y ganaderos, y desde donde las bacterias resistentes se diseminan a nivel mundial (Nadimpalli et al, 2018). Este hecho es confirmado por la OMS (2018) que afirma que la presencia de microorganismos resistentes se expande por personas, animales, alimentos y el medio ambiente (suelo, agua y aire) y luego se propaga ente personas y entre animales y personas.

- Promover nuevos y rápidos métodos de diagnóstico para detectar el uso innecesario y/o indiscriminado de antibióticos, incentivando la investigación y el desarrollo. En la mayoría de los casos, la forma de prescribir los antibióticos no ha cambiado mucho en los últimos 140 años (O'Neill, 2014), realizándose de forma empírica y sin cultivo previo, como se ha dicho anteriormente. Por ello, se hace necesario el uso de la tecnología y los avances científicos para poder informar a los médicos y veterinarios de cuál es el tratamiento antibiótico más adecuado para tratar una enfermedad, evitando emplear los antibióticos de amplio espectro si no son realmente necesarios.
- Promover el uso y desarrollo de vacunas y tratamientos alternativos a los antibióticos. A partir del descubrimiento de la penicilina en 1928, el desarrollo de los nuevos antibióticos sigue dos caminos: Por un lado, se hacen modificaciones en la molécula original de penicilina, obteniéndose antibióticos que actúan sobre un espectro bacteriano más amplio y por otro lado, se sintetizan nuevas moléculas cuya estructura química nada tiene que ver con los antibióticos hasta ahora conocidos, y que son capaces de actuar, no solo contra las bacterias, sino también sobre diversos tipos de hongos, virus y parásitos. En este caso, las moléculas nuevas muestran una eficacia más específica sobre el espectro microbiológico (Flórez et al., 1992).
- Mejorar el salario y reconocimiento de las personas que trabajan en el ámbito de las enfermedades infecciosas. Las especialidades que se dedican al tratamiento de las enfermedades infecciosas o bien al análisis de las reacciones adversas a medicamentos, son especialidades con poco prestigio profesional y generalmente poco demandadas.
- Establecer un Fondo de Innovación Global para la investigación no comercial, con inversiones tanto privadas como públicas en las que se apoye el "I+D", tanto de nuevos medicamentos como de nuevos sistemas de diagnóstico más eficaces.

En el último informe publicado por la Organización Mundial de la Salud (abril/2021) de los 43 antibióticos que están actualmente en fase de desarrollo clínico, ninguno de ellos resuelve suficientemente el problema de la farmacorresistencia de las bacterias más peligrosas del mundo. La OMS concluye que *"en general, los productos en fase de desarrollo clínico y los antibióticos recientemente aprobados son insuficientes para hacer frente al problema que supone la creciente aparición y propagación de la resistencia a los antimicrobianos"* y propone la investigación de otro tipo de terapias diferente de los agentes antimicrobianos tradicionales, como son el empleo de anticuerpos, que favorecen la respuesta inmunitaria del paciente o de bacteriófagos, que disminuye la capacidad de agresión de las bacterias.

En el 2020, la OMS elaboró una lista de patógenos prioritarios, que será revisada cada cinco años, y que establece un seguimiento de los siguientes microorganismos, debido a su potencial peligro. Así, se señala como muy preocupante la resistencia de las bacterias Gram negativas a los antibióticos del grupo de los

carbepenos. Las bacterias Gram negativas se caracterizan por presentar por fuera de su pared celular de peptidoglicanos, una membrana externa rica en lipopolisacáridos que forman una barrera densa que restringe la penetración de numerosos antibióticos hacia el espacio periplásmico y citosol bacterianos. De este modo, para ser eficaces contra las bacterias Gram negativas, los antibióticos deben penetrar dicha membrana externa, que actúa de protección extra (Hauser, 2019). Dentro de este grupo se encuentran las bacterias pertenecientes a la familia de *Enterobacteriaceae*. Muchas bacterias pertenecientes a esta familia, forman parte de la microbiota normal del hombre y sólo producen enfermedades oportunistas, aunque hay alguno de sus miembros que son patógenos estrictos, siendo responsables de numerosas infecciones gastrointestinales y urinarias. Las bacterias de la familia de las *Enterobacteriaceae* tienden a producir unas enzimas llamadas β -lactamasas, cuya función es la de degradar los antibióticos β -lactámicos. Dentro de los antibióticos β -lactámicos se incluyen una gran cantidad de moléculas que tienen como origen común la sustancia descubierta por Fleming en 1928, producida por el hongo del género *Penicillium* y bautizada como penicilina (Flórez et al., 1992).

La penicilina, desde el punto de vista químico, está constituida por un anillo β -lactámico. Las modificaciones en la estructura básica de este anillo dan lugar al desarrollo de un grupo de antibacterianos, que se caracterizan por ser de amplio espectro y amplio uso en la práctica clínica, al tener unas características farmacocinéticas muy favorables, con escasos efectos secundarios. Dentro del grupo de los antibióticos β -lactámicos se incluyen las penicilinas (bencilpenicilina, ampicilina, amoxicilina, meticilina, etc.), cefalosporinas (cefuroxima, cefaclor, cefixima, etc.), carbapenemes (imipenem) y monobactámicos. Algunos de los antibióticos de este grupo son formulados junto con inhibidores de las β -lactamasas, como es el ácido clavulánico (Flórez et al., 1992). Pero todos los antibióticos de este grupo actúan de la misma forma y es evitando la formación de la pared celular al interferir en su formación, por lo que al adquirir la resistencia a uno de ellos, se produce resistencia en mayor o menor medida a todos los antibióticos del grupo. Básicamente los antibióticos β -lactámicos, actúan inhibiendo la última etapa de formación del peptidoglicano, impidiendo la reacción de transpeptidación. Se cree que el mecanismo utilizado es la analogía estructural que existe entre β -lactámicos y la porción D-alanil-D-alanina de la cadena polipeptídica lateral, impidiendo la unión de las cadenas de peptidoglicano que forman la pared celular de las bacterias, que mueren por lisis. La resistencia a los β -lactámicos puede ser intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca se refiere al mecanismo de resistencia que es característico de la estructura o fisiología de la especie bacteriana, por ejemplo, las porinas en la membrana externa de todas las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* no permite el paso de ampicilina al espacio periplásmico, por lo cual todas las cepas son resistentes a este antibiótico (Hauser, 2019). Mientras que la resistencia adquirida ocurre cuando una bacteria que fue sensible a un antibiótico y posteriormente adquiere una mutación o recibe material

genético exógeno que le permite resistir la actividad de dicho antibiótico, por ejemplo, la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* es susceptible al carbapenem imipenem, el cual llega hasta el lugar de acción, las PBP (Proteínas fijadoras de penicilinas), mediante el paso del antibiótico a través de la porina. Sin embargo, suelen ocurrir mutaciones espontáneas que afectan a la permeabilidad del imipenem, generando resistencias adquiridas (Hauser, 2019). En la práctica, la resistencia intrínseca implica que todas las cepas de una especie de bacteria son resistentes a un antibiótico dado, mientras que la resistencia adquirida afecta sólo a algunas cepas de una especie bacteriana (Hauser, 2019).

Según la OMS (2020), cabe destacar la alta tasa de resistencia al ciprofloxacino, antibiótico utilizado habitualmente para tratar infecciones urinarias, para *Escherichia coli* y para *Klebsiella pneumoniae*, ambas bacterias intestinales. En el caso de *K. pneumoniae* se ha descubierto resistencia al tratamiento de último recurso o de última línea (los antibióticos carbapenémicos, como la colistina) y que se encuentra propagada a todas las regiones del mundo, por lo que para determinadas infecciones no existe actualmente un tratamiento antibiótico eficaz.

Pero el problema de las multiresistencias no solo lo presentan los bacilos Gram negativos de la familia *Enterobacterales*, si no que por ejemplo otra de las bacterias sobre la que la OMS pone el foco es *Staphylococcus aureus*, bacteria que forma parte de nuestra microbiota cutánea y es también causa habitual de infecciones tanto en la comunidad como en los centros de atención de salud. Los pacientes con infecciones por *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) tienen una probabilidad de morir un 64% mayor, que los pacientes con infecciones farmacológicamente sensibles.

Destacan también la resistencia generalizada en cepas altamente variables de *N. gonorrhoeae*, que hace difícil su control en la población. Actualmente, en la mayoría de los países, la cefalosporina de amplio espectro inyectable (ceftriaxona) es la única monoterapia empírica que queda contra la gonorrea, según la OMS (2020).

Lo mismo ocurre con cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, causante de la tuberculosis y resistente a los antibióticos. La OMS indica que, en 2018, se detectó en todo el mundo, aproximadamente medio millón de nuevos casos de tuberculosis resistente a la rifampicina (TBRR), la gran mayoría de los cuales presentan tuberculosis multiresistente (TBMR), una forma de tuberculosis resistente a los dos antituberculosos más potentes.

Como es lógico, el problema de la farmacorresistencia no sólo se presenta con las bacterias, sino que también se extiende a los parásitos patógenos como *P. falciparum*, lo que supone una amenaza para el control antipalúdico y provoca un aumento de la morbilidad y mortalidad por paludismo. Así mismo, se ha descrito un aumento de la prevalencia de las infecciones fúngicas farmacorresistentes, especialmente en pacientes con otras infecciones subyacentes (por ejemplo, el VIH).

La farmacorresistencia de *Candida auris*, una de las causas más habituales de infección fúngica invasiva, ya es generalizada y se tiene constancia creciente de su resistencia al fluconazol, la anfotericina B y el voriconazol, así como de la resistencia emergente a la caspofungina. Por último, la resistencia a los antivíricos es motivo creciente de preocupación en las poblaciones de pacientes inmunodeprimidos, en los que la reproducción vírica es continua y la exposición prolongada a fármacos, conduce a la selección de cepas resistentes.

Para realizar los estudios sobre bacterias en el laboratorio, es necesario suministrarles todos los requerimientos nutricionales para que puedan proliferar “in vitro”. Para ellos se utilizan los medios de cultivo que pueden ser definidos o sintéticos, es decir aquellos cuya composición química de todos los componentes se conoce y se añade de forma sencilla, como por ejemplo glucosa como fuente de carbono y energía, sal de amonio como fuente de nitrógeno, etc. (Hernández et al, 2006). Sin embargo, hay medios de cultivo cuya composición química exacta no se conoce. Son los denominados medios complejos. Se utilizan cuando se desconocen las necesidades nutricionales concretas de los microorganismos a cultivar. Son muy útiles, ya que un único medio complejo puede satisfacer las necesidades de diversos microorganismos. Estos medios se pueden presentar en estado sólido o líquido, según lleven adicionado agar o no (Prescott, 2008). Para realizar recuento, el medio se tiene que solidificar mediante la adición de agar, polímero sulfatado extraído de las algas rojas compuesto por D-galactosa, 3,6-anhidro-L-galactosa y ácido D-glucurónico. Es un buen agente solidificante ya que la mayoría de las bacterias no lo pueden degradar. Se suele añadir en una proporción entre el 1,0% y 2,0%, normalmente al 1,5% (Prescott, 2008).

2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha descrito que la aparición de la resistencia no obedece sólo al uso indiscriminado de antibióticos, sino que la exposición de las bacterias a los biocidas, sobre todo los desinfectantes, aumenta el problema de la aparición de bacterias multirresistentes, al favorecer su selección (Chacón y Rojas ,2020). Ya en la década de los 50 del siglo pasado, se notifican la aparición de las primeras cepas bacterianas resistentes a los biocidas derivados del amonio cuaternario, demostrándose la capacidad de los microorganismos de modificar la composición lipídica de sus membranas para resistir la acción de los agentes biocidas (Chaplin, 1952). Pero esta situación ha ido en aumento en los últimos 5 años (Bravo et al, 2019).

Según el Ministerio de Sanidad, los biocidas se describen como sustancias o sus mezclas, cuya finalidad es la de destruir, contrarrestar o neutralizar cualquier organismo nocivo o ejercer sobre él un efecto de control. Podemos clasificar a los agentes biocidas en cuatro grupos principales: desinfectantes, conservantes, plaguicidas y otros biocidas.

Las sustancias biocidas se diferencian de los antibióticos en que éstas son sustancias químicas sintéticas, generalmente de amplio espectro, que se utilizan para inhibir o matar microorganismos en suspensión o en superficies, mientras que los antibióticos, son generalmente sustancias de origen natural, sintetizados por organismos vivos, efectivos a bajas dosis, que actúan sobre un número limitado de microorganismos y que se aplican sobre o dentro de los tejidos vivos. La eficacia de los biocidas y el tipo de microorganismo que inhiben varía dependiendo de las concentraciones a la que se aplique y en muchas ocasiones del tiempo de exposición. Aunque el mecanismo de acción es diferente, el resultado del empleo de ambas sustancias es el mismo: la eliminación de los microorganismos. Sin embargo, los biocidas se pueden emplear a concentraciones mayores a su CMI (concentración mínima inhibitoria) o CMB (concentración mínima bactericida), para acabar con los microorganismos y son de espectro muy amplio (White y McDermott, 2001).

Los biocidas también se pueden clasificar en función de su composición, que estaría relacionada con su mecanismo de acción. Los más comunes son los derivados del amonio cuaternario (cloruro de benzalconio y sus derivados), las biguanidas (clorhexidina), los fenoles (triclosán), los alcoholes, los aldehídos (glutaraldehído), los compuestos halogenados (yodo y cloro) y el peróxido de hidrógeno (Chacón y Rojas, 2020).

Los biocidas derivados del amonio cuaternario, pueden actuar como tensioactivos, lo que les permite unirse de forma irreversible a fosfolípidos y proteínas de membrana, lo cual provoca una alteración de la permeabilidad de ésta y una disfunción de la cadena respiratoria celular. La resistencia cruzada de estos compuestos y los antibióticos está extensamente documentada (Wessels y Ingmer, 2013).

Las biguanidas, como es la clorhexidina, se asocian fuertemente con sitios aniónicos (fosfolípidos ácidos y proteínas) expuestos sobre la membrana y pared celular, lo que produce un desplazamiento de los cationes divalentes Mg^{2+} y Ca^{2+} de estas estructuras, que implica una disminución en la fluidez de la membrana y alteraciones osmóticas en la célula bacteriana (Gilbert y Moore, 2005). La clorhexidina resulta muy eficaz frente a bacterias Gram positivas (10 $\mu g/ml$) y Gram negativas (50 $\mu g/ml$), a pH entre 5 y 8, aunque algunas bacterias, como *P. aeruginosa* necesitan dosis superiores a 50 $\mu g/ml$. Impide la germinación de esporas y su actividad puede disminuir algo en presencia de proteínas y materia orgánica (Flórez et al, 1992). Es un compuesto catiónico y por tanto su acción se neutraliza por jabones y detergentes iónicos (Ryan y Ray, 2011).

En el caso de los fenoles, como el triclosán, que son activos frente a Gram positivas, Gram negativas y micobacterias, el mecanismo de acción implica la producción de alteraciones en la membrana bacteriana pero además el compuesto puede ser absorbido por difusión hacia el citoplasma bacteriano y afectar directamente las vías metabólicas de síntesis de ácidos grasos, inhibiendo enzimas como la NADH-reductasa dependiente de ácidos grasos (Schweitzer, 2001).

El mecanismo de acción de los alcoholes se asocia a la generación de daños en la membrana y a las proteínas bacterianas, lo cual genera su desnaturalización. Reduce la tensión superficial de las bacterias, propiciando la lisis (Gilbert y McBain, 2003). Se potencia su acción en combinación con el agua y actúa frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas y tiene algunas propiedades virucidas, pero pocas acciones fungicidas (Flórez et al, 1992).

Los aldehídos, como el glutaraldehído, afectan a proteínas, principalmente de la pared y membrana bacteriana, actuando sobre grupos tioles, aminos y sulfidrilos. Al unirse a estos grupos “fijan” estructuras y enzimas e inhiben funciones básicas de supervivencia bacteriana (Gilbert y McBain, 2003).

Por último, los compuestos halogenados y el peróxido de hidrógeno son sumamente reactivos y actúan como oxidantes de proteínas y componentes celulares. Son activos frente a todos los organismos a temperatura ambiente, algunos de ellos tienen capacidades mutagénicas sobre los microorganismos (Flórez et al, 1992).

Otro tipo de resistencia que pueden desarrollar las bacterias a los biocidas y también a los antibióticos es gracias a la formación de biopelículas, que se pueden

definir como agregados adherentes, compuestos fundamentalmente por agua, los microorganismos y una matriz polimérica, constituida por polisacáridos. Estas biopelículas se adhieren a superficies bióticas y abióticas. Se ha demostrado que las cepas que producen biopelículas son casi 100 veces más resistentes a la acción de los antibióticos y de los biocidas (Gander, 1996).

La aparición de los microorganismos resistentes a los biocidas se produce de igual manera que la selección a los antibióticos, de forma que el uso o el abuso de los desinfectantes tanto a nivel industrial como en los domicilios, hace que las plantas de tratamiento de aguas residuales y las aguas residuales, se conviertan en reservorios de biocidas, en los que las bacterias entran en contacto a dosis subletales, favoreciendo la aparición de clones de resistencia (Chacón y Rojas, 2020).

Lo mismo que ocurre con los antibióticos, es imprescindible investigar el empleo de sustancias biocidas de última generación, capaces de eliminar microorganismos potencialmente patógenos de las superficies que se utilizan en la industria alimentaria.

La Norma AENOR (Norma UNE-EN-13697:2015+A1 -2020) describe el protocolo que se debe seguir para validar la efectividad de los agentes biocidas sobre determinadas superficies. Sin embargo, esta Norma no permite dilucidar la CMI ni la CMB ni permite el cálculo del tiempo de acción (curva de letalidad) para un determinado agente biocida, si no que sólo permite conocer la efectividad a una concentración dada. Además, el lento crecimiento microbiano que puede llevar varios días y la duración y complejidad de las pruebas diagnósticas, encarecen el costo de estos análisis. Por lo tanto, en la práctica, las empresas fabricantes de productos de higienización industrial se ven obligadas a invertir importantes partidas económicas con el objetivo de poder certificar sus productos mediante el método de ensayo-error. Esta es la razón por la que se hace necesario establecer un protocolo previo, que sea más rápido y eficaz que el proceso de certificación, para el estudio de la efectividad de un determinado agente biocida y que permita a las empresas del sector enviar a certificar sus productos con conocimiento previo de la dosis efectiva frente a los patógenos reglados.

En definitiva, la certificación oficial de la eficacia de un agente biocida frente a patógenos tipo, realizada por las empresas certificadoras, no trata de encontrar las condiciones óptimas bajo las que puede ser eficaz o no dicho biocida, sino que se limitará a probar su efectividad a una única concentración, facilitada por el fabricante. Esta situación obliga a los fabricantes a emprender un estudio previo de investigación y evaluación de la efectividad de sus productos, antes de recurrir a los laboratorios de certificación.

Por otra parte, los métodos oficiales que deben seguir las certificadoras, descritos en la Norma UNE, son extremadamente lentos, farragosos y caros, aunque de gran eficacia y reproducibilidad. En este sentido, consideramos que, además de

realizar un estudio de evaluación que pueda garantizar la futura certificación de un producto, sería muy conveniente poder diseñar un protocolo modificado del regulado por la Norma UNE, que permita analizar una batería de productos biocidas de forma más rápida y económica, sin perder eficacia ni reproducibilidad, ya que lo que se pretende en última instancia es aportar los datos necesarios a los fabricantes para que se pueda alcanzar la citada certificación oficial, en el caso de que los agentes biocidas sean efectivos.

Con la finalidad de dar solución a la problemática descrita, en el presente Trabajo de Fin de Máster hemos llevado a cabo la creación y optimización de protocolos de verificación de la efectividad de dos agentes biocidas, fabricados por una empresa que nos ha solicitado realizar su estudio, de forma que conozcamos las condiciones óptimas de uso, antes de someterlos a su verificación oficial.

Los productos biocidas para los que se realiza el ensayo se encuadrarían, según la clasificación de los biocidas que realiza el Ministerio de Sanidad, en el grupo principal 1: Desinfectantes, concretamente dentro del subgrupo 4: Desinfectantes para los equipos, recipientes, utensilios y superficies que están en contacto con los alimentos y piensos.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo consiste en evaluar la eficacia biocida de dos productos de higienización industrial de última generación, determinando las condiciones óptimas de utilización frente a los grupos de bacterias y hongos que se requieran para obtener una certificación oficial.

Para alcanzar este objetivo principal planteamos los siguientes objetivos secundarios:

3.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración mínima bactericida (CMB), para cada uno de los microorganismos a ensayar con un agente biocida dado.

3.2. Cálculo de la curva de letalidad respecto del tiempo, es decir, la determinación del tiempo que necesita un biocida para eliminar o matar a un microorganismo dado.

3.3. Determinación de la capacidad microbiocida de los agentes biocidas sobre superficies no porosas según Normas AENOR, como paso previo a la certificación oficial por la Norma UNE-EN-13697:2015+A1. Paralelamente valoraremos la efectividad de las modificaciones metodológicas que nos permitan reducir los tiempos de obtención de los resultados, siempre que éstos sigan siendo aptos para lograr la certificación oficial de los agentes biocidas testados.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Adquisición y reconstitución de cultivos microbiológicos.

Como paso previo a la realización del presente estudio, procedimos a obtener cepas de microorganismos que se encuentren tipificadas y validadas por un organismo oficial. Dichos microorganismos deben ser los que aparece en la Norma UNE-EN-13697:2015+A1, y su adquisición se realizó en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia (España).

4.1.1. Resuspensión y criopreservación del inóculo.

Para reconstituir el inóculo se siguieron las indicaciones facilitadas por la CECT. Todo el proceso se realizó con las máximas condiciones de esterilidad, para evitar contaminar los inóculos puros (CECT, 2011) y siguiendo las especificaciones según la American Type Culture Collection (ATCC). En todo caso respetando las medidas de seguridad biológica (INSST, 2001).

El inóculo reconstituido se cultivó en condiciones óptimas, a la temperatura 37 ± 1 °C entre 18-24 h, hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. La fase de crecimiento exponencial se determinó mediante medida espectrofotométrica a 625 nm, extrapolando a una curva de calibración Mc Farland para calcular las UFC.

Una vez se alcanzó la fase exponencial, se tomó cada inóculo crecido y se preservaron varias muestras alícuotas de cada microorganismo a -80°C donde pueden permanecer durante tiempo indefinido (Ocares y Castro, 2020).

En todos los casos, cada microorganismo fue crecido en su medio óptimo hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial, siendo ésta en la que se realizaron todos los ensayos.

4.1.2. Medios de cultivos

Gran parte del éxito de los estudios microbiológicos depende de la capacidad para cultivar y mantener microorganismos en el laboratorio. Para ello se utilizaron medios de cultivo comerciales. Estos medios de cultivo deben contener todos los nutrientes esenciales para el crecimiento del microorganismo de interés, como es una fuente de carbono, de nitrógeno, fósforo, azufre y minerales en cantidades adecuadas. (Prescott, 2008).

En nuestro caso y según la Norma UNE-EN 13697:2015+A1 se utilizó un medio complejo de Agar de soja triptona (TSA), para recuento de cepas bacterianas y realización de recuento de viables.

La triptona se obtiene por degradación pancreática de la caseína y es la fuente fundamental de nitrógeno. La peptona de soja se obtiene a partir de la digestión con papaína de la harina de soja, y se utiliza como fuente de carbono, energía y nitrógeno en forma de aminoácidos libres o pequeñas cadenas de péptidos y también aporta vitaminas al medio de cultivo (Prescott, 2008).

Como medio de cultivo líquido se va a empleó caldo de soja triptona (TSB), cuya composición es similar al medio de cultivo TSA, pero no contiene agente gelificante. Este medio de cultivo contiene, glucosa (dextrosa) como fuente de energía y fosfato potásico dibásico que actúa como tampón controlando el pH. El fosfato también se utilizará por parte de los microorganismos para la formación de los ácidos nucleicos y los fosfolípidos de membrana. El potasio es necesario para la actividad de varias enzimas (Madigan et al, 2014).

El agua utilizada para preparar los medios de cultivo debe ser destilada recién preparada en instrumental de vidrio y no desmineralizada (UNE 13697:2015+A1, 2020). Es importante que sea destilada, porque ciertos cationes como Ca^{2+} o Mg^{2+} pueden formar sales insolubles con otros componentes del medio, como los fosfatos, sobre todo, durante la esterilización, que pueden alterar la composición del medio de cultivo (Prescott, 2008).

Para el mantenimiento de cepas fúngicas, esporulación y realización de recuento de viables, según la Norma UNE-EN 13697:2015+A1 se utilizó un medio complejo de Agar extracto de malta (MEA).

Todos los medios de cultivo se preparan disolviendo la cantidad de cada uno de los componentes por separado o bien si es un medio de cultivo comercial, pesando la cantidad del medio de cultivo necesaria para el volumen que se va a preparar. Después de disolver bien los componentes, se comprueba el pH del medio de cultivo y se ajusta, si fuera necesario adicionando NaCl o HCl, previamente preparado. Según la Norma UNE- EN 13697:2015+A1, el pH después de la esterilización debe ser de $7,2 \pm 0,2$ medido a 20°C para medios bacterianos y $5,6 \pm 0,2$ medido a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ para medios utilizados para crecimiento de hongos.

Para preparar los medios de cultivo con agar, se deja enfriar el medio de cultivo ya esterilizado y se dispensa en placas de Petri, previamente rotuladas. Las placas preparadas y solidificadas se sellan y se guardan en el refrigerador, entre $2-8^\circ\text{C}$. En estas condiciones, pueden conservarse entre 4-6 semanas (Hernández et al, 2016).

4.1.3.- Microorganismos empleados:

Se va a determinar la actividad bactericida de los compuestos biocidas del estudio, frente los siguientes microorganismos según las especificaciones UNE 13697:2015+A1, 2020:

1.-*Pseudomonas aeruginosa*, bacilo Gram negativo, móvil debido a la presencia de un flagelo polar. Aerobio, aunque se puede desarrollar en condiciones de anaerobiosis, utilizando nitrato como sustrato. Se caracteriza por la producción de pigmentos. Ampliamente distribuida en la naturaleza, la podemos encontrar en el suelo húmedo, agua de ríos, duchas, piscinas, aguas residuales, etc., vegetales, animales, materiales o fómites húmedos y en humanos formando parte de su flora bacteriana. Es un patógeno oportunista. Cabe destacar que en ambientes húmedos, se adhiere a las superficies formando una biopelícula, entendiéndose como un acúmulo de bacterias y material extracelular que contamina las superficies y dispositivos, provocando taponamiento de las conducciones y filtros (INSST, 2016).

2.-*Escherichia coli*, bacteria Gram negativa que coloniza el intestino de humanos y animales. Se considera integrante de la flora normal, pero hay descritos seis grupos de *E. coli* productora de diarrea: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC). Es un patógeno oportunista capaz de causar casos aislados o brotes de diarrea, síndrome urémico hemolítico, colitis hemorrágica y cuadros de disentería, principalmente en niños y grupos susceptibles de población (Rodríguez-Ángeles, 2002).

3.-*Staphylococcus aureus*, bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, que se puede encontrar en el hombre, mamíferos y aves como parte de su flora saprófita bacteriana y también en alimentos y agua. Presenta una elevada supervivencia sobre tejido orgánico y de días sobre superficie de metal y vidrio. Es el responsable de muchos casos de enfermedad nosocomial ya que desarrolla con frecuencia resistencia a los antibióticos (INSST, 2012).

4.-*Enterococcus hirae*, coco Gram positivo perteneciente al grupo de las bacterias lácticas, que produce un metabolito derivado de la fermentación de azúcares. Estos compuestos, bacteriocinas, tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos como cepas de *Listeria*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Vibrio*, por lo que pueden ser aplicadas como conservantes naturales para proteger la calidad y la vida útil de alimentos y bebidas (Vallejo et al, 2020).

5.-*Bacillus subtilis*, bacilo Gram positivo y aerobio, que se encuentra habitualmente en el suelo. Las bacterias pertenecientes el género *Bacillus*, son formadoras de endospora protectora en su interior, siendo resistentes al calor, sustancias químicas agresivas y a la radiación, soportando condiciones desfavorables para su crecimiento hasta que esta situación se modifique. Pueden ser dispersadas

por el medio ambiente a través del viento, el agua o por los animales, ya que se puede encontrar en su intestino (Madigan et al, 2014).

La actividad fungicida o levaduricida se ha evaluado en las cepas:

6.-*Candida albicans*, es un hongo dimórfico, es decir, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento. Lo hará como levadura, normalmente a 37°C en el huésped, y como hongo de aspecto filamentoso a 25°C en la naturaleza. El dimorfismo le permite evadir los mecanismos de defensa relacionados con la inmunidad celular del huésped. En forma de levadura se comporta como saprofita, mientras que, en forma de hongo filamentoso, se comporta como un parásito patógeno. Forma parte de la microflora intestinal, de la piel, tracto genitourinario, etc., del hombre y se puede encontrar en ambientes húmedos con suciedad (INSST, 2021).

7.-*Aspergillus brasiliensis*, es un hongo filamentoso hialino, saprofita y es uno de los principales hongos productores de micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos y secretados por el hongo para la degradación de la materia orgánica. Crece en cualquier tipo de sustrato, especialmente en suelos y materiales en descomposición. Es un contaminante habitual de los conductos de climatización-ventilación. Forma esporas como forma de resistencia (INSST, 2021).

4.1.4.- Agentes Biocidas Evaluados:

Para el estudio de la Evaluación de la efectividad biocida de productos para la higienización industrial de última generación, hemos recibido en el Laboratorio de Alteraciones Celulares por Agentes Exógenos del Centro de Investigación de Recursos Naturales, Salud y Medio Ambiente (RENSMA) de la Universidad de Huelva, 2 muestras concentradas de los agentes biocidas, etiquetados como “Biocida I” y “Biocida II”, cuya composición es desconocida para nosotros, pues se encuentra bajo secreto comercial.

Para su uso comercial, los biocidas deben ser previamente diluidos con agua. Dado su pretendido destino como higienizantes de la industria alimentaria, la Normativa estipula que dicha dilución debe hacerse en agua dura (UNE-EN-13697:2015+A1, 2015).

4.1.4.1.-Elaboración de agua dura.

El agua dura para dilución de los agentes biocidas a ensayar debe prepararse según la Norma UNE, conteniendo $MgCl_2$ y $CaCl_2$ en agua destilada y esterilizada posteriormente por filtración.

El pH del agua dura debe ser de $7,0 \pm 0,2$ medido a $20 \pm 1^\circ C$. Si fuese necesario se ajusta el pH empleando una solución de NaOH o de HCl diluidos.

El agua dura preparada en condiciones de esterilidad debe utilizarse antes de 12 horas posteriores a su preparación.

4.2. Determinación de la CMI y la CMB.

Hemos empleado el método de la dilución seriada en microplacas de 96 pocillos, donde se probará por triplicado la efectividad de cada biocida frente a un microorganismo concreto.

Todos los pocillos de la microplaca contuvieron el medio de cultivo más adecuado a cada microorganismo en cada caso. En ellos, se procedió a diluir cada agente biocida por separado de forma seriada, es decir, realizando diluciones sucesivas del 50 % del pocillo anterior empleando una pipeta multicanal automática.

En todas las microplacas se introdujo una fila como control positivo, donde se dispensó solamente el medio de cultivo y el inóculo para comprobar que el microorganismo era viable. Así mismo se añadió también una fila como control negativo, en la que se dispensó solamente el medio del cultivo para comprobar su esterilidad.

Seguidamente, las placas se incuban a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 18-24 horas, al cabo de las cuales se examinó la turbidez en los pocillos tras su agitación. El último pocillo sin turbidez se corresponde con la CMI.

De los pocillos que no presentan turbidez, se realizó una inoculación en placa de Petri por triplicado, para determinar la CMB. El último pocillo a partir del cual no se obtiene crecimiento en placa, se corresponde con la CMB.

4.3. Cálculo de la curva de letalidad respecto al tiempo.

Consiste en determinar el tiempo, en minutos, que necesita un agente biocida para matar a la totalidad de un inóculo de 5×10^6 UFC/mL.

El inóculo del microorganismo, junto con el biocida, se mantienen en caldo de cultivo a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Seguidamente y durante todo el tiempo que dura el ensayo, se toman muestras alícuotas de forma periódica, para la resiembra en placas de TSA.

Según la normativa, se establecen dos rangos de tiempo para el cálculo de la curva de letalidad; por un lado, se hace el recuento de colonias cada minuto hasta un total de 10 minutos, y en caso de que a los 10 minutos todavía se puedan detectar colonias, se establece un rango de siembra de 5 minutos hasta un total de 60 minutos.

Todo el proceso se realiza en ambiente estéril, empleando campana de flujo laminar, mediante siembra por extensión con asa de Drigalsky estéril, con el fin de extender el inóculo para realizar recuento de UFC.

En todos los casos, cada punto de las curvas de letalidad se corresponde con las medias de las lecturas de las UFC en las placas de Petri al menos por triplicado.

4.4. Determinación de la efectividad de los agentes biocidas sobre superficies no porosas según Normas AENOR, con modificaciones.

Consiste en determinar la efectividad de los biocidas sobre una superficie dada, previamente inoculada, comprobando su efectividad del mismo modo que cuando se realizan ensayos en un medio de cultivo.

4.4.1.- Superficies de ensayo.

Las superficies de ensayo son las establecidas en la Norma UNE-EN-13697:2015+A1 y consisten en unos discos de acero inoxidable 304, de 2 cm de diámetro, con acabado por ambos lados de grado 2b y de superficies planas.

El acero inoxidable 304 pertenece a la familia de los aceros inoxidables austeníticos constituidos por adición de elementos formadores de austenita como níquel, manganeso y nitrógeno. Contienen además un % de cromo de entre 16-26% que le proporciona resistencia a la oxidación a elevadas temperaturas. También se caracteriza por su excelente resistencia a la corrosión, factores que favorecen su higiene y limpieza. Los discos de acabado 2b, son de acabado brillante pero reflectante de espejo nublado, laminado en frío y el pase de laminación final se realiza con rodillos pulidos (Bonnet.es, 2022).

Antes de utilizar las superficies se deberán introducir en un vaso de precipitado con una solución "DECON" (marca comercial) al 5 % v/v y aplicar ultrasonidos durante 60 minutos, para realizar una limpieza exhaustiva. A continuación, aclarar con agua destilada hasta que no haya espuma. Los discos se esterilizarán antes de su uso mediante autoclavado a 121°C durante 20 minutos o bien en estufa a 180°C durante 1 hora y se guardan en condiciones adecuadas para mantener la esterilidad. Para manipular los discos sólo se utilizarán unas pinzas estériles.

4.4.2.-Sustancias interfirientes.

Para simular en el laboratorio las condiciones reales, se utilizarán sustancias interfirientes para simular condiciones "limpias" o bien condiciones "sucias", para estudiar la efectividad de los biocidas ensayados. La sustancia interfiriente a utilizar dependerá de las condiciones de utilización a las que vayan destinados los agentes biocidas. En nuestro caso se empleará albumina bovina estéril siguiendo las especificaciones descritas en la Norma UNE-EN-13697:2015+A1 de 2015.

4.4.3.-Neutralizador

El neutralizador será la sustancia a la que se transfiere la superficie inoculada y con el biocida, para neutralizar la acción del desinfectante de forma inmediata. Los neutralizadores utilizados son los que aparecen en el Anexo B de la citada Norma UNE, y siempre deben ser estériles.

En nuestro caso se utilizará una solución de tampón fosfato 0,25 M, a pH 7,2, en agua dura a $7,2 \pm 0,2$ estéril.

4.4.4.-Suspensiones de los microorganismos de ensayo.

- Para las bacterias se utilizará cultivos crecidos de 18/24 horas obtenidos a partir de un cultivo madre, hasta un máximo de tres subcultivos o pases. El número de células se ajusta espectrofotométricamente entre $1,5$ y 5×10^8 UFC/ml utilizando el medio de cultivo líquido
- Para *Pseudomonas aeruginosa*, se ajusta el número de células a $1,5$ y 5×10^8 UFC/ml para condiciones “sucias”, pero para condiciones “limpias”, el número de células se ajusta a $1,5$ y 5×10^9 UFC/ml.
- Para *Candida albicans*: se utilizará cultivos crecidos de 24/48 h obtenidos a partir de un cultivo madre, hasta un máximo de tres subcultivos o pases. El número de células se ajusta espectrofotométricamente entre $1,5$ y 5×10^7 UFC/ml. Esta suspensión se mantiene a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, y se utiliza antes de las 2h posteriores a su preparación.
- Para *Aspergillus brasiliensis*: Se utiliza solamente el primer subcultivo en medio rico. Se incuba, manteniendo la temperatura a $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, durante 7 a 9 días. Una vez crecido el cultivo, se toma un inóculo y se resuspende en 10 ml de solución estéril de polisorbato 80 al 0,05% w/v en agua (por ejemplo, TWEEN 80). Se agita con varilla o espátula estéril para desprender las conidiósporas, durante 1 minuto y se filtra mediante filtro de tamaño de poro comprendido entre 40 a $100\mu\text{m}$. El filtrado se observa al microscopio óptico, utilizando objetivo de 40X, en cámara de Neubauer. Se debe observar:
 - Al menos el 75% de esporas maduras (con protuberancias superficiales puntiagudas, no superficie suave).
 - Ausencia de esporas germinadas. Se debe estudiar al menos 10 campos de visión. Si existen esporas germinadas, se desecha la suspensión.
 - Ausencia de micelios. Se debe estudiar al menos 10 campos de visión. Si existen fragmentos de micelios hay que filtrar de nuevo. Si tras segundo filtrado hay micelios, se desecha la suspensión.

Para ajustar el número de células se diluye con su medio de cultivo líquido en condiciones “sucias” y se ajusta el número de esporas maduras entre 1.5 y 5×10^7 UFC/mL. Se usa ésta suspensión como inóculo para sembrar las placas. Se puede almacenar hasta 48 h en frigorífico.

El procedimiento utilizado para determinar la efectividad de los agentes biocidas a estudiar sobre unas superficies dadas, y en las condiciones establecidas por la Norma UNE es el siguiente:

1. Se prepara el inóculo ajustando, con el medio de cultivo, la suspensión de microorganismos, según los métodos descritos anteriormente.
2. Se pone 1 mL de suspensión bacteriana ajustada al número de bacterias que indica la Norma UNE y se le añade albúmina bobina, a una concentración de 0,3% en las condiciones “limpias” y del 3% en las condiciones “sucias” y se agita hasta homogeneizar. Se coloca a la temperatura elegida de incubación para realizar el ensayo y se cuenta 2 minutos con cronómetro, al cabo de los cuales, se agita la suspensión bacteriana, que ya estaría lista para ser inoculada sobre las superficies de ensayo.
3. Se ponen 50 μ L de inóculo anteriormente preparado en cada disco, que previamente han sido esterilizados, según los procedimientos descritos anteriormente. Se realiza el ensayo por triplicado.
4. Se deja secar el inóculo dentro de la Cámara de Flujo Laminar, hasta sequedad total. El tiempo de secado no puede ser superior a los 60 minutos.
5. Se añade el biocida sobre el disco seco, de forma que cubra toda la superficie donde se encuentra el inóculo seco.
6. Se establecen dos rangos de tiempo, cada 2 minutos hasta los 16 minutos o bien cada 5 minutos hasta un tiempo total de 60 minutos.
7. Transcurrido el tiempo de acción del biocida, según los rangos de tiempo elegidos, se transfiere el disco a un tubo que debe contener el neutralizador, descrito anteriormente, y perlas de vidrio estériles. El disco se coloca de forma que la cara inoculada quede en contacto con las perlas.
8. Se aplica vortex durante 1 minuto aproximadamente, para desprender el inóculo.
9. Se deja reposar en la solución neutralizadora durante 5 minutos.
10. Para comprobar la efectividad de los agentes biocidas a ensayar, se toma 1 mL de solución neutralizadora y se inoculan en al menos 2 placas de Petri, depositando aproximadamente la misma cantidad en cada una de ellas y extendiendo con un asa de Drigalsky estéril. Los resultados se expresarán en UFC /mL

11. Otra alternativa de siembra es colocar 1 ml de la solución neutralizadora en la base de una placa de Petri estéril y añadir el medio de cultivo estéril líquido a temperatura ambiente.
12. Las placas se incuban a las condiciones adecuadas al microorganismo a estudiar.
13. El disco se recupera y se enjuaga con 10 ml agua destilada estéril. Una vez escurrido se transfiere a un frasco con 10 ml de medio de cultivo líquido (TSB) en caso de las bacterias y en el caso de las levaduras y hongos se transfiere a una placa con el medio de cultivo MEA, colocando la superficie del ensayo hacia abajo.
14. Se incuban a las condiciones adecuadas al tipo de microorganismo de estudio.



Figura n.º1: Detalle de incubación de las superficies de ensayo, en medio de cultivo líquido (TSB), en frasco de McCartney. Foto: El autor.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.-Determinación de la dilución mínima efectiva de los agentes biocidas

El primer paso que debemos dar para comprobar la eficacia de un producto biocida, es comprobar que efectivamente presenta alguna actividad antimicrobiana. Para ello, realizamos el análisis de las microplacas con los biocidas originales a la concentración de inóculo establecida por la Normativa y los biocidas originales sin diluir. Como resultado obtuvimos la inhibición del crecimiento en todos los pocillos inoculados, tanto para el biocida I como para el biocida II y para todos los microorganismos estudiados, comprobando así que ambos productos tienen capacidad biocida suficiente frente a los microorganismos que se utilizan en el ensayo.

De forma general, para determinar el potencial desinfectante de una determinada sustancia química se debe ensayar qué tipo de concentraciones son eficaces y tienen acción bactericida, sobre nuestra suspensión de ensayo, así como el efecto sobre las distintas cepas a estudiar. Para cuantificar esta actividad se suelen utilizar métodos de dilución que pueden ser de macrodilución, basada en el uso de tubos de ensayo o microdilución, mediante la utilización de placas de microtitulación, lo que permite una importante reducción de la cantidad de material y reactivos empleados (Flórez et al., 1992).

En consecuencia, para calcular el factor de dilución de cada agente biocida y la efectividad a dicha dilución, se procedió a realizar una dilución seriada de los agentes biocidas en placas multipocillo. Después de las condiciones de incubación óptimas, obtuvimos la inhibición del crecimiento en varios pocillos inoculados, tanto para el biocida I como para el biocida II, pudiéndose encontrar efectividad frente a todos los microorganismos a distintas concentraciones en medio líquido, tal como se demuestra a continuación.

Al desconocer la composición química de los agentes biocidas a ensayar, tenemos que comprobar si estos son capaces de actuar frente a todos los microorganismos recomendados por la Norma UNE 13697, que es la que vamos a tomar como referencia. Tampoco podemos conocer la concentración de sus

componentes, por lo que los valores de CMI y CMB que obtengamos, sólo pueden hacer referencia a las veces que se diluye el biocida original.

5.2.-Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración mínima bactericida (CMB) para los dos agentes biocidas.

Al desconocer la composición química de los agentes biocidas a ensayar, tenemos que comprobar si estos son capaces de actuar frente a todos los microorganismos recomendados por la Norma UNE 13697, que es la que vamos a tomar como referencia.

Se define como concentración mínima inhibitoria, la menor concentración de biocida capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias inoculadas en el medio de cultivo a la concentración de 6×10^5 UFC/ml, tras 18-24 horas de incubación a la temperatura de $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ y se define como concentración mínima bactericida, la menor concentración de biocida capaz de destruir o matar al 100% de las bacterias inoculadas en el medio de cultivo a la concentración de 6×10^5 UFC/ml, tras 18-24 horas de incubación a la temperatura de $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ (Flórez et al, 1992).

Lógicamente, los resultados obtenidos al poner en contacto los biocidas a ensayar, en las condiciones expuestas en el apartado anterior, para los distintos microorganismos, son diferentes según el tipo de microorganismo, por ejemplo, dependiendo de si son Gram positiva o Gram negativa, si son bacterias u hongos, o de si pueden esporular o no. Así, vamos a mostrar los resultados obtenidos frente a cada microorganismo individualmente, si bien al final indicaremos, en base a nuestros resultados, cuáles son las condiciones recomendadas de uso de los productos biocidas a estudio, para garantizar su efectividad como higienizantes de uso industrial.

1.-Para *Pseudomonas aeruginosa*:

Tras realizar la microtitulación en placa multipocillo, empleando los agentes biocidas diluidos al 1/10, observamos que hay crecimiento a partir del pocillo 6 para el biocida I, pero no hay crecimiento en ninguno de los anteriores (del pocillo 5 al 1). En consecuencia, la CMI será a la que se encuentra el biocida I en el pocillo 6, es decir 120 veces diluido. Seguidamente se hace resiembra en placa de agar por triplicado de los pocillos 6, 5 y 4 para determinar la CMB, obteniendo los resultados que se observan en la tabla nº:1.

Tras realizar la microtitulación en placa multipocillo observamos que hay crecimiento a partir del pocillo 8 para el biocida II, pero no hay crecimiento para ninguno de los anteriores (del pocillo 7 al 1). En consecuencia, la CMI será a la que se encuentra el biocida II en el pocillo 8, es decir 160 veces diluido respecto del biocida original. Seguidamente se hace resiembra en placa de agar por triplicado de los

pocillos 8, 7 y 6 para determinar la CMB, obteniendo los resultados que se indican en la tabla n°:1.

BIOCIDA I (1/10)			
BIOCIDA I	Pocillo de siembra	Crecimiento en placa	Resultado
	Pocillo 6	Positivo	CMI (120)
	Pocillo 5	Negativo	CMB (100)
	Pocillo 4	Negativo	-----
BIOCIDA II (1/10)			
BIOCIDA II	Pocillo de siembra	Crecimiento en placa	Resultado
	Pocillo 8	Positivo	CMI (160)
	Pocillo 7	Negativo	CMB (140)
	Pocillo 6	Negativo	-----

Tabla n.º1: Determinación de la CMI y CMB para *P.aeruginosa*. CMI: Concentración Mínima Inhibitoria. CMB: Concentración Mínima Bactericida. El valor entre paréntesis se corresponde con el factor de dilución del agente biocida para el pocillo correspondiente. En todos los casos los ensayos se llevaron a cabo al menos por triplicado, sin existir variabilidad en el número de pocillo.

Los biocidas estudiados resultan eficaces frente a *P.aeruginosa*. Se ha empleado la dilución 1/10 de los agentes biocidas, ya que empleando una dilución mayor, se podía observar crecimiento en casi todos los pocillos.

2.-Para *Escherichia coli*:

Tras realizar la microtitulación en placa multipocillo, empleando los agentes biocidas diluidos al 1/10, observamos que no hay crecimiento en toda la placa por lo que procedimos a diluir el agente biocida a 1/50, observamos que hay crecimiento a partir del pocillo 9 para el biocida I (no hay crecimiento para ninguno de los anteriores, del pocillo 8 al 1). En consecuencia, la CMI será a la que se encuentra el biocida I en el pocillo 9, es decir 900 veces diluido respecto del biocida original. Seguidamente se hace resiembra en placa de agar por triplicado de los pocillos 9, 8 y 7 para determinar la CMB, obteniendo los resultados que se observan en la tabla n.º:2.

En el caso del biocida II se procede de igual manera que en el caso anterior observando que hay crecimiento a partir del pocillo 7, pero no hay crecimiento para ninguno de los anteriores (del pocillo 6 al 1). En consecuencia, la CMI será a la que se encuentra el biocida II en el pocillo 7, es decir 700 veces diluido respecto del biocida original. Seguidamente se hace resiembra en placa de agar por triplicado de los pocillos 7, 6 y 5 para determinar la CMB, obteniendo los resultados que se indican en la tabla n.º:2.

BIOCIDA I (1/50)			
BIOCIDA I	Pocillo de siembra	Crecimiento en placa	Resultado
	Pocillo 9	Positivo	CMI (900)
	Pocillo 8	Negativo	CMB (800)
	Pocillo 7	Negativo	-----
BIOCIDA II (1/50)			
BIOCIDA II	Pocillo de siembra	Crecimiento en placa	Resultado
	Pocillo 7	Positivo	CMI (700)
	Pocillo 6	Negativo	CMB (600)
	Pocillo 5	Negativo	-----

Tabla nº2: Determinación de la CMI y CMB para *E.coli* . CMI: Concentración Mínima Inhibitoria. CMB: Concentración Mínima Bactericida. El valor entre paréntesis se corresponde con el factor de dilución del agente biocida en el pocillo correspondiente. En todos los casos los ensayos se llevaron a cabo al menos por triplicado, sin existir variabilidad en el número de pocillo.

Los biocidas estudiados resultan muy eficaces frente a *E. coli*. Como hemos comentado, se ha empleado la dilución 1/50, ya que todas las diluciones menores probadas inhibían totalmente el crecimiento de la bacteria en todos los pocillos. La CMB que se obtiene es baja respecto a la que se obtiene frente a otros de los microorganismos ensayados, por lo que se puede deducir que *E. coli* es muy sensible a ambos agentes biocidas.

3.-Para *Staphylococcus aureus*:

Tras realizar la microtitulación en placa multipocillo, empleando los agentes biocidas diluidos al 1/50, observamos que hay crecimiento a partir del pocillo 4 para el biocida I, pero no hay crecimiento para ninguno de los anteriores (del pocillo 3 al 1). En consecuencia, la CMI será a la que se encuentra el biocida I en el pocillo 4, es

decir 400 veces diluido respecto del biocida original. Seguidamente se hace resiembra en placa de agar por triplicado de los pocillos 4, 3 y 2 para determinar la CMB, obteniendo los resultados que se observan en la tabla n.º:3.

En el caso del biocida II se procede de igual manera que en el caso anterior observando que hay crecimiento a partir del pocillo 6, pero no hay crecimiento para ninguno de los anteriores (del pocillo 5 al 1). En consecuencia, la CMI será a la que se encuentra el biocida II en el pocillo 6, es decir 600 veces diluido respecto del biocida original. Seguidamente se hace resiembra en placa de agar por triplicado de los pocillos 6, 5 y 4 para determinar la CMB, obteniendo los resultados que se indican en la tabla n.º:3.

BIOCIDA I (1/50)			
BIOCIDA I	Pocillo de siembra	Crecimiento en placa	Resultado
	Pocillo 4	Positivo	CMI (400)
	Pocillo 3	Negativo	CMB (300)
	Pocillo 2	Negativo	-----
BIOCIDA II (1/50)			
BIOCIDA II	Pocillo de siembra	Crecimiento en placa	Resultado
	Pocillo 6	Positivo	CMI (600)
	Pocillo 5	Negativo	CMB (500)
	Pocillo 4	Negativo	-----

Tabla n.º3: Determinación de la CMI y CMB para *S.aureus*. CMI: Concentración Mínima Inhibitoria. CMB: Concentración Mínima Bactericida. El valor entre paréntesis se corresponde con el factor de dilución del agente biocida en el pocillo correspondiente. En todos los casos los ensayos se llevaron a cabo al menos por triplicado, sin existir variabilidad en el número de pocillo.

Los biocidas estudiados resultan muy eficaces frente a *S. aureus*. Se ha empleado la dilución 1/50, ya que todas las diluciones menores probadas inhibían totalmente el crecimiento de la bacteria en todos los pocillos. La CMB que se obtiene es baja respecto a la que se obtiene frente a otros de los microorganismos ensayados, por lo que se puede deducir que se necesitará dosis más bajas de los agentes biocidas para eliminar la bacteria.

S. aureus es una bacteria Gram positiva que desarrolla con frecuencia resistencia a los antibióticos (INSST, 2012) y con gran capacidad de producir bacteriemia nosocomial en el mundo, debido a los diferentes factores de

patogenicidad y virulencia que puede adquirir y a la expresión de una gran variedad de proteínas las cuales pertenecen a las moléculas de la matriz adhesiva, presentes en la superficie de la bacteria, y cuya función es la colonización e invasión celular del hospedador y la formación de biopelícula. En este caso, las primeras etapas de formación de la biopelícula están influenciadas por las condiciones ambientales de temperatura, osmolaridad, pH, presencia de hierro y oxígeno, así como la polaridad y las interacciones hidrofóbicas, presentándose una mayor unión entre superficies rugosas e hidrofóbicas, como el látex y el plástico (Pasachova et al., 2019).

En nuestro caso las CMI y CMB que se obtienen son intermedias, si se compara con las que se obtienen para *E. coli*, lo que se justifica porque, aunque la capacidad que tiene la bacteria de adquirir factores de virulencia es muy elevada, no tiene tanta facilidad para formar biopelículas como *P. aeruginosa*, de ahí que los agentes biocidas ensayados sean muy eficaces utilizando concentraciones bajas.

4.-Para *Enterococcus hirae*:

Tras realizar la microtitulación en placa multipocillo, empleando los agentes biocidas diluidos al 1/50, observamos que hay crecimiento a partir del pocillo 10 para el biocida I, pero no hay crecimiento para ninguno de los anteriores (del pocillo 9 al 1). En consecuencia, la CMI será a la que se encuentra el biocida I en el pocillo 10, es decir 1000 veces diluido respecto del biocida original. Seguidamente se hace resiembra en placa de agar por triplicado de los pocillos 10, 9 y 8 para determinar la CMB. En este caso se observa crecimiento en algunas placas del pocillo 9, por los que la CMI se establece en 900 veces diluido. Los resultados se indican en la tabla nº:4.

En el caso del biocida II se procede de igual manera que en el caso anterior observando que hay crecimiento a partir del pocillo 9, pero no hay crecimiento para ninguno de los anteriores (del pocillo 8 al 1). En consecuencia, la CMI será a la que se encuentra el biocida II en el pocillo 9, es decir 900 veces diluido respecto del biocida original. Seguidamente se hace resiembra en placa de agar por triplicado de los pocillos 9, 8 y 7 para determinar la CMB, obteniendo los resultados que se indican en la tabla nº:4.

BIOCIDA I (1/50)			
BIOCIDA I	Pocillo de siembra	Crecimiento en placa	Resultado
	Pocillo 10	Positivo	-----
	Pocillo 9	Positivo	CMI (900)
	Pocillo 8	Negativo	CMB (800)
BIOCIDA II (1/50)			

BIOCIDA II	Pocillo de siembra	Crecimiento en placa	Resultado
	Pocillo 9	Positivo	CMI (900)
	Pocillo 8	Negativo	CMB (800)
	Pocillo 7	Negativo	-----

Tabla n.º4: Determinación de la CMI y CMB para *E. hirae*. CMI: Concentración Mínima Inhibitoria. CMB: Concentración Mínima Bactericida. El valor entre paréntesis se corresponde con el factor de dilución del agente biocida en el pocillo correspondiente. En todos los casos los ensayos se llevaron a cabo al menos por triplicado, sin existir variabilidad en el número de pocillo.

Los biocidas estudiados resultan muy eficaces frente a *E. hirae*. Se ha empleado la dilución 1/50, ya que se todas las diluciones menores probadas inhibían totalmente el crecimiento de la bacteria en todos los pocillos. La CMB que se obtiene es baja respecto a la que se obtiene frente a otros de los microorganismos ensayados, por lo que se puede deducir que se necesitará dosis más bajas de los agentes biocidas para eliminar la bacteria.

5.- Para *Bacillus subtilis*:

Tras realizar la microtitulación en placa multipocillo, empleando los agentes biocidas diluidos al 1/50, observamos que hay crecimiento a partir del pocillo 3 para el biocida I, pero no hay crecimiento para ninguno de los anteriores (del pocillo 2 al 1). En consecuencia, la CMI será a la que se encuentra el biocida I en el pocillo 3, es decir 300 veces diluido respecto del biocida original. Seguidamente se hace resiembra en placa de agar por triplicado de los pocillos 3, 2 y 1 para determinar la CMB y obteniendo los resultados que se indican en la tabla n.º:5.

En el caso del biocida II se procede de igual manera que en el caso anterior observando que hay crecimiento a partir del pocillo 3, pero no hay crecimiento para ninguno de los anteriores (del pocillo 2 al 1). En consecuencia, la CMI será a la que se encuentra el biocida II en el pocillo 3, es decir 300 veces diluido respecto del biocida original. Seguidamente se hace resiembra en placa de agar por triplicado de los pocillos 3, 2 y 1 para determinar la CMB y obteniendo los resultados que se indican en la tabla n.º:5.

BIOCIDA I (1/50)			
BIOCIDA I	Pocillo de siembra	Crecimiento en placa	Resultado
	Pocillo 3	Positivo	CMI (300)
	Pocillo 2	Negativo	CMB (200)
	Pocillo 1	Negativo	-----

BIOCIDA II (1/50)			
BIOCIDA II	Pocillo de siembra	Crecimiento en placa	Resultado
	Pocillo 3	Positivo	CMI (300)
	Pocillo 2	Negativo	CMB (200)
	Pocillo 1	Negativo	-----

Tabla n.º5: Determinación de la CMI y CMB para *B. subtilis*. CMI: Concentración Mínima Inhibitoria. CMB: Concentración Mínima Bactericida. El valor entre paréntesis se corresponde con el factor de dilución del agente biocida en el pocillo correspondiente. En todos los casos los ensayos se llevaron a cabo al menos por triplicado, sin existir variabilidad en el número de pocillo.

Los biocidas estudiados resultan eficaces frente a *B. subtilis*. Se ha empleado la dilución 1/50, ya que todas las diluciones menores probadas inhibían totalmente el crecimiento de la bacteria en todos los pocillos. En nuestro caso las CMI y CMB que se obtienen son intermedias, si se compara con las que se obtienen para *E. coli*. Será esperable una mayor resistencia en superficies dada su capacidad para formar endosporas, como forma de resistencia (Madigan et al, 2014).

6.-Para *Candida albicans*:

Tras realizar la microtitulación en placa multipocillo, empleando los agentes biocidas diluidos al 1/10, observamos que hay crecimiento a partir del pocillo 10 para el biocida I, pero no hay crecimiento para ninguno de los anteriores (del pocillo 9 al 1). En consecuencia, la CMI será a la que se encuentra el biocida I en el pocillo 10, es decir 200 veces diluido respecto del biocida original. Seguidamente se hace resiembra en placa de agar por triplicado de los pocillos 10, 9 y 8 para determinar la CMB y obteniendo los resultados que se indican en la tabla nº:6.

En el caso del biocida II se procede de igual manera que en el caso anterior observando que hay crecimiento a partir del pocillo 10, pero no hay crecimiento para ninguno de los anteriores (del pocillo 9 al 1). En consecuencia, la CMI será a la que se encuentra el biocida II en el pocillo 10, es decir 200 veces diluido respecto del biocida original. Seguidamente se hace resiembra en placa de agar por triplicado de los pocillos 10, 9 y 8 para determinar la CMB y obteniendo los resultados que se indican en la tabla nº:6.

BIOCIDA I (1/10)			
BIOCIDA I	Pocillo de siembra	Crecimiento en placa	Resultado
	Pocillo 10	Positivo	CMI (200)
	Pocillo 9	Negativo	CMB (180)

	Pocillo 8	Negativo	-----
	BIOCIDA II (1/10)		
BIOCIDA II	Pocillo de siembra	Crecimiento en placa	Resultado
	Pocillo 10	Positivo	CMI (200)
	Pocillo 9	Negativo	CMB (180)
	Pocillo 8	Negativo	-----

Tabla n.º6: Determinación de la CMI y CMB para *C.albicans* . CMI: Concentración Mínima Inhibitoria. CMB: Concentración Mínima Bactericida. El valor entre paréntesis se corresponde con el factor de dilución del agente biocida en el pocillo correspondiente. En todos los casos los ensayos se llevaron a cabo al menos por triplicado, sin existir variabilidad en el número de pocillo.

Los biocidas estudiados resultan activos y eficaces frente a *C.albicans*. La CMB que se obtiene es elevada, es decir que necesitará dosis más elevadas de los agentes biocidas para eliminarla. Esta afirmación puede justificarse por la naturaleza de este microorganismo que se trata de un hongo dimórfico, que dependiendo de la temperatura se puede comportar como una levadura o un hongo. Los hongos son seres eucariotas, y por tanto el material genético se encuentra dentro del núcleo, y por ello muchas de las sustancias que actúan contra las bacterias son ineficaces contra los hongos. Además, en el caso de los hongos, estos pueden formar esporas, que son muy resistentes a la acción de agentes desinfectantes (Floréz et al., 1992).

7.- Para *Aspergillus brasiliensis*:

Tras realizar la microtitulación en placa multipocillo, empleando los agentes biocidas diluidos al 1/10, observamos que hay crecimiento a partir del pocillo 3 para el biocida I, pero no hay crecimiento para ninguno de los anteriores (del pocillo 2 al 1). En consecuencia, la CMI será a la que se encuentra el biocida I en el pocillo 3, es decir 60 veces diluido respecto del biocida original. Seguidamente se hace resiembra en placa de agar por triplicado de los pocillos 3, 2 y 1 para determinar la CMB y obteniendo los resultados que se indican en la tabla nº:7.

En el caso del biocida II se procede de igual manera que en el caso anterior observando que hay crecimiento a partir del pocillo 5, pero no hay crecimiento para ninguno de los anteriores (del pocillo 4 al 1). En consecuencia, la CMI será a la que se encuentra el biocida II en el pocillo 5, es decir 100 veces diluido respecto del biocida original. Seguidamente se hace resiembra en placa de agar por triplicado de los

pocillos 5 ,4 para determinar la CMB y obteniendo los resultados que se indican en la tabla n°:7.

BIOCIDA I (1/10)			
BIOCIDA I	Pocillo de siembra	Crecimiento en placa	Resultado
	Pocillo 3	Positivo	CMI (60)
	Pocillo 2	Negativo	CMB (40)
	Pocillo 1	Negativo	-----
BIOCIDA II (1/10)			
BIOCIDA II	Pocillo de siembra	Crecimiento en placa	Resultado
	Pocillo 5	Positivo	CMI (100)
	Pocillo 4	Negativo	CMB (80)
	Pocillo 3	Negativo	-----

Tabla n.º7: Determinación de la CMI y CMB para *A. brasiliensis*. CMI: Concentración Mínima Inhibitoria. CMB: Concentración Mínima Bactericida. El valor entre paréntesis se corresponde con el factor de dilución del agente biocida en el pocillo correspondiente. En todos los casos los ensayos se llevaron a cabo al menos por triplicado, sin existir variabilidad en el número de pocillo.

Los biocidas estudiados resultan activos y eficaces frente a *A. brasiliensis*, aunque la CMB que se obtiene es elevada por lo que se puede deducir que necesitara dosis más elevadas de los agentes biocidas para eliminar al microorganismo. Esta afirmación puede justificarse por la naturaleza de este microorganismo, ya que se trata de un hongo, que puede formar esporas. Para que el agente biocida sea activo en superficie frente a los hongos, debería actuar evitando la esporulación, ya que en las superficies, los agentes biocidas entran en contacto con los microorganismos sólo desde una dirección, mientras que en suspensión, estos están rodeados por el agente biocida y son más fáciles de destruir (Grönholm et al., 1999).

Finalmente, y a modo ilustrativo de la efectividad de los agentes biocidas ensayados, mostramos en la Figura n.º2, la placa de microtitulación crecida que se ha utilizado para calcular la CMI, en este caso de *E.coli*, mostrando la eficacia de cada uno de los agentes biocidas ensayados.

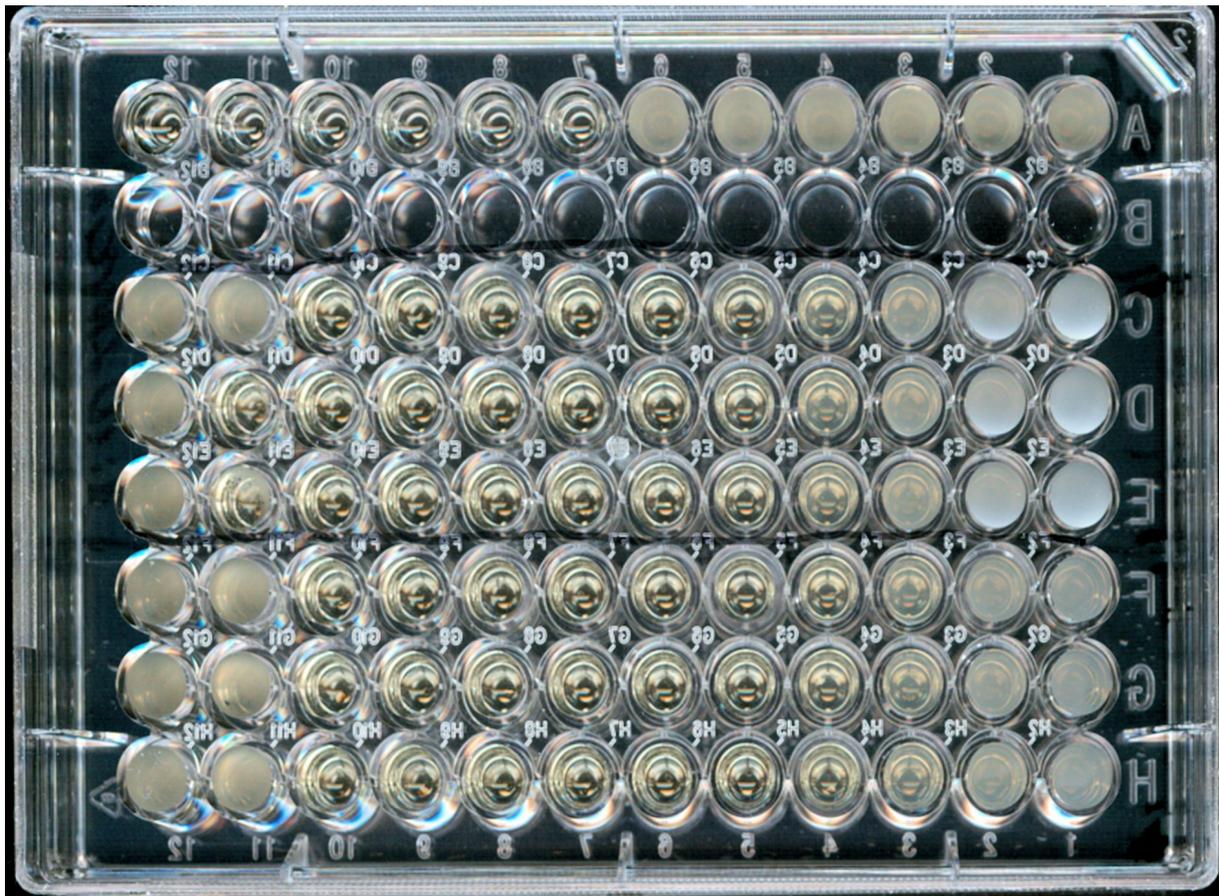


Figura n.º2: Vista inferior de la microplaca para el cálculo de la CMI y CMB. Fila A: Control positivo (pocillo 1 al 6) y Control negativo (pocillo 7 al 12). Fila B: No utilizada. Filas C, D y E: Inóculo tratado con el biocida I. Filas F, G y H: Inóculo tratado con el biocida II. Se puede apreciar como no hay crecimiento aparente hasta el pocillo 10 para ambos agentes biocidas. La turbidez observada en los pocillos iniciales es debido a la alta concentración de los agentes biocidas y se distingue perfectamente de la turbidez por crecimiento microbiano. Foto: El autor.

A modo de resumen, encontramos que en todos los casos los agentes biocidas estudiados son activos frente a los microorganismos y por tanto capaces de matar los microorganismos patógenos de referencia para el sector alimentario industrial, a concentraciones inferiores a la del biocida original sin diluir.

Al desconocer la concentración del o de los principios activos que contienen los biocidas ensayados por tratarse de un “secreto industrial”, los valores de CMI y CMB que se obtienen, solo pueden hacer referencia a las veces que se diluye el biocida original o Stock, para inhibir o eliminar totalmente los microorganismos.

A continuación, (Figura n.º3) presentamos la comparación para los microorganismos de ensayo, del efecto de cada agente biocida medido como su CMB, expresada en factor de dilución.

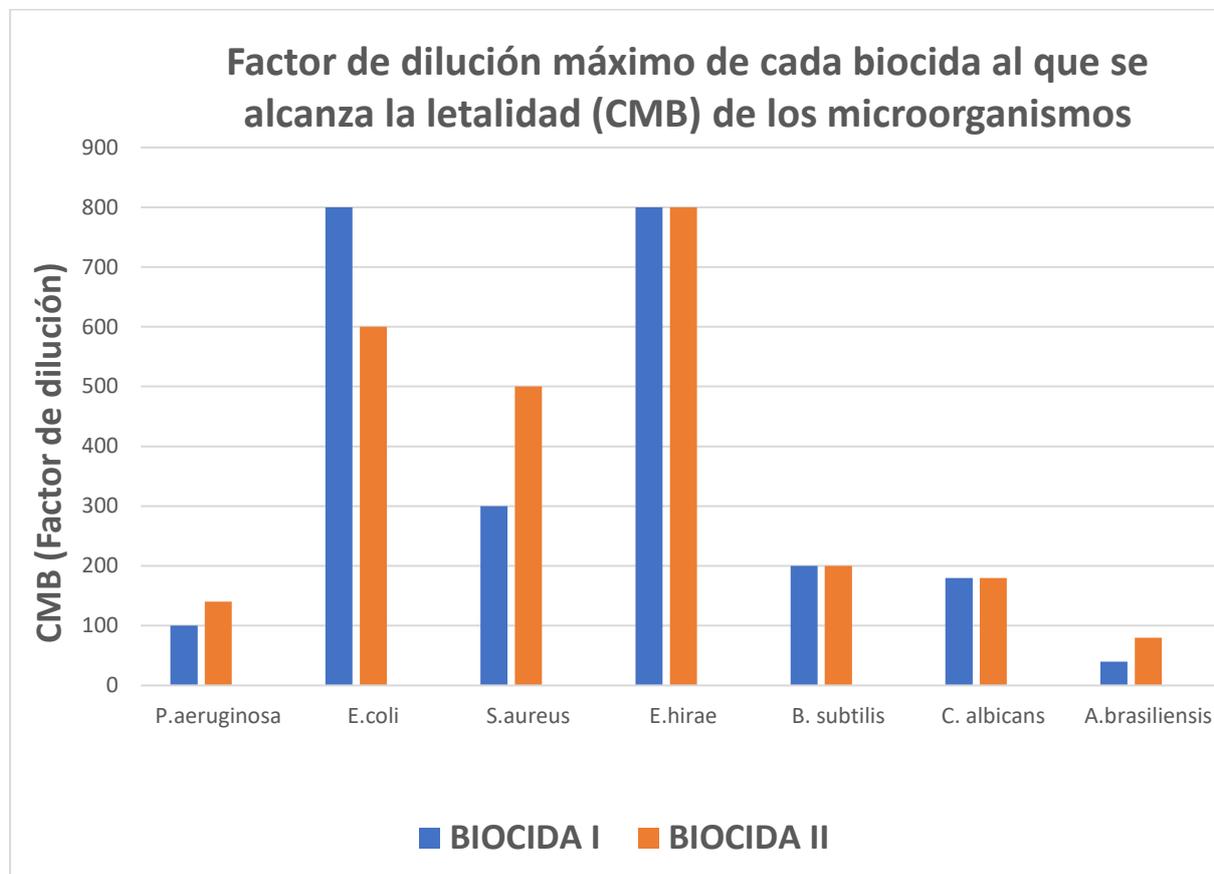


Figura n.º3: Representación de la CMB, expresada como factor de dilución, para el biocida I y biocida II, frente a los microorganismos estudiados. El factor de dilución indica el número de veces que se ha diluido el agente biocida original. Un valor alto de dilución coincide con una alta eficacia. Los datos mostrados son el valor medio de los ensayos por triplicado.

En general si se compara el nivel de eficacia entre ambos biocidas, se puede observar que el biocida II presenta un mayor nivel de eficacia para la mayoría de los microorganismos, ya que es capaz de matar a los microorganismos a concentraciones menores (dilución mayor) que el biocida I.

Como se puede observar en la Figura n.º3, los microorganismos para los que se necesita mayores dosis de biocida para que sean eliminados son los que presentan mayor resistencia, siendo el más resistente de todos *A. brasiliensis*. Los hongos pueden convertirse en un problema importante de contaminación, debido a que son productores de esporas muy bien adaptadas para ser diseminadas por el aire (Gots

et al, 2010). Estas esporas, pueden crear nichos ecológicos, en ambientes húmedos, a lo que hay que sumar que son capaces de soportar condiciones extremas de temperatura, presión, elevada concentración de solutos, etc. Los hongos pueden producir micosis cutáneas, alergias e intoxicaciones (Jawetz et al, 1992), pero sólo unos pocos hongos tienen la capacidad de ser patógenos para el hombre. De entre ellos, dos géneros, *Candida* y *Aspergillus*, figuran entre las que pueden producir infecciones fúngicas invasoras con más frecuencia (García-Vidal y Carratalá, 2012).

Entre las bacterias, la especie más resistente a los biocidas ensayados, ha sido *P. aeruginosa*, que es una bacteria Gram negativa, por lo que posee una membrana externa que la protege, limitando el paso de sustancias hacia su interior (Floréz et al, 1992). Pero además, en condiciones de humedad, *P. aeruginosa* puede formar biopelículas, como parte de su estrategia de supervivencia, ya que dentro de estas biopelículas los microorganismos crean un microambiente local que les protege de los cambios de pH, temperatura, humedad, desecación, así como de los químicos tóxicos para ellas, además de proporcionarles una concentración estable de nutrientes y facilitar la eliminación de los residuos bacterianos. En estas biopelículas, diferentes microorganismos pueden sobrevivir en un equilibrio dinámico, donde maduran y se diseminan a nuevas superficies (Hall-Stoodley y Stoodley, 2009).

La especie que resulta ser más sensible y que por tanto necesitará menores dosis de biocidas para ser eliminado es la bacteria *E. coli* que a pesar de ser una bacteria Gram negativa, es sin embargo muy sensible a la acción de los agentes biocidas ensayados, al contrario de lo ocurrido con *P. aeruginosa*. Aunque se conocen varios factores que contribuyen a la formación de biopelículas por determinadas cepas de *E. coli* como es la presencia de fimbrias, flagelos, antígeno 43 y moléculas de la matriz extracelular como es la celulosa, el ácido colánico y poli- β 1,6-N-acetil-D-glucosamina, todos ellos relacionados con factores de patogenicidad y virulencia, que sólo son expresados por determinadas cepas de *E. coli*, mientras que las cepas que forman parte de la microbiota intestinal normalmente no los suelen presentar (Jacobsen et al, 2008).

5.3. Cálculo de la curva de letalidad respecto al tiempo para los dos agentes biocidas dados.

Los

Además de determinar si los agentes biocidas evaluados son activos, es necesario comprobar su eficacia y averiguar si actúan en poco tiempo, ya que tiempos de acción muy altos, aunque fuesen efectivos para eliminar un determinado patógeno, no serían funcionales para el empleo de un agente biocida como sustancia de limpieza y desinfección en la práctica. Para ello realizaremos la siembra en placa tras un periodo de incubación del inóculo y los agentes biocidas. Al finalizar el periodo de

incubación, se realiza el recuento de las UFC/ mL en cada placa y se calcula su valor medio. En el recuento no se tienen en cuenta aquellas placas que por el motivo que sea, no permitan el recuento de colonias obteniéndose los siguientes resultados para cada uno de los microorganismos:

➤ Para *Pseudomonas aeruginosa*:

En la Figura n.º:4 se puede observar cómo ambos agentes biocidas son muy efectivos empleando la concentración de biocida para la CMB de cada uno de ellos, que es aquella dilución a la que se produce la muerte de todos los microorganismos del inóculo en medio de cultivo líquido. Ambos agentes biocidas son capaces de eliminar al microorganismo en tiempos inferior a los 10 minutos. En este caso, el biocida II actúa más rápidamente y presenta una línea de tendencia más pronunciada

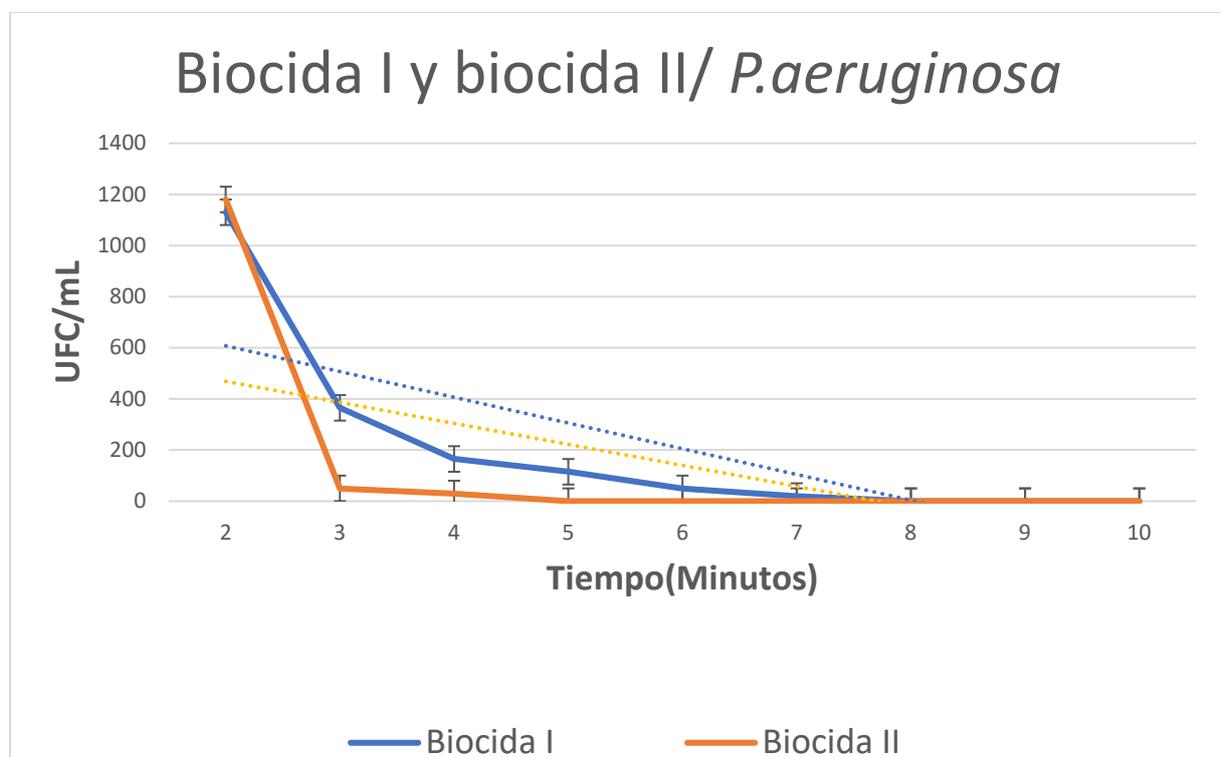


Figura n.º4: Representación de la curva de letalidad del biocida I y del biocida II frente a *P.aeruginosa*. Los valores son la media del recuento de 3 placas.

➤ Para *Escherichia coli*:

A modo ilustrativo, (Figura N.º:5), se muestra *E.coli* creciendo en placa para su recuento.



Figura n.º5: Se muestra crecimiento de *E.coli*, en placas de Petri con medio de cultivo TSA, empleado para el cálculo de la curva de letalidad. Foto: El autor.

En la Figura n.º:6 se puede observar cómo ambos agentes biocidas son muy efectivos. En este caso los agentes biocidas necesitan tiempos inferiores a los 60 minutos para eliminar todos los microorganismos, pero se ha de tener en cuenta que en este caso, las diluciones de los agentes biocidas que se utilizan son bastantes pequeñas. Se puede observar también como el mayor descenso de microorganismos se produce antes de los 15 minutos.

También se puede observar como el biocida II actúa más rápidamente que el biocida I y presenta una línea de tendencia más pronunciada, eliminando gran parte de la carga bacteriana en los primeros 10 minutos.

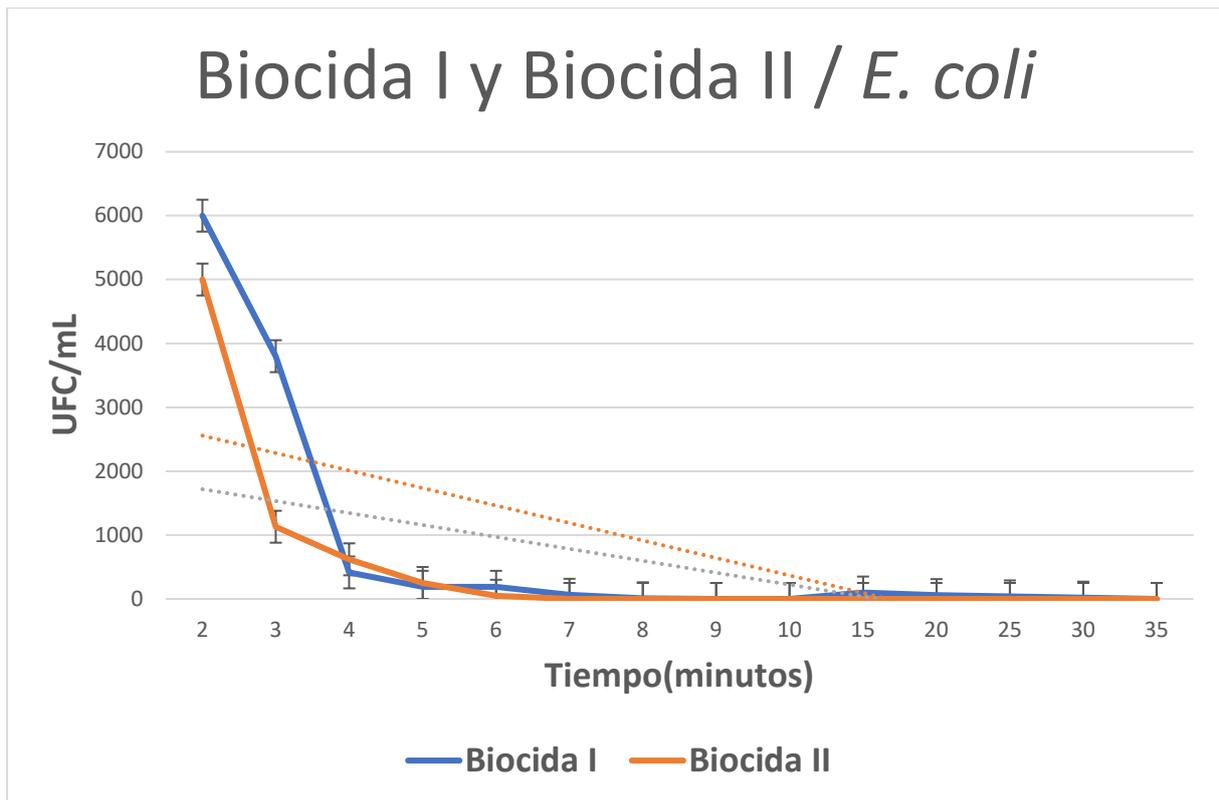


Figura n.º6 : Representación de la curva de letalidad del biocida I y del biocida II frente a *E.coli*. Los valores son la media del recuento de 3 placas

Para su uso como desinfectante en la práctica, bastará con emplear los agentes biocidas a mayor concentración, acortando de esta forma los tiempos de actuación.

➤ Para *Staphylococcus aureus*:

Para el caso de *Staphylococcus aureus*, (Figura n.º7), se comenzó ensayando ambos productos biocidas para tiempos inferiores a los 10 minutos, sin embargo se registró un elevado crecimiento en ambos casos, con un número tan elevado de colonias que no permite su uso práctico.

Por lo tanto, aumentamos el tiempo de actuación de ambos biocidas hasta los 60 minutos y como se puede observar en las Figuras n.º7, tampoco se obtiene la inhibición total del crecimiento de los microorganismos en medio líquido, al emplear los biocidas a concentraciones de CMB o sea a las diluciones del biocida original que producen la muerte de todos los microorganismos contenidos en el inóculo tras 24 horas. Pero se puede observar una mayor rapidez de actuación en el caso del biocida II, disminuyendo la población bacteriana antes que el biocida I.

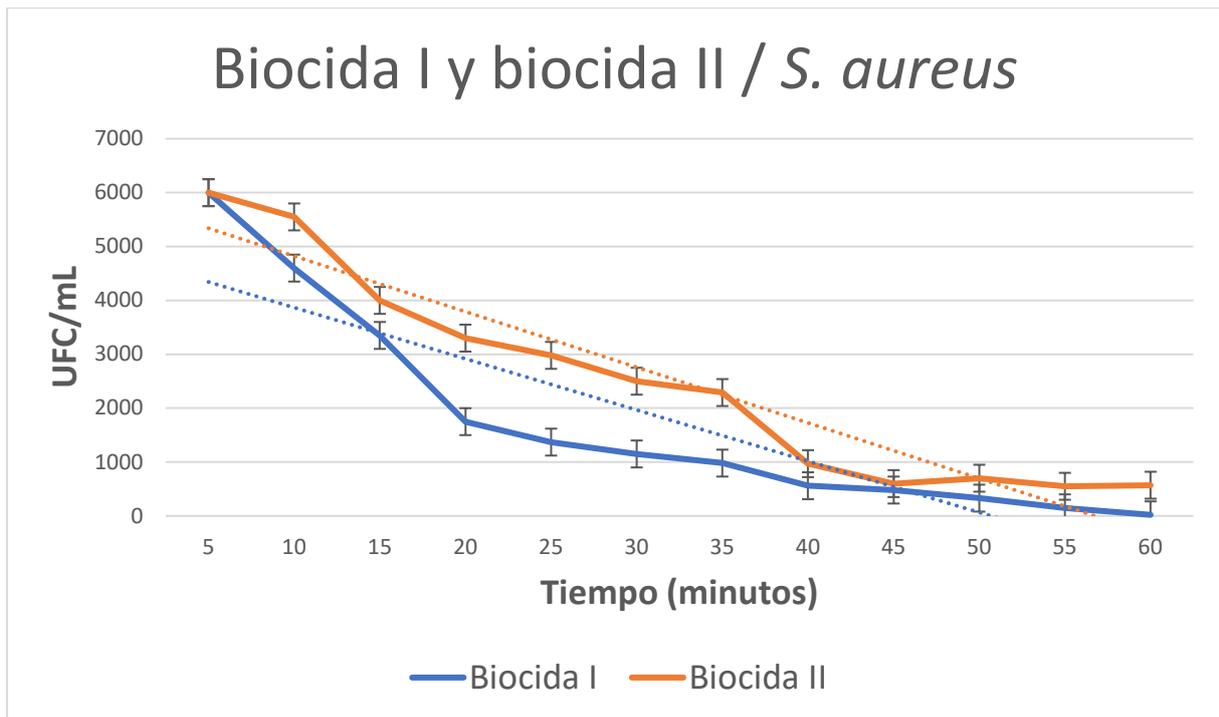


Figura n°.7: Representación de la curva de letalidad del biocida I y del biocida II frente a *S.aureus*. Los valores son la media del recuento de 3 placas.

Seguidamente, modificamos la estrategia, y se ensayó nuevamente aumentando la dosis de biocida a dos veces la CMB obtenida en medio líquido y utilizando el mismo rango de tiempo. Se obtiene los siguientes resultados:

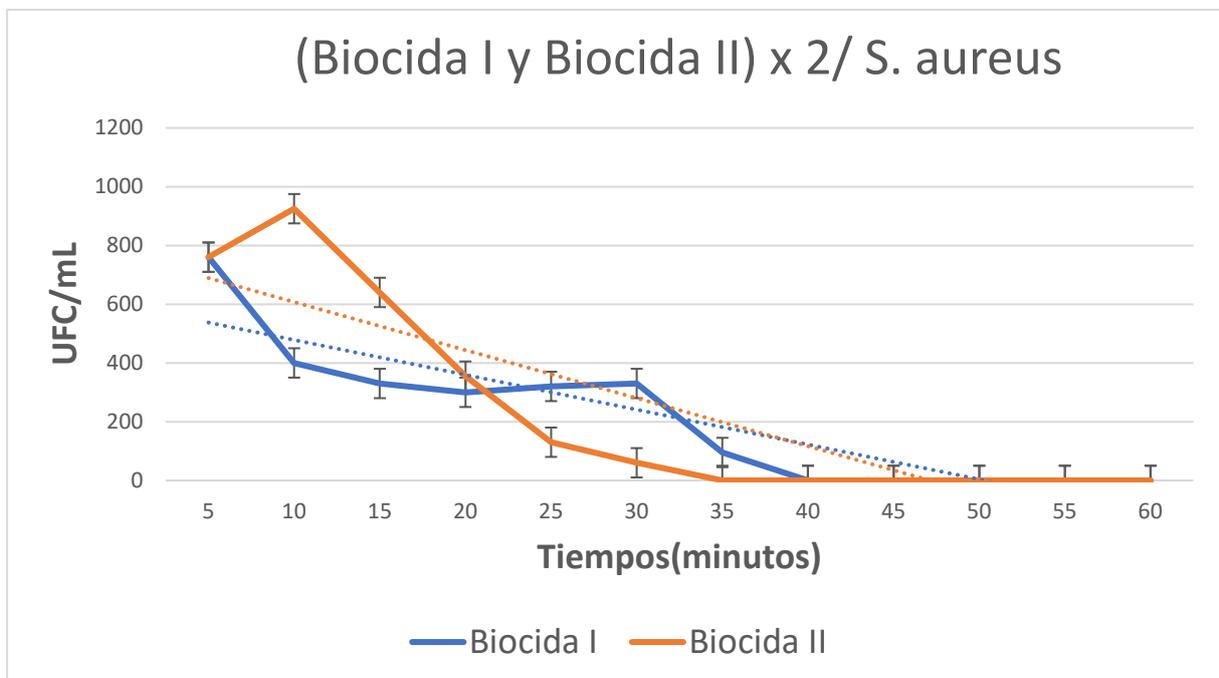


Figura n.º8: Representación de la curva de letalidad del biocida I y del biocida II, empleando dos veces su CMB, frente a *S. aureus*. Los valores son la media del recuento de 3 placas.

En este caso se observa en la Figura n.º8, que ambos biocidas son efectivos a concentraciones 2 veces su CMB y que el biocida II actúa más rápidamente, ya que disminuye la densidad microbiana en menos tiempo. Ambos agentes biocidas son capaces de eliminar todos los microorganismos del inóculo en menos de 40 minutos.

➤ Para *Enterococcus hirae*:

Para el caso de *Enterococcus hirae*, se realizaron ensayos con la CMB hasta los 10 minutos, obteniéndose un elevado número de colonias demasiado elevado (es decir, resultaba una dilución de los productos biocidas poco eficaz).

En consecuencia, se aumentó la dosis de los agentes biocidas hasta 3 veces la CMB, pero no se obtuvieron resultados favorables con ninguno de los dos biocidas, siendo el número de colonias por placa superior a los 330/ mL a los 60 minutos.

Seguidamente se aumentó la dosis de los agentes biocidas 5 veces la CMB calculada en la placa multipocillo, obteniéndose los resultados indicados en la Figura n.º9:

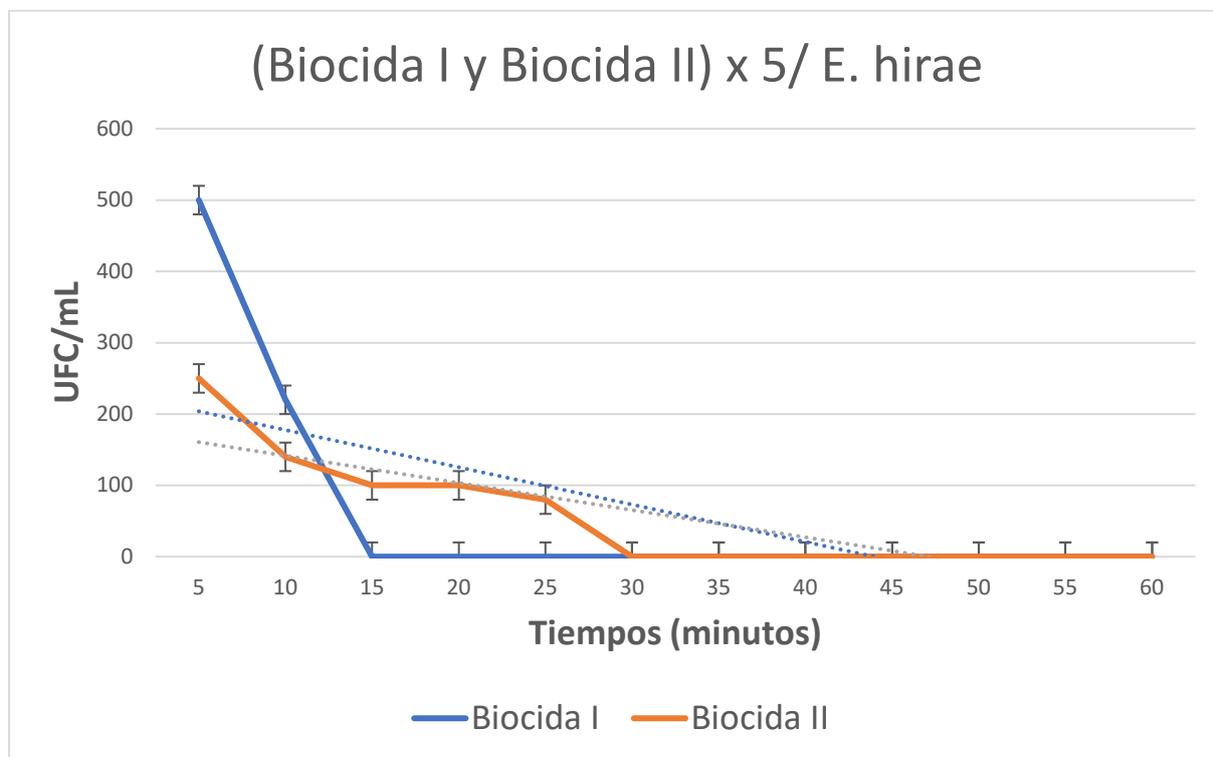


Figura n.º9: Representación de la curva de letalidad del biocida I y del biocida II, empleando cinco veces su CMB, frente a *E. hirae*. Los valores son la media del recuento de 3 placas.

Como se puede observar en la Figura n.º9, cuando se emplea los agentes biocidas a 5 veces la CMB calculada, se consigue eliminar los microorganismos antes de los 60 minutos. En este caso, el biocida I resulta actuar con mayor rapidez que el biocida II, eliminando los microorganismos antes de los 15 minutos de tiempo de contacto.

E. hirae es una bacteria Gram positiva con una gruesa pared de glucopolisácaridos, que no posee membrana externa. Cuando se calcula la CMB en placa multipocillo, el microorganismo permanece en contacto con los biocidas en medio líquido, entre 18-24 horas, dándole tiempo suficiente a estos agentes a actuar. Sin embargo en placa, el tiempo de actuación de los agentes biocidas se disminuye, para que los resultados se puedan extrapolar a su uso real por lo que deberemos aumentar la dosis para que estos sean efectivos en menos tiempo.

➤ Para *Bacillus subtilis*:

Como se puede apreciar en la Figura n.º10, ambos biocidas son muy efectivos y consiguen eliminar al microorganismo antes de los 10 minutos, empleando los biocidas a la CMB para *B. subtilis*, sin embargo, se puede apreciar como aunque ambos biocidas reducen significativamente la carga microbiana a los 4 minutos, el biocida I presenta mayor rapidez de acción y los elimina totalmente en menos tiempo, aunque el biocida II reduce antes la carga microbiana, pero tarda un poco más en eliminar totalmente los microorganismos.

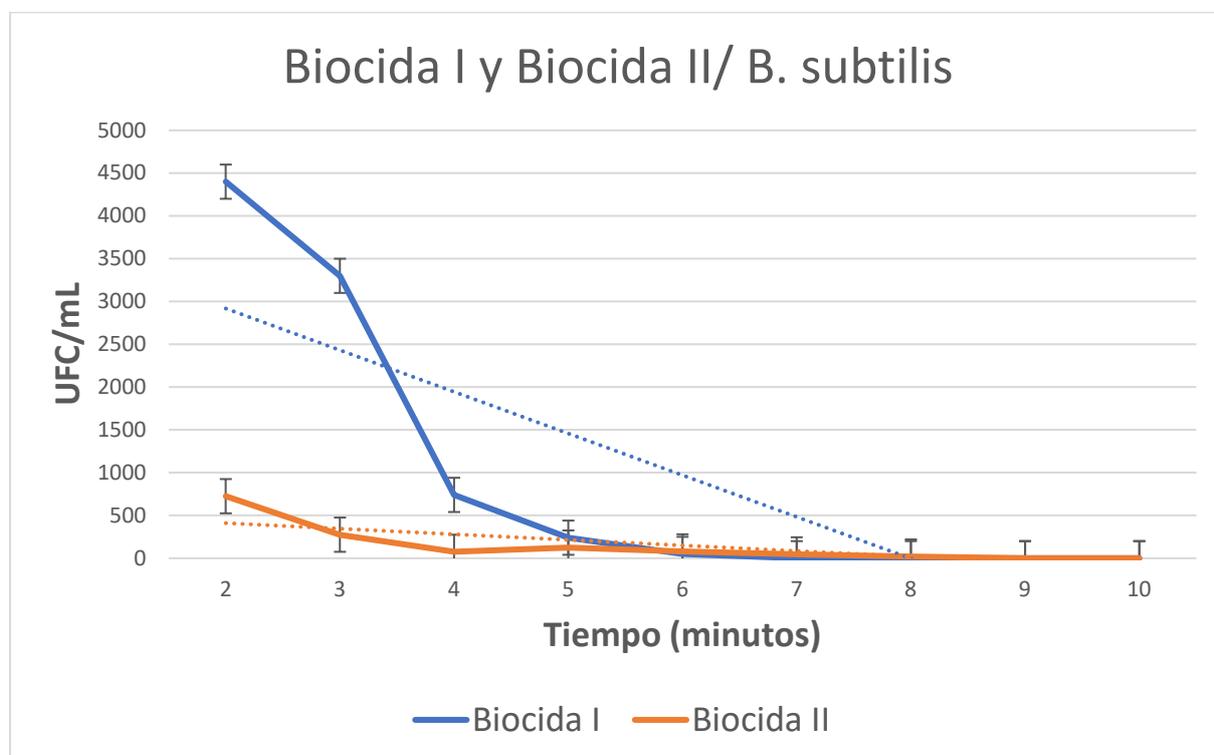


Figura n.º10 : Representación de la curva de letalidad del biocida I y del biocida II frente a *B. subtilis*. Los valores son la media del recuento de 3 placas

B. subtilis es una bacteria Gram positiva, que es capaz de formar endosporas en condiciones adversas. Esto explicaría porqué obtenemos una CMB elevada en las placas multipocillo, ya que los microorganismos al cabo de 18-24 horas de incubación, entran en la fase de declive y por tanto forma dichas endosporas que son muy resistentes a la acción de los agentes biocidas. Sin embargo, cuando se ensaya el biocida en placa de Petri, el microorganismo se pone en contacto con los agentes biocidas un tiempo determinado, pero no lo suficiente como para que el microorganismo forme la endospora y además, no les falta los nutrientes como ocurre en un micropocillo, por tanto, los agentes biocidas actúan sobre la forma vegetativa que es más fácil de eliminar, ya que el crecimiento del microorganismo se realiza en condiciones óptimas.

➤ Para *Candida albicans*:

Teniendo en cuenta que es un hongo dimórfico y que por tanto se puede comportar de forma diferente a las bacterias, vamos a utilizar el intervalo de tiempo de 60 minutos en la toma de las muestras alícuotas consecutivas.

A modo ilustrativo, (Figura N.º:11), se muestra *C. albicans* creciendo en placa para su recuento:



Figura n.º11: Se muestra crecimiento de *C. albicans*, en placas de Petri con medio de cultivo MEA, empleado para el cálculo de la curva de letalidad. Foto: El autor.

Como se puede observar en la Figura N.º:12, aunque ambos biocidas son muy efectivos y consiguen eliminar al microorganismo en muy poco tiempo, el biocida II presenta mayor rapidez de acción ya que a los 5 minutos de tiempo ha disminuido más la carga microbiana y los elimina totalmente antes que el biocida I.

Los resultados obtenidos son:

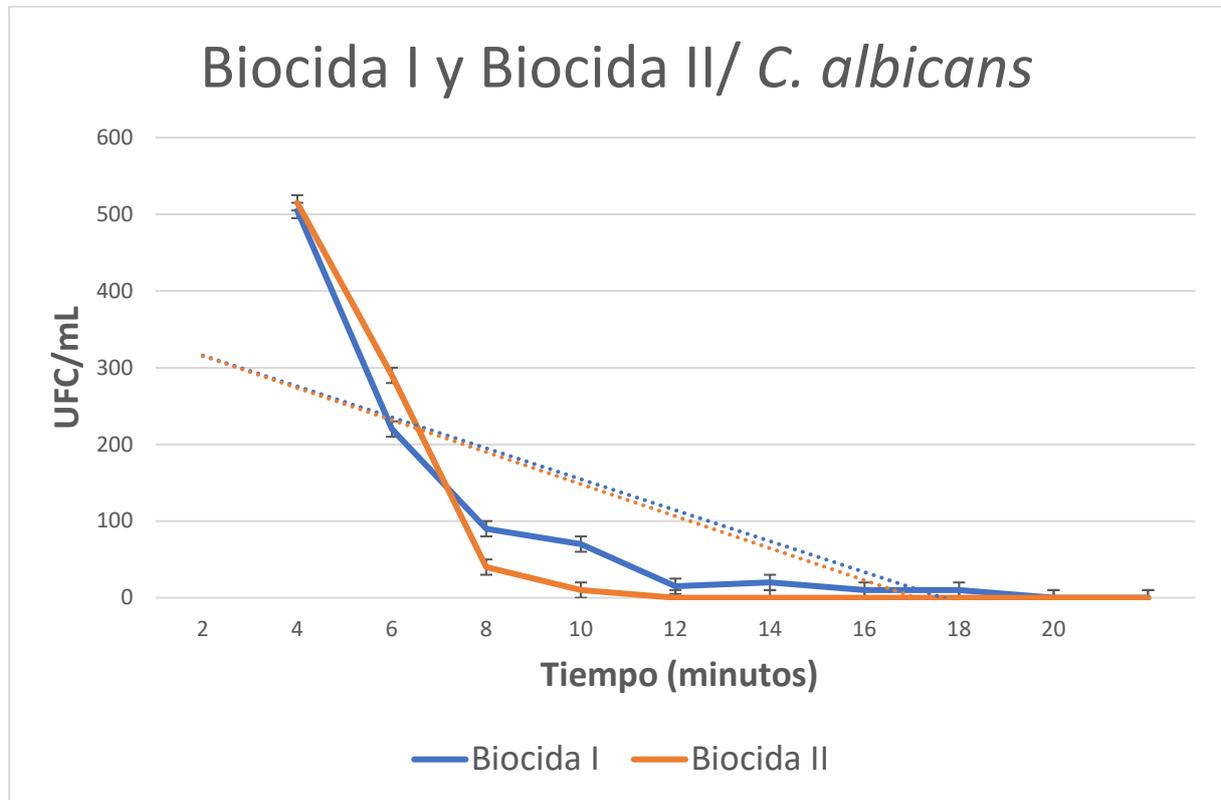


Figura n.º12 : Representación de la curva de letalidad del biocida I y del biocida II frente a *C.albicans*. Los valores son la media de recuento de 3 placas

C. albicans se puede comportar como levadura o bien como hongo dependiendo de las condiciones de crecimiento. Cuando se calcula la CMB, en placas multipocillo, el tiempo de incubación oscila entre las 18-24 horas, por lo que a lo largo de este tiempo pueden aparecer circunstancias desfavorables para su crecimiento, como puede ser agotamiento de los nutrientes, acúmulo de sustancias de desecho, etc, que obligan al microorganismo a formar endosporas. Sin embargo, cuando se hace el estudio en placa de Petri, con las condiciones controladas y óptimas para su crecimiento, *C. albicans* está en fase vegetativa, siendo por tanto más fácil de eliminar y necesitando menor tiempo y dosis de los agentes biocidas.

➤ Para *Aspergillus brasiliensis*:

Para el estudio del efecto de los agentes biocidas sobre *A. brasiliensis*, se aumentó el intervalo de tiempo en el que se toma la muestra. En este caso el tiempo de incubación para poder observar si hay o no crecimiento fue de 48-72 horas a 30 °C±1 °C.

En el caso de *A. brasiliensis*, ambos agentes biocidas son efectivos, como se puede observar en la Figura N.º:13, aunque el agente biocida I es más rápido y necesita un tiempo menor tanto para disminuir la carga microbiana como para eliminar totalmente al microorganismo.

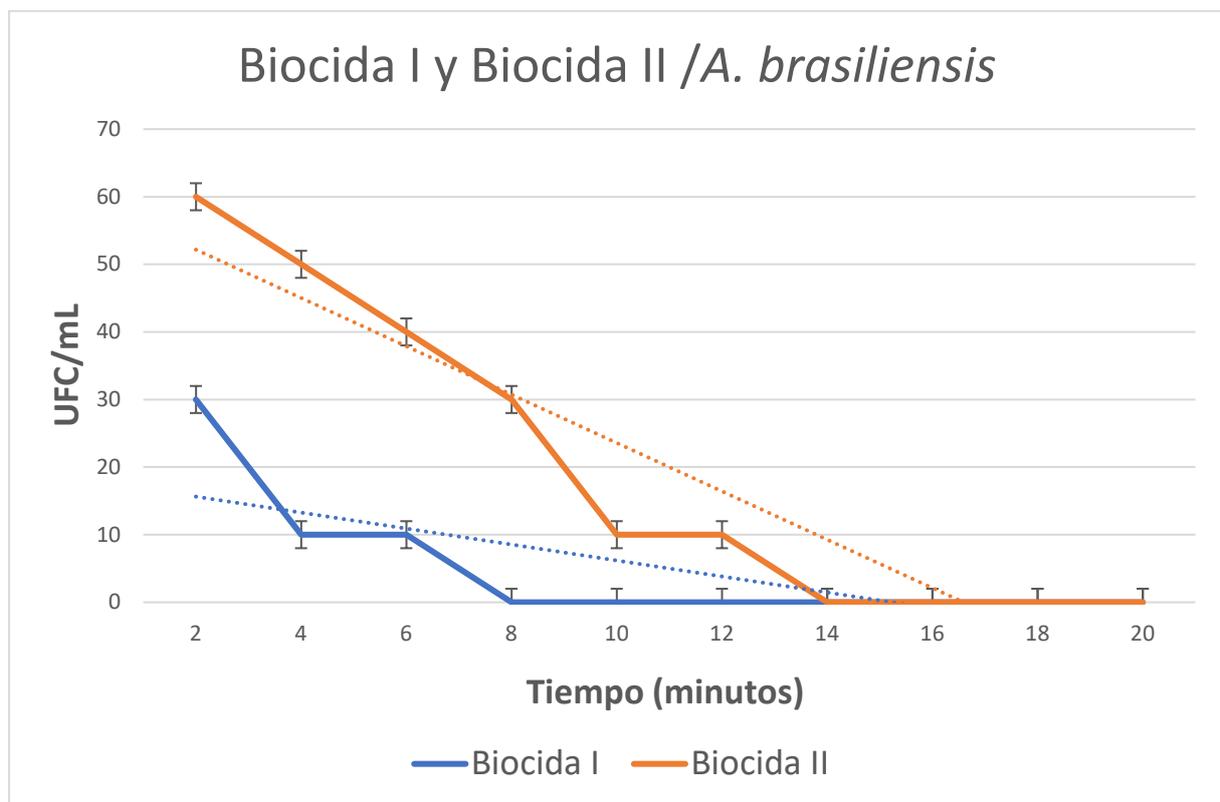


Figura n.º13 : Representación de la curva de letalidad del biocida I y del biocida II frente a *A. brasiliensis* . Los valores son la media del recuento de 3 placas

Como resumen podemos concluir que ambos biocidas son capaces de eliminar cualquier microorganismo ensayado en tiempos inferiores a los 60 minutos, utilizando dichos productos biocidas diluidos con respecto a los originales suministrados por la empresa, mediante la siembra en placa de Petri, siendo *P. aeruginosa* y *B. subtilis* los que menos tiempo necesitan para ser eliminados. Este hecho se puede justificar en la dosis de agentes biocidas que se emplea, ya que al tomar como referencia la CMB obtenida previamente, entendiéndose esta como la mínima dilución del biocida a la que los microorganismos ensayados se mueren, en condiciones óptimas y tras 18- 24 horas de incubación, en ambos casos se obtiene CMB bajas, lo que quiere decir que

los agentes biocidas están menos diluidos y por tanto el tiempo necesario para que sean efectivos es menor.

Por otro lado, *E.hirae* es la bacteria más resistente a ambos agentes biocidas, necesitando tiempos superiores a las tres horas para eliminarla cuando crece en medio líquido, y empleando una dilución igual a su CMB. Sin embargo, posee su CMB a la dilución 1/800, teniendo en cuenta que la CMB es la mínima dilución a la que los agentes biocidas eliminan al microorganismo. Esto quiere decir que los agentes biocidas son muy efectivos y eliminan al microorganismos empleando dosis bajas, pero a cambio necesitan mucho tiempo. Como se ha comentado anteriormente, cuando un agente biocida necesita mucho tiempo para eliminar al microorganismo de interés, se sigue la estrategia de aumentar la dosis de agente biocida empleando ya que nuestro objetivo es recomendar a la empresa una dosis que sea activa frente a todos microorganismos testados y que sea eficaz en un tiempo razonable para su uso real. Esta dosis será la que la empresa recomiende en su etiquetado.

5.4. Determinación de la capacidad microbiocida de los agentes biocidas sobre superficies no porosas según Normas AENOR, con modificaciones.

Para estudiar la efectividad de los agentes biocidas frente a los diferentes microorganismos, cuando se aplican sobre una superficie que se pretende higienizar, cuyas características están especificadas en la Norma AENOR anteriormente citada, se toma como referencia la CMB de biocida para cada microorganismo en concreto y se realizan ensayos a diferentes concentraciones y tiempos. En nuestro caso, y aprovechando los datos obtenidos para las curvas de letalidad, seguiremos las directrices señaladas por la Norma AENOR a la vez que algunas modificaciones, para ver si es posible agilizar el procedimiento sin alterar los resultados.

Hemos ensayado tres rangos de dosis:

- **Dosis al 2,5% v/v de los agentes biocidas originales, diluidos en agua dura estéril, como especifica la Norma AENOR.**

Cuando se aplica esta dosis sobre la superficie de ensayo inoculada, utilizando el rango de tiempo de 60 minutos, no se obtienen resultados favorables, y en todos los casos se registran altos crecimientos bacterianos y de hongos tanto en las placas utilizadas para el recuento como en las superficies. Por tanto, esta dosis se considera ineficaz, ya que no es capaz de eliminar en un tiempo razonable los microorganismos, y continuamos probando concentraciones mayores de los agentes biocidas.

➤ **Dosis al 5% v/v de los agentes biocidas originales, diluidos en agua dura estéril, como especifica la Norma AENOR.**

Cuando se aplica esta dosis sobre la superficie de ensayo, utilizando el rango de tiempo de 60 minutos, se obtienen resultados favorables sólo para *E. coli* y *S. aureus*, ya que en todos los demás casos se registran altos crecimientos bacterianos. Obviamente, para todos los microorganismos, la resistencia a ambos agentes biocidas es mayor cuando crecen sobre una superficie que cuando lo hacen en medio líquido en las placas multipocillo, donde los nutrientes y demás condiciones, les son favorables.

Como se describió en el apartado de “Material y métodos”, el efecto bactericida se determina cuantitativamente realizando determinación espectrofotométrica de los microorganismos que pueden recuperarse de la superficie de ensayo una vez han actuado los agentes biocidas (a ese valor lo llamaremos Nd), partiendo de un inóculo inicial (Nc) que también se determina espectrofotométricamente. Según la Norma AENOR, la Nc debe ser lo suficientemente alta para demostrar una reducción logarítmica decimal igual o superior a 4 para las bacterias y una reducción logarítmica decimal igual o superior a 3 para los hongos.

El resultado se expresará como reducción logarítmica ($\log_{10} R$), donde:

$$R = N_c - N_d$$

Los resultados obtenidos utilizando esta dosis son:

- Para *Pseudomonas aeruginosa*:

No se obtienen resultados positivos, ya que en todas las placas de Petri se registra un elevado número de UFC, incluso cuando los agentes biocidas han actuado durante más de 60 minutos sobre las superficies, tanto si se realiza el ensayo en condiciones “limpias” como en condiciones “sucias”.

Por tanto, se puede concluir que la dosis del 5% v/v de los agentes biocidas resulta ineficaz para controlar *P. aeruginosa* en superficie al no obtenerse reducciones $\log_{10} R$ iguales o superiores a 4

Este resultado se puede interpretar en base a que esta bacteria es la que presentó una mayor CMB, es decir, que es la que más dosis de agente biocida necesitó para ser eliminada en medio líquido.

Como se ha descrito anteriormente, *P. aeruginosa* es una bacteria que tiene bastante facilidad para formar biopelículas. Como se indica en un estudio realizado sobre *P. aeruginosa*, en el que se comprueba que su capacidad de resistencia en superficies puede ser hasta 1000 veces mayor que otras bacterias similares, debido

a su capacidad para formar biopelículas (Mah et al, 2003). Estas biopelículas permiten mantener unidas tanto las células de *Pseudomonas* como a estas con otros microorganismos diferentes y por tanto protegerse de los agentes externos como son los cambios de humedad, temperatura, acción de antibióticos y productos desinfectantes, bacteriófagos, etc., favoreciendo todo ello la supervivencia de la comunidad bacteriana. (Davey y O'toole, 2000).

- Para *E.coli* :

En el caso de *E.coli*, le hemos calculado una CMB baja en medio líquido, por tanto se sigue la estrategia de ensayar el inóculo con la dosis del 5 % v/v cada minuto, hasta los 10 minutos, como podemos observar en la Figura N.º14.

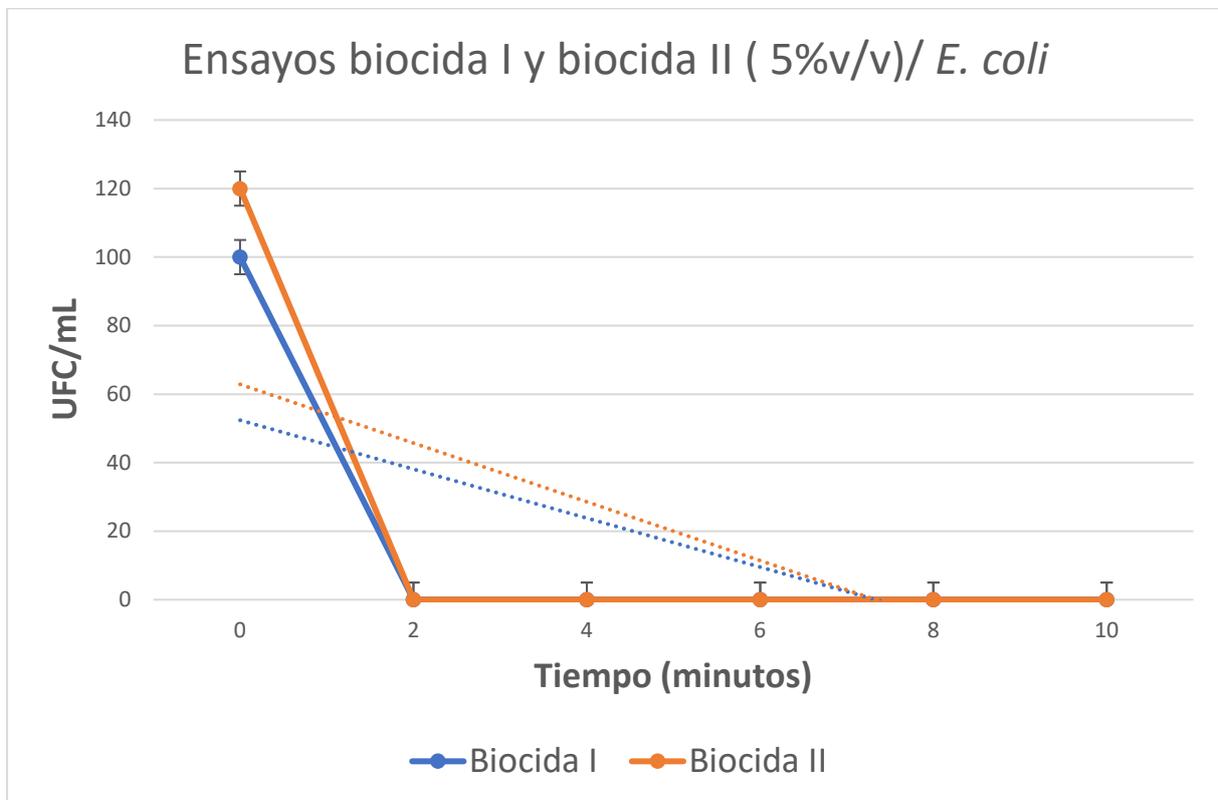


Figura n.º14 : Representación de la curva de letalidad sobre superficie de ensayo del biocida I y del biocida II frente *E. coli*. Los valores son la media del recuento de 4 placas

En este caso no se detectan UFC en los recuentos desde el minuto y en los discos no se puede recuperar ningún viable (Nd=0), por tanto, los agentes biocidas ensayados a la concentración del 5% v/v tienen una actividad bactericida superior a una reducción del $\log_{10} R=7.17$, donde $R=1.6 \times 10^7$, tanto para el agente biocida I como para el agente biocida II.

Ambos agentes biocidas son muy eficaces frente a *E.coli* en superficies, utilizando la dosis del 5% v/v , sin que se observen diferencias significativas entre los agentes biocidas ensayados a esa concentración.

- Para *S. aureus*:

En el caso de *S. aureus* se le ha calculado una CMB intermedia en medio líquido, por tanto, seguimos la estrategia de ensayar el inóculo con la dosis del 5 % v/v cada minuto, hasta los 10 minutos como podemos observar en la Figura N.º15.

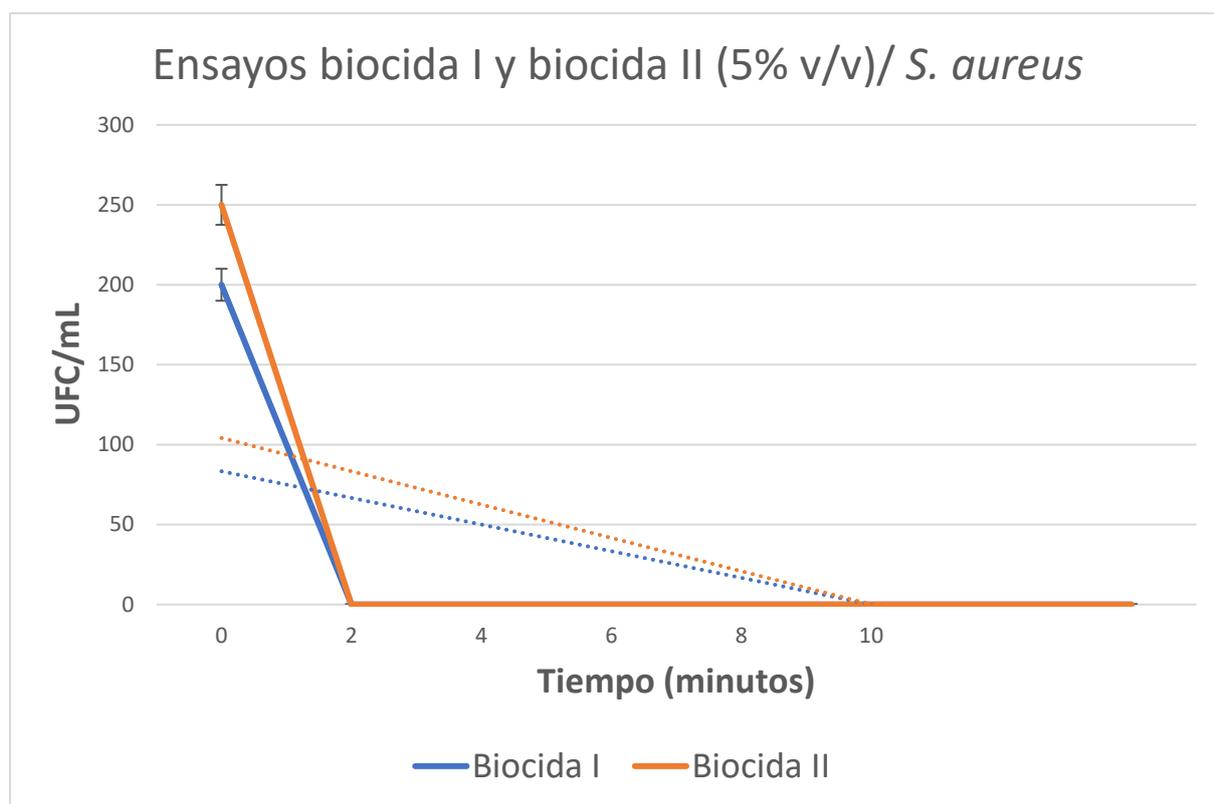


Figura n.º15 : Representación de la curva de letalidad sobre superficie de ensayo del biocida I y del biocida II frente *S. aureus* . Los valores son la media del recuento de 4 placas

En este caso tampoco se detectan UFC en los recuentos desde el primer minuto y en los discos (superficie) no se puede recuperar ningún viable (Nd=0), por tanto, los agentes biocidas ensayados a la concentración del 5% v/v tienen una actividad bactericida superior a una reducción del $\log_{10} R = 7.34$, siendo $R=2.17 \times 10^7$, tanto para el agente biocida I como para el agente biocida II.

Ambos agentes biocidas son muy eficaces frente a *S. aureus*, utilizando la dosis del 5% v/v, sin que se observen diferencias significativas entre los agentes biocidas ensayados a esa concentración.

- Para *E. hirae*:

No se obtienen resultados positivos empleando la dosis del 5% v/v como factor de dilución de los agentes biocidas, ya que en todas las placas de Petri se registra un elevado número de UFC, haciendo imposible su recuento, incluso cuando los agentes biocidas han actuado durante más de 60 minutos.

Este es un resultado esperable, ya que en medio líquido, *E. hirae* fue el microorganismo más resistente. En consecuencia, procedimos a exponerlo a la concentración del 10 % v/v como mostraremos más adelante.

- Para *B. subtilis*:

Tampoco obtuvimos resultados positivos, al 5% v/v de los biocidas, cuando se ensaya sobre superficies, obteniendo una reducción $\log_{10}R$ menor a 4, para las bacterias, como indica la Norma AENOR.

Este hecho se puede deber, como se ha indicado anteriormente, al hecho de que esta especie bacteriana es capaz de formar endosporas en condiciones adversas, siendo las endosporas una forma de resistencia muy eficaz. Al igual que en el caso anterior, procedemos a someter a *B. subtilis* al 10% v/v de los agentes biocidas, al no poder realizar el recuento de las UFC en placas.

- Para *C. albicans*:

A la dilución del 5% v/v, se obtiene el mismo resultado que en el caso anterior, cuando los agentes biocidas actuaron durante más de 60 minutos. En el caso de los hongos, la Norma AENOR indica que la reducción $\log_{10} R$ ha de ser igual o menor a 3.

Esta especie también es capaz de formar esporas en condiciones adversas, siendo las esporas una forma de resistencia bacteriana, capaz de resistir a la acción de los agentes biocidas.

- Para *A. brasiliensis*:

Finalmente, los agentes biocidas ensayados, no pudieron eliminar a *A. brasiliensis* de las superficies empleando una concentración biocida del 5% v/v, lo cual también concuerda con los resultados anteriores ya que esta especie es capaz de formar esporas en condiciones adversas, haciendo imposible el recuento de la UFC en las placas.

- **Dosis al 10% v/v de los agentes biocidas originales, diluidos en agua dura estéril, como especifica la Norma AENOR.**

En esta sección reseñaremos sólo aquellos microorganismos que resistieron a los agentes biocidas al 5% v/v ya que lógicamente tanto *E. coli*, como *S. aureus* serán sensibles a cualquier concentración mayor.

- Para *Pseudomonas aeruginosa*:

Cuando se ensaya los agentes biocidas a esta nueva dilución, en condiciones “limpias”, no se detectan UFC en los recuentos desde los primeros 5 minutos y en los discos no se puede recuperar ningún viable (Nd=0), por tanto, los agentes biocidas ensayados a la concentración del 10% v/v tienen una actividad bactericida superior a una reducción del $\log_{10} R = 7.14$, para $R=1.38 \times 10^7$, tanto para el agente biocida I como para el agente biocida II, siendo muy efectivos en tiempos inferiores a los 5 minutos.

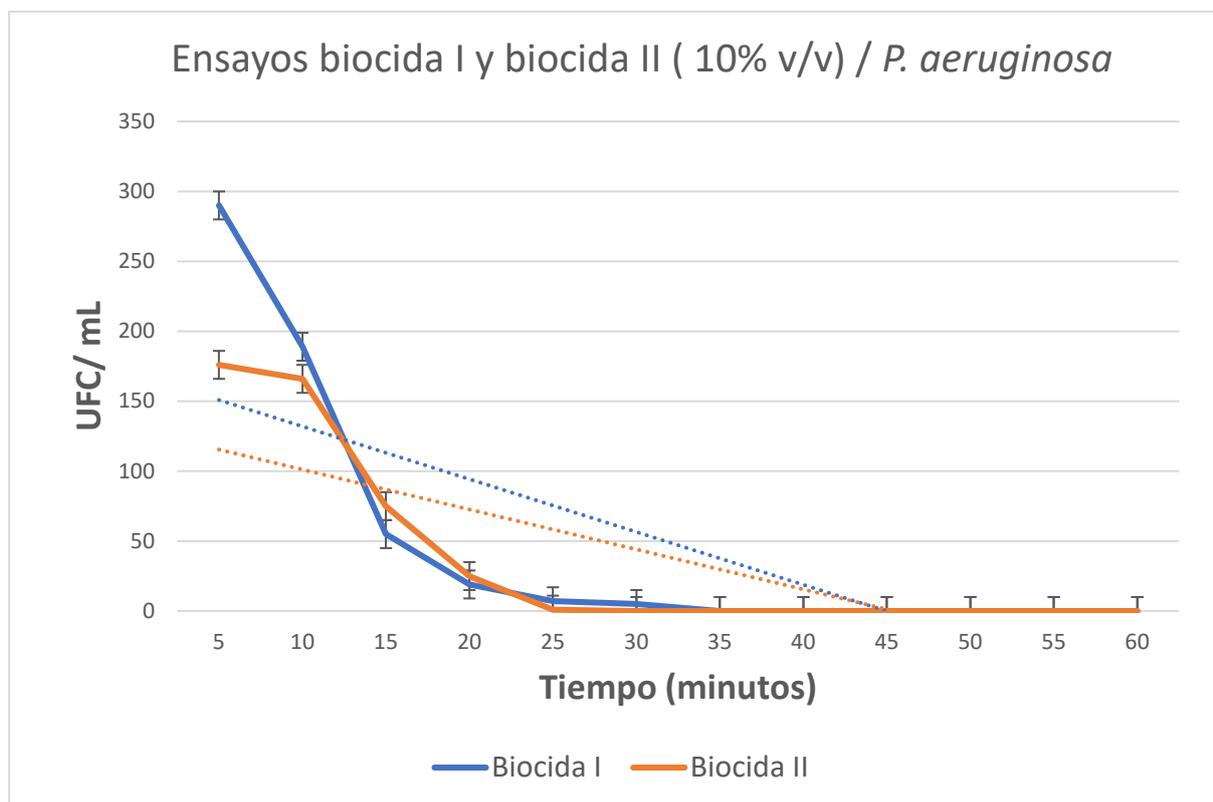


Figura n.º16 : Representación de la curva de letalidad sobre superficie de ensayo del biocida I y del biocida II frente *P. aeruginosa*. Los valores son la media del recuento de 4 placas

Pero cuando se ensaya los agentes biocidas a esta nueva dilución, en condiciones “sucias”, no funcionan igual de bien ambos agentes biocidas, de tal forma que no se detectan UFC en los recuentos desde los primeros 5 minutos y en los discos no se

puede recuperar ningún viable ($N_d=0$), para el biocida I. Por tanto, el agente biocida I tiene una actividad bactericida superior a una reducción del $\log_{10} R = 7.14$, siendo $R=1.38 \times 10^7$, siendo muy eficaz en tiempos de acción inferiores a los 5 minutos.

Sin embargo, cuando se ensaya con el agente biocida II, en dichas condiciones “sucias”, se detectan UFC/ mL en el recuento de los primeros 5 minutos con un número de colonias superior a las 330 aunque en los discos no se puede recuperar ningún viable ($N_d=0$). Es decir, el agente biocida II tiene una actividad bactericida que se corresponde con una reducción del $\log_{10} R = 1.62$, para $R=4.16 \times 10$, en los primeros 5 minutos, no siendo eficaz para tiempos inferiores a los 5 minutos. Para tiempos de acción mayores de los 5 minutos la actividad bactericida se corresponde con una reducción $\log_{10} R = 7.14$, siendo $R=1.38 \times 10^7$.

Teniendo en cuenta que los agentes biocidas ensayados están destinados a la industria alimentaria el hecho de que el agente biocida II no sea eficaz dentro de los primeros 5 minutos y en condiciones “sucias” es importante tenerlo en cuenta. Así, en el caso de las superficies de contacto con los alimentos, es importante que estas no incorporen al alimento contaminantes químicos o microbianos, de ahí que el aclarado de estas superficies sea fundamental (San José y Orgaz, 2010). Según ha descrito la bibliografía lo que sí se ha comprobado es la conveniencia de eliminar los restos de materia orgánica, ya que estas favorecen la formación de biopelículas, así como la incluyendo la eliminación de los restos de la matriz del biofilm, aunque las células en ellos contenidas ya no sean viables. Por esta razón son preferibles emplear como superficies materiales duros, que soporten los tratamientos de limpieza sin rayaduras y realizar limpiezas adecuadas de las superficies en contacto con los alimentos (San José y Orgaz, 2010).

- Para *E. hirae*:

En este caso se detectan UFC/ mL en los recuentos a partir del primer minuto y en los discos, no se puede recuperar ningún viable ($N_d=0$), siendo los recuentos obtenidos para los agentes biocidas, de la solución neutralizadora:

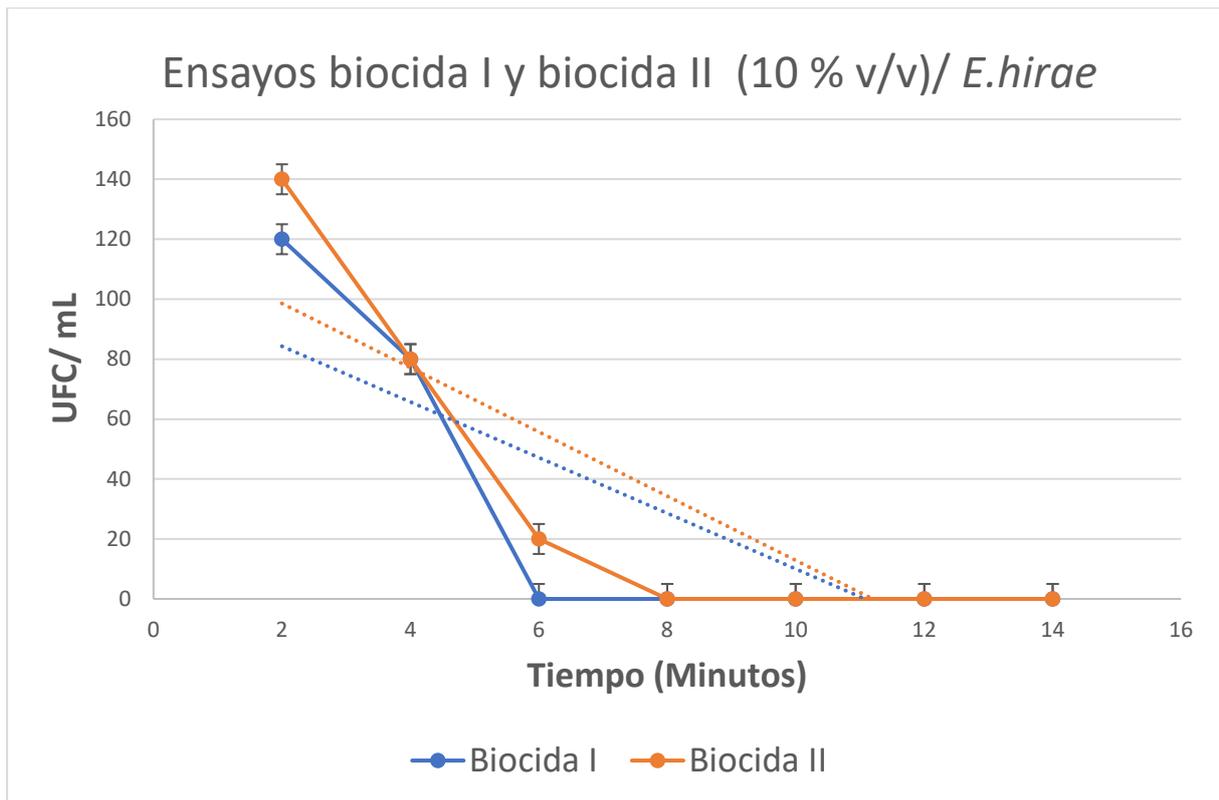


Figura n.º17 : Representación de la curva de letalidad sobre superficie de ensayo del biocida I y del biocida II frente *E.hirae*. Los valores son la media del recuento de 4 placas

Para el biocida I, frente a *E. hirae*, obtenemos una actividad bactericida que se corresponde con una reducción $\log_{10} R = 5.23$, para $R=1.7 \times 10^5$, en los primeros 4 minutos de exposición y a partir de los 5 minutos, la actividad bactericida se corresponde con una reducción $\log_{10} R = 7.14$, para $R=1.38 \times 10^7$, resultando ser muy eficaz a tiempos superiores a los 5 minutos.

En el caso del biocida II se obtiene una actividad bactericida que se corresponde con una reducción $\log_{10} R = 5.83$, para $R=6,76 \times 10^5$ en los primeros 6 minutos y a partir de los 10 minutos la actividad bactericida alcanza el valor $\log_{10} R = 7.14$, para $R =1.38 \times 10^7$, resultando tener ya una gran eficacia a tiempos superiores a los 10 minutos.

E. hirae es una bacteria Gram positiva con una gruesa pared de glucopolisacáridos, que no posee membrana externa. Aunque hasta ahora eran consideradas como poco virulentas, se ha visto que son capaces de adaptarse a vivir en ambientes hostiles, incluso en presencia de sales biliares, que actúan como inhibidores del crecimiento de las bacterias Gram positivas, y determinados detergentes como el dodecil sulfato de sodio (Flahaut et al,1996). Esta capacidad de *E. hirae*, podría permitirles vivir en presencia de regímenes ineficientes de limpieza,

contribuyendo a su persistencia y a desarrollar resistencia. De hecho, se ha visto que puede bloquear los sitios de unión de los antibióticos aminoglucósidos a su pared celular, impidiendo de esta forma la acción de estos (Hancock y Gilmore ,1998). Esto nos puede llevar a pensar que los microorganismos puedan desarrollar sistemas para evitar que los agentes biocidas se unan a su pared bacteriana y por tanto puede ser una explicación de porqué los agentes biocidas necesitan una concentración del 10 % v/v y más tiempo para eliminarlas de las superficies, a pesar de que es muy sensible a dosis bajas de los dos agentes biocidas en medio líquido.

Recomendamos el uso de los agentes biocidas estudiados a dosis al menos del 10% v/v o incluso mayores, a fin de evitar crear resistencia a éstos, a largo plazo.

- Para *B. subtilis*:

En este caso se detectan UFC/ mL en los recuentos desde el primer minuto y hasta un tiempo total de 16 minutos. En las superficies, se puede recuperar viables hasta los 6 minutos con tiempo ($2,15 \times 10^2$ UFC/ mL) (Nd). Los recuentos obtenidos para los agentes biocidas, de la solución neutralizadora se muestran en la Figura n.º18:

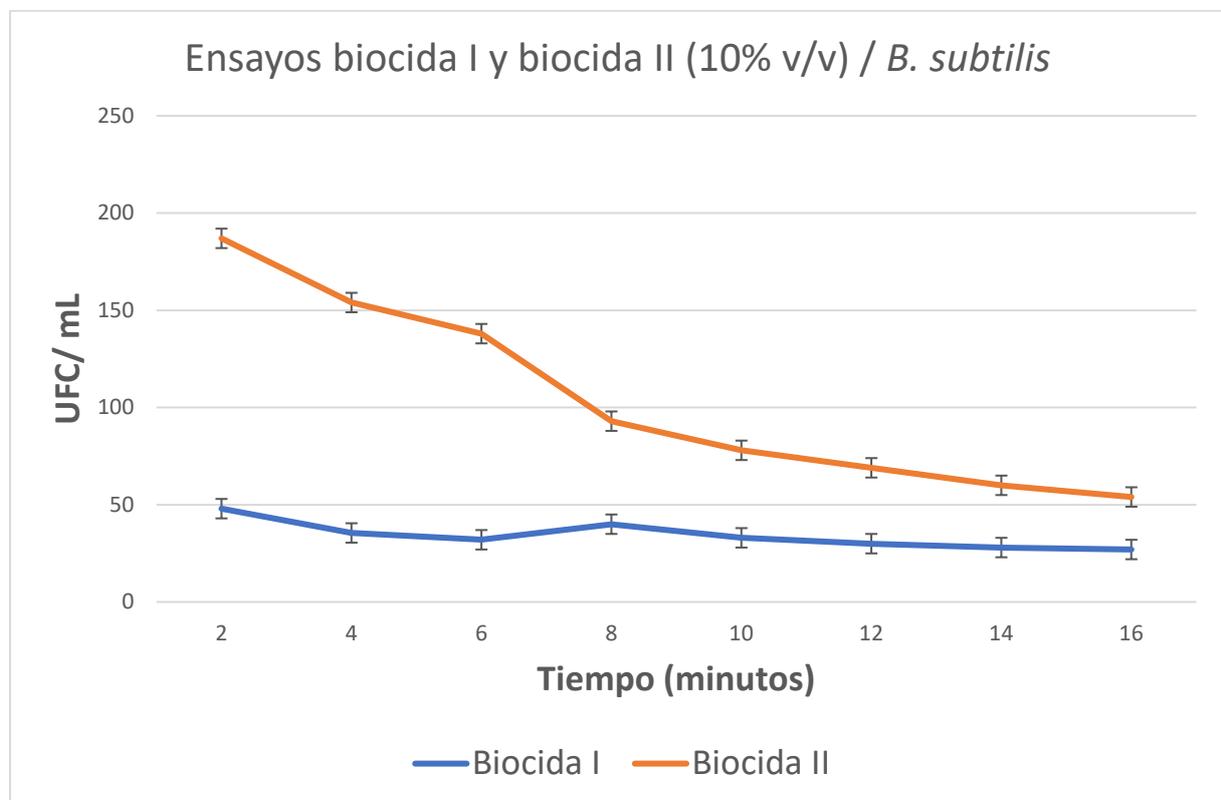


Figura n.º18 : Representación de la curva de letalidad sobre superficie de ensayo del biocida I y del biocida II frente *B. subtilis*. Los valores son la media del recuento de 4 placas

Las reducciones logarítmicas decimales obtenidas para el biocida I frente a *B. subtilis*, a los 2 minutos la reducción $\log_{10} R = 2.53$, para $R=3.39 \times 10^2$, a los 4 minutos la reducción $\log_{10} R = 2.39$, para $R=2.45 \times 10^2$ y a los 6 minutos el $\log_{10} R = 2.66$, para $R=2.57 \times 10^2$, por tanto, insuficientes según lo que establece la Norma AENOR para las bacterias. Para $t= 8$ minutos el $\log_{10} R = 5.16$, donde $R=1.45 \times 10$, que ya estaría dentro de lo recomendado por la Norma AENOR.

Las reducciones logarítmicas decimales obtenidas para el biocida II, a los 2, 4 y 6 minutos, igual que en el caso anterior, resultan insuficientes según lo que establece la Norma AENOR para las bacterias. Al igual que ocurre con el biocida I, para $t= 8$ minutos la reducción es de $\log_{10} R = 5.52$, que corresponde a $R=3.31 \times 10^5$, que ya estaría en lo recomendado por la Norma AENOR.

En este caso se puede observar cómo el agente biocida II es capaz de producir mayores reducciones en el mismo tiempo cuando se aplica a una superficie previamente inoculada.

Para tiempos mayores de exposición a los agentes biocidas, obtenemos los valores presentados en la Figura n.º19, resultando una efectividad máxima del biocida I a los 20 minutos y de 25 minutos para el biocida II.

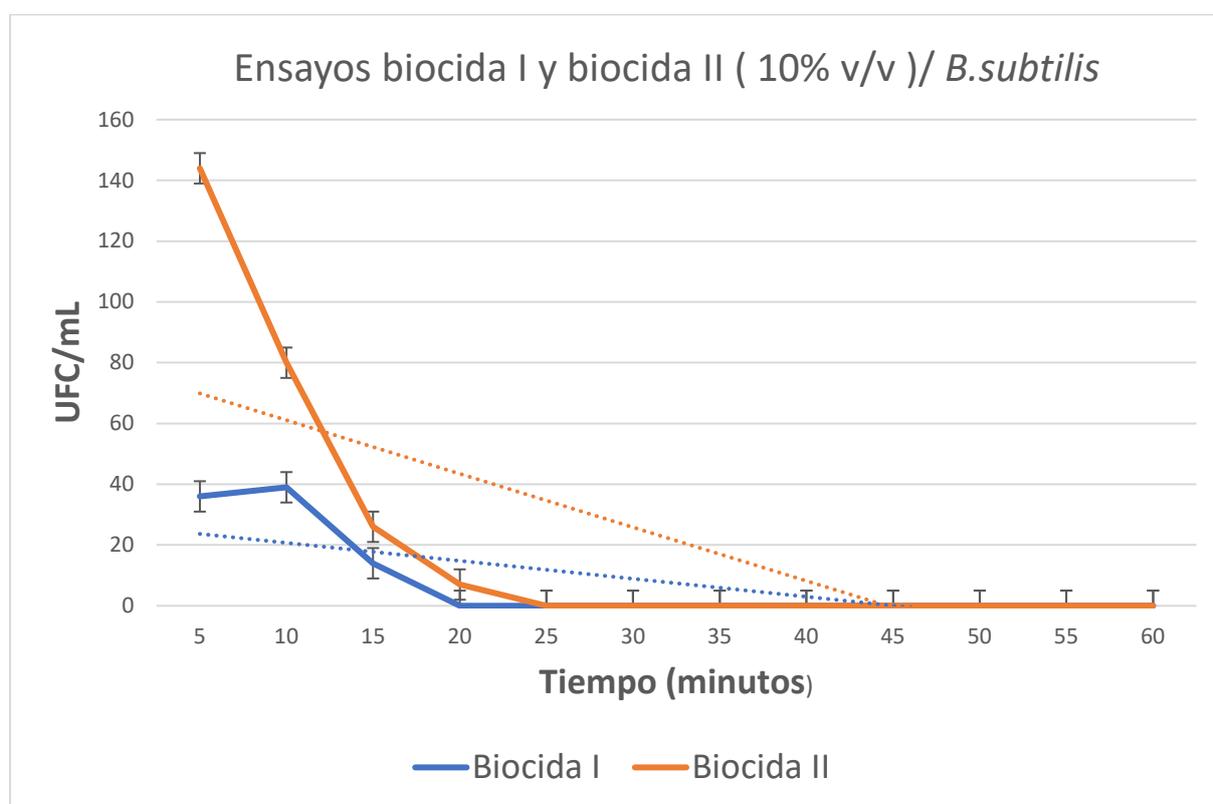


Figura n.º19 : Representación de la curva de letalidad sobre superficie de ensayo del biocida I y del biocida II frente *B. subtilis*. Los valores son la media del recuento de 4 placas

Como podemos observar, al aumentar el tiempo de contacto con los agentes biocidas, estos son capaces de llegar a reducciones $\log_{10} R = 7.13$, siendo muy eficaces a dichos tiempos.

- Para *C. albicans*:

En este caso se comienzan a detectar UFC/ mL en los recuentos, desde el primer minuto y hasta un tiempo total de 16 minutos. En las superficies se puede recuperar viables hasta los 16 minutos de tiempo (Nd=16), sólo con el biocida II. Los recuentos obtenidos para ambos agentes biocidas, tras la aplicación de la solución neutralizadora, se detallan en la Figura n.º20 :

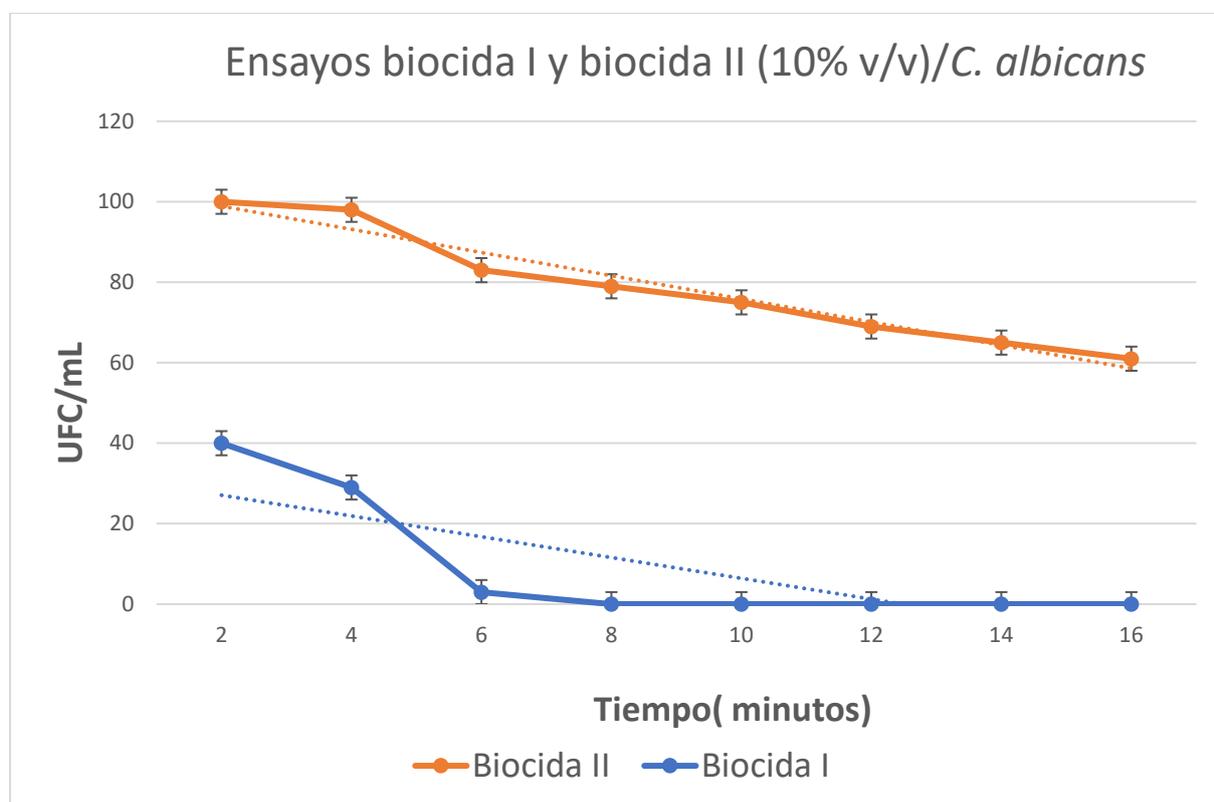


Figura n.º20 : Representación de la curva de letalidad sobre superficie de ensayo del biocida I y del biocida II frente *C. albicans*. Los valores son la media del recuento de 4 placas.

Como podemos observar el biocida I resulta de nuevo más efectivo que biocida II, no sólo porque reduce más rápido la población bacteriana, como vimos en medio líquido, sino también porque no se recuperan UFC de las superficies de ensayo.

Las reducciones logarítmicas decimales obtenidas para el biocida I, a t=2 minutos es de $\log_{10} R = 5.53$, que corresponde a $R=3.39 \times 10^5$, a t=4 minutos el $\log_{10} R = 5.66$, donde $R=4,57 \times 10^5$ y a t=6 minutos el $\log_{10} R = 6.65$, para $R=4,47 \times 10^6$. Por tanto, resulta ser muy efectivo para un tiempo 2 minutos, según lo que establece la Norma AENOR para los hongos, donde se establecen reducciones logarítmicas $\log_{10} R$ mayores o iguales que 3.

Para el biocida II, las reducciones logarítmicas obtenidas son inferiores ya que se recuperan organismos viables hasta t= 16 minutos, aunque entran dentro del rango establecido por la Norma AENOR, a un tiempo de 2 minutos. Así, a t= 2 minutos el $\log_{10} R = 3.43$, para $R=2.69 \times 10^3$, a t=4 minutos el $\log_{10} R = 3.56$, que corresponde a $R=3.63 \times 10^3$, a t=6 minutos el $\log_{10} R = 3.66$, para $R=4.57 \times 10^3$, a t=8 minutos el $\log_{10} R = 3.74$, siendo $R=5.5 \times 10^3$, a t=10 minutos el $\log_{10} R = 3.81$, para $R=6.46 \times 10^3$, t=12 minutos el $\log_{10} R = 4.06$, siendo $R=1.1 \times 10^4$, a t=14 el $\log_{10} R = 4.24$, para $R=1.74 \times 10^4$, resultando efectivo según establece la Norma AENOR para los hongos, desde un tiempo t=2 minutos.

- Para *A. brasiliensis*:

En este caso se detectan UFC/ mL en los recuentos desde el primer minuto y hasta un tiempo total de 20 minutos. En las superficies (discos) se pueden recuperar viables hasta los 10 minutos de tiempo (Nd=10), con ambos biocidas. En este caso al ser el microorganismo más resistente se requiere mayor tiempo de contacto con los agentes biocidas. Los recuentos obtenidos para ambos agentes biocidas, se representan en la Figura n.º21, resultando ser efectivos a los 25 minutos.

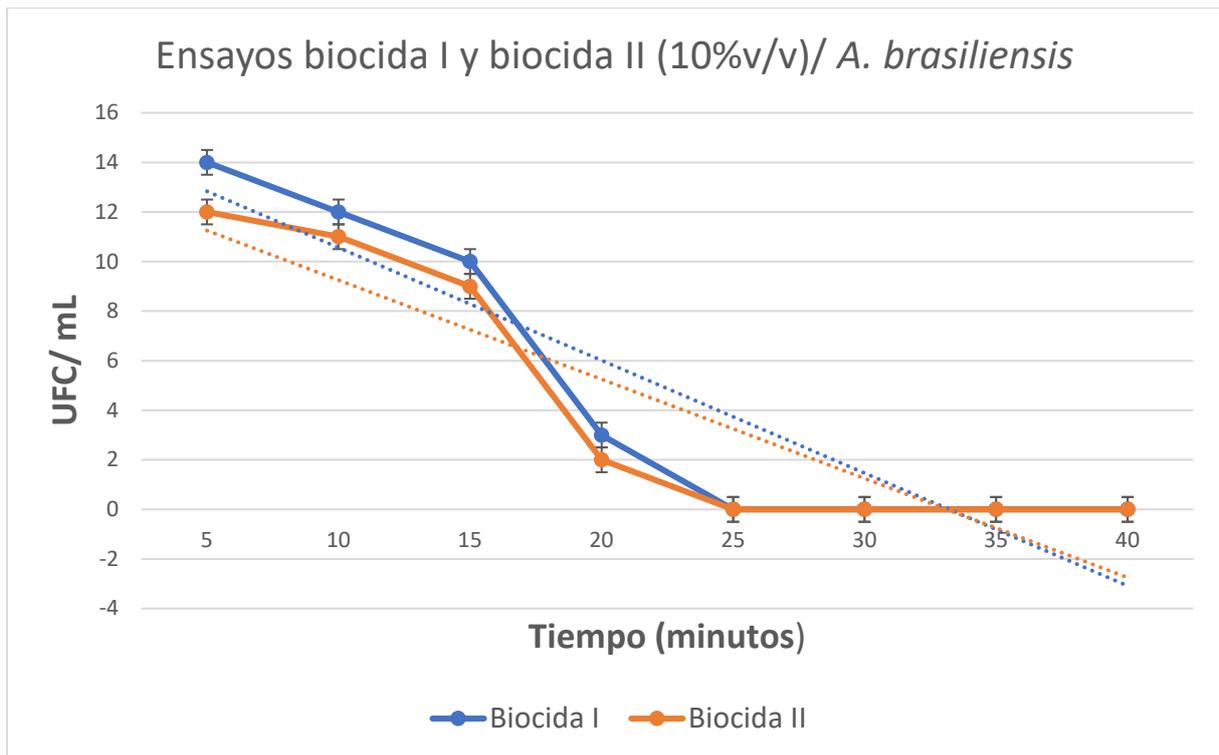


Figura n.º 21 : Representación de la curva de letalidad sobre superficie de ensayo del biocida II frente *A. brasiliensis*. Los valores son la media del recuento de 4 placas.

Como puede observarse en la Figura n.º 21 el biocida I es más efectivo que biocida II, ya que reduce más rápido la población bacteriana, pero con muy estrecho margen. Las reducciones logarítmicas decimales obtenidas para el biocida I, a t=5 minutos es el $\log_{10} R = 4.90$, que corresponde a $R=7.94 \times 10^4$, a t=10 minutos es el $\log_{10} R = 5.05$, siendo $R=1.12 \times 10^5$, a t=15 minutos es el $\log_{10} R = 6.13$, para $R=1.35 \times 10^6$ y a t= 20 minutos es el $\log_{10} R=6.65$, siendo $R=4.47 \times 10^6$, por tanto son adecuadas y muy buenas según lo que establece la Norma AENOR para los hongos, donde se establecen reducciones logarítmicas $\log_{10} R$ mayores o iguales que 3, como hemos dicho antes.

Para el biocida II las reducciones logarítmicas obtenidas han sido:

Para t= 5 minutos es $\log_{10} R=4.67$, siendo $R=4.68 \times 10^4$, a t=10 minutos es de $\log_{10} R=4.87$, para $R=7.41 \times 10^4$, a t=15 minutos es el $\log_{10} R=6.17$, para $R=1,48 \times 10^6$ y por último a t= 20 minutos es de $\log_{10} R=6.82$, para $R=6,61 \times 10^6$, por tanto son adecuadas y muy buenas a lo que establece la Norma AENOR para los hongos.

Sin embargo, estos tiempos son superiores a los deseables en un buen agente biocida, por lo que recomendamos emplear concentraciones mayores al 10% v/v en su uso práctico, a fin de evitar la aparición de resistencias a largo plazo.

Para concluir, quisiéramos reiterar que la eficacia de un agente biocida depende de la concentración a la que se emplee el agente biocida, la cantidad de materia orgánica presente en la superficie a tratar, del tipo de superficie y desde luego

del tipo y la cantidad microorganismos que estén presentes (Gava-Mazzola et al, 2009). Pero además de lo anterior, otro factor a tener en cuenta es el tiempo de contacto entre el agente biocida y la superficie a tratar. El hecho normal es que al aumentar las concentraciones en que se emplean los agentes biocidas, los tiempos sean menores (Holah, 1995). Esto es un hecho muy importante a la hora de prescribir el “MODO DE EMPLEO” en el etiquetado del producto.

En el presente estudio hemos obtenido que en la superficie *P.aeruginosa* es la forma más resistente a los biocidas ensayados, necesitando para ser eliminado concentraciones del 10% v/v en condiciones “sucias”. Esto es debido a que esta bacteria en ambientes húmedos es capaz de formar biopelículas sobre las superficies y además para crecer solo necesita moléculas simples, sin necesidad de medios enriquecidos (Hauser, 2019). Además, como se indica en un estudio realizado sobre *P.aeruginosa* (Mah et al, 2003), se comprueba que su capacidad de resistencia en superficies puede ser hasta 1000 veces mayor que otras bacterias similares, debido a la capacidad que tiene este microorganismo de formar biopelículas.

P. aeruginosa es una bacteria Gram negativa que posee una membrana externa formada por lipopolisacáridos (LPS) que están presentes formando parte de las proteínas de porina, a través de las cuales se realiza el transporte de sustancias al interior de la bacteria. Esta porina difiere de las que presentan otras bacterias de la familia de las *Enterobacteciae*, entre las que se encuentra *E.coli*, en que presentan menos permeabilidad a una gran variedad de moléculas, incluyendo antibióticos y por tanto también a los biocidas (Ryan, 2002).

Por otra parte, *B. subtilis* es uno de los microorganismos que menos dosis de biocida ha necesitado para morir en medio líquido, sin embargo, el tiempo de acción que se necesita para ambos agentes biocidas es elevado, a pesar de que *B. subtilis* es una bacteria Gram positiva. La explicación puede estar en que esta bacteria puede formar endosporas cuando las condiciones les son desfavorables, como se ha dicho antes.

En lo que respecta a los hongos, cabe destacar que el principal problema de estos microorganismos es que puedan formar las esporas, que son las formas de mayor resistencia. En nuestro caso, *Aspergillus* ha sido más resistente a la acción del biocida que *Candida* ya que los conidios de *Aspergillus* le proporcionan un buen mecanismo de resistencia al calor, la acción de biocidas y antibióticos (Hauser, 2019). Cuando se ensaya frente a los biocidas de éste estudio de se produce una acción bactericida importante, siendo igualmente más efectivo el biocida II. Como la spora es la estructura que le confiere el poder de resistencia, se puede suponer que los biocidas puedan actuar impidiendo la formación de estas esporas y por tanto actuando en la fase vegetativa del hongo en la cual es más sensible.

6. CONCLUSIONES

- 1.-Las empresas de certificación oficial de la eficacia de un agente biocida sólo efectúan los análisis a dos concentraciones de dicho agente, al 0% y al 100%, lo cual dificulta y encarece enormemente hallar la concentración más efectiva de dicho biocida, frente a cada uno de los microorganismos patógenos de estudio.
- 2.-Para conocer la concentración mínima efectiva de un agente biocida, es decir, el Factor de Dilución al que debe utilizarse, es preciso calcular primero los valores de la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) y de la CMB (Concentración Mínima Bactericida) frente a cada uno de los microorganismos normalizados para su uso en la industria alimentaria.
- 3.-El empleo de placas multipocillo permite hallar la CMI y CMB de un agente biocida, para cualquier microorganismo, de forma económica, rápida y muy precisa, por lo que resulta el procedimiento más recomendable para obtener estos valores.
- 4.-Dado que el fin último del estudio de la efectividad de un biocida destinado a higienizar superficies industriales del sector alimentario, es conocer la CMB y el tiempo necesario para alcanzarla (curva de letalidad) sobre una superficie normalizada, hemos recurrimos a la Norma UNE-EN-13697:2015+A1 para conocer ambas cuestiones.
- 5.-El seguimiento literal de la Norma UNE garantiza que los resultados obtenidos sean compatibles con alcanzar la certificación oficial de la eficacia de cualquier agente biocida, sin embargo es un proceso largo, tedioso y hasta farragoso en alguna de sus fases.
- 6.-Con el fin de facilitar el protocolo de evaluación de la efectividad de un agente biocida dado y reducir los tiempos de obtención de resultados, hemos comparado la metodología descrita en la citada Norma UNE con varias modificaciones realizadas por nosotros, obteniendo resultados comparables con los del seguimiento literal de la Norma UNE, al menos para los microorganismos normalizados para la higienización industrial de superficies, lo cual permitirá reducir el tiempo de trabajo sin perjuicio de la finalidad última de los objetivos marcados.
- 7.-Para el caso concreto de los dos agentes biocidas evaluados, hemos obtenido que ambos tienen un comportamiento muy diferente si actúan frente a microorganismos creciendo en superficies. Así, en medio líquido el biocida I presenta una mayor eficacia que el biocida II para un gran número de los microorganismos ensayados y en todos los casos, ambos biocidas necesitan una concentración menor para alcanzar se efectividad máxima.
- 8.- Sobre una superficie de acero inoxidable 304, los dos agentes biocidas evaluados necesitan una concentración mayor para tener eficacia y presentan unos tiempos de

acción similares, y un factor de dilución también semejante, pudiendo reducir rápidamente la carga microbiana de patógenos de las superficies, como *E. coli* y *E. aureus* (a partir de 2 minutos), *E. hirae* (de 4 minutos) y *P. aeruginosa* (de 5 minutos).

9.-En todos los casos, *B. subtilis* sobre superficie, ha resultado ser el microorganismo más resistente y por tanto el que ha determinado el factor de dilución máximo al que el biocida presenta eficacia.

10.-El factor de dilución al que ambos biocidas presentan una efectividad del 100 % frente a todos los microorganismos testados en superficies, es del 10 % v/v, sin embargo, en algunos casos se han necesitado dilatados tiempos de acción de hasta 25 minutos para eliminar todas las UFC de las superficies, concretamente para *B. subtilis* y *A. brasiliensis*, por lo tanto recomendamos el uso de los agentes biocidas a concentraciones superiores a fin de evitar la aparición de resistencia a los mismos, a medio o largo plazo.

7. RECURSOS BIBLIOGRÁFICOS

7.1. Libros, revistas y artículos científicos

- Becerra, G.,** Plascencia, A., Luévanos, A., et al. (2009) Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Enfermedades Infecciosas Microbiológicas* 29(2):70-76.
- Bravo, Z.,** Orruño, M., Navascues, T., Ogayar, E. Ramos-Vivas, J. Kaberdin, V.R., Arana, I. (2019) Analysis of *Acinetobacter baumannii* survival in liquid media and on solid matrices as well as effect of disinfectants. *Journal Hospital Infection* 103(1): e42-e52. Doi: 10.1016/j.jhin.2019.04.009.
- Chacón-Jiménez, L. y** Rojas-Jiménez, K. (2020) Resistencia a desinfectantes y su relación con la resistencia a los antibióticos (Resistance to disinfectants and their relationship with antibiotic resistance). *Acta Médica Costarricense*, Vol.62 (1), p.7-1. ISSN: 0001-6002
- Chaplin, C.E.** (1952) Bacterial resistance to quaternary ammonium. *Journal of Bacteriology*, 63(4):453-8. Doi: 10.1128/jb.63.4.453-458.1952.
- Criado, M.A.** (2018) España, el país avanzado que más antibióticos consume. Artículo *El País*, sección Ciencia, 26 de marzo.
- Davey, M.E. y** O'toole, G.A. (2000) Microbial biofilm: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4): 847–867. Doi: 10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000.
- Falco Restrepo, A.D.,** Aranaga Arias, C.A. (2015) Resistencia a los antibióticos beta-lactámicos Carbapenems mediada por el gen blaKPC en *Klebsiella pneumoniae*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, Vol.6 (2), p.10.
- Flahaut, S.,** Frere, J., Boutibonnes, P. y Auffray, Y. (1996) Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*. *Appl Environ Microbiol* ,62(7):2416-20. Doi.org/10.1128/aem.62.7.2416-2420.1996
- Flórez, J.,** Armijo, J.A. y Mediavilla, A. (1992) *Farmacología humana*. 2ª ed. Barcelona: Masson-Salvat Medicina. Sección XII.
- Gander, S.** (1996) Bacterial biofilms: resistance to antimicrobial agents. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 37(6):1047-50. Doi: 10.1093/jac/37.6.1047.
- García-Vidal, C. y** Carratalá, J. (2012) Patogenia de la infección fúngica invasora. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, Vol.30 N° 3. Pag. 151-158. Doi: 10.1016/j.eimc.2011.09.011

- Gava-Mazzola, P., Faustino-Jozala, A., Moriel, P. y Vessoni-Penna, T.C. (2009)** Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and / or sterilizing agent. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*,45(2):241-8. Doi.org/10.1590/S1984-82502009000200008
- Gilbert, P. y McBain, A.J. (2003)** Impacto potencial del mayor uso de biocidas en productos de consumo sobre la prevalencia de la resistencia a los antibióticos. *Revisiones de microbiología clínica*, 16 (2), 189–208. Doi.org/10.1128/CMR.16.2.189-208.2003
- Gilbert, P. y Moore, L.E. (2005)** Cationic antiseptics: Diversity of action under a common epithet. *Journal applied microbiology*, 99: 703–15. Doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x
- Gots, R.E., Layton,N.J. & Pirages,S.W. (2010)** Indoor Health: Background Levels of Fungi, 427-438. Doi.org/10.1080/15428110308984836
- Grace, D. (2015)** Review of evidence on antimicrobial resistance and animal agriculture in developing countries. London, UK: Department for International Development. Doi.org/10.12774/eod_cr.june2015.graced.
- Graham, J.P., Price, L.B., Evans, S.L., Graczyk, T.K., Silbergeld, E.K. (2009)** Antibiotic resistant enterococci and staphylococci isolated from flies collected near confined poultry feeding operations. *Science of Total Environ*, 407:2701–10.
- Gram, L., Bagge, D., Ng, Y., Gymoese, P. y Vogel, BF (2007)** Influencia de la matriz de suciedad de los alimentos en la eficiencia de limpieza y desinfección de *Listeria monocytogenes* adherida a la superficie. *Control de alimentos*, 18 (10), 1165-1171. Doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.06.014
- Grönholm, L., Wirtanen, G., Ahlgren, K., Nordström, K., & Sjöberg, A. M. (1999)** Screening of antimicrobial activities of disinfectants and cleaning agents against foodborne spoilage microbes. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-forschung A*, 208(4), 289-298. Doi.org/10.1007/s002170050419
- Hall-Stoodley, L., & Stoodley, P. (2009)** Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular microbiology*, 11(7), 1034-1043. Doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x
- Hancock, L.E. y Gilmore, M.S. (1998)** Pathogenicity of Enterococci. Department of Microbiology and Immunology. Oklahoma: University of Oklahoma Health Sciences Center; pp. 251-8. Doi.org/10.1128%2Fmicrobiolspec.GPP3-0053-2018
- Hauser,R.A. (2019)** Manual de antibióticos. 3ª edición.Barcelona :Wolters Kluwer.
- Hernández, B., Corcuera, M.T., Gómez-aguado, F., Domínguez, P., Simón, F., Lorenzo, M.I. (2016)** Microbiología Clínica. Editorial Altamar.

- Holah, J.** (1995) Special needs for disinfectants in food-handling establishments. *Revue scientifique et technique. Rev Sci Tech.* Mar;14(1):95-104. Doi: 10.20506/rst.14.1.825.
- Jacobsen, S.M., Stickler, D.J., Mobley, H.L., Shirliff, M.E.** (2008) Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev.* Jan;21(1):26-59. Doi: 10.1128/CMR.00019-07
- Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., Brooks, G. F., Butel, J. S., Ornston, L. N., & Carsolio Pacheco, M. D. R.** (1992) *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg.* El Manual Moderno. México, D.F.
- Klein, E.Y., Van Boeckel, T.P., Martínez, E.M., Suraj, P., Gandra, S., Levin, S.A., Goossens, H. y Laxminarayan, R.** (2018) Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *PNAS*, 26 de marzo, 115 (15) E3463-E3470. Doi/full/10.1073/pnas.1717295115
- Li, XZ., Livermore, DM., Nikaido, H.** (1994) Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 38(8):1732-41. Doi: 10.1128/AAC.38.8.1732.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H. y Stahl, D.A.** (2014) *Biología de los microorganismos.* Pearson. 14^a ed. Madrid.
- Mah, T.F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewart, P.S., O'Toole, G.A.** (2003) A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*. 20;426(6964):306-10. Doi: 10.1038/nature02122.
- Mathers, A.J., Peirano, G. y Pitout, J.D.** (2015) The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology Review*, 28:565-591.
- Ndimpalli, M., Delarocque-Astagneau, E., Love, D.C., Price, L.B., Huynh, B.T., Collard, J.M., Lay, K.S., Borand, L., Ndir, A. y Walsh, T.R.** (2018) Combating Global Antibiotic Resistance: Emerging One Health Concerns in Lower- and Middle-Income Countries. *Clinical Infectious Diseases*, Volume 66, Issue 6, 963–969. Doi.org/10.1093/cid/cix879.
- O'Neill Commission** (2016) *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations.* Review on Antimicrobial Resistance, London. <https://amr-review.org>
- O'Neill, J.** (2015) *Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste.* London, UK. <https://amr-review.org>

- Ocares, Y.** y Castro, J.F. (2020) Preservación de microorganismos por congelación. Chillan: Boletín INIA-Instituto de Investigaciones Agropecuarias. N° 428.PP 119-134.
- Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, J.C.** (2015) The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat.* 21-22: 41-59. Doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.002.
- Oteo, J.** (2019) Comprendiendo la resistencia a los antibióticos. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. RIECS vol.4 Núm.2. Doi.org/10.37536/RIECS.2019.4.2.164
- Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., Larsson, DGJ.** (2015) Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics.* 6:964. Doi: 10.1186/s12864-015-2153-5.
- Pasachova, J., Ramírez, S. y Molina, L.M.** (2019) *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova,* 17(32), 25-38. Doi.org/10.25058/24629448.3631.
- Perry, J., Waglechner, N. y Wright, G.** (2016) The prehistory of antibiotic resistance. *Cold Spring Harb Perspect. Med.* Jun 1;6(6). Doi: 10.1101/cshperspect.a025197.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. y Klein, D.A.** (2008) *Microbiología.* Madrid .7ª edición. McGraw-Hill Interamericana.
- Rodríguez Martínez, Claudio, & Zhurbenko, Raisa, & Díaz Pérez, Marilyn** (2010) Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología,* 48 (2),147-161. ISSN: 0253-1751.
- Rodríguez-Ángeles, G.** (2002) Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública Mex,* 44:464-475. <http://www.insp.mx/salud/index.html>
- Ruiz, J.** (2021) Viajeros y enfermedades infecciosas: un problema bidireccional. 171. *Enfermedades Emergentes,*20(3):171-173.
- Ryan, K. J. y Ray, C.G.** (2011) *Sherris: microbiología médica.* 5ª ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana.
- San José, C., & Orgaz, B.** (2010) Las biopelículas microbianas, un búnker de uso habitual. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.* <https://www.researchgate.net/publication/277729109>
- Schweizer, H.P.** (2001) Triclosan: a widely used biocide and its link. *FEMS Microbiol Lett ;* 202: 1–7. Doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10772.x .

- Seral, C., Gude, M. J. & Castillo, F. J. (2012)** Emergencia de β -lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinasas): origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. *Revista Española de Quimioterapia*, 25(2).
- Vallejo, M., Parada, R.B. y Marguet, E.R. (2020)** Aislamiento de cepas de *Enterococcus hirae* productoras de enterocinas a partir del contenido intestinal de mejillón patagónico (*Mytilus edulis platensis*). *Revista Argentina de Microbiología*, Volume 52, pg 136-144. Doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.001
- Wessels, S., Ingmer, H. (2013)** Modes of action of three disinfectant active substances: A review. *Regulatory toxicology pharmacology journal*, 67: 456–67. Doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.09.006.
- White, D. y McDermott, P. (2001)** Biocides, drug resistance and microbial evolution. *Current Opinion in Microbiology*, Volume 4, Issue 3, Pages 313-317, ISSN 1369-5274. Doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00209-5.

7.2. Normativas y otros textos

Norma UNE-EN-13697:2015+A1: Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de superficies no porosas para la evaluación de la actividad bactericida y/o fungicida de los desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en colectividad. Método de ensayo sin acción mecánica y requisitos (septiembre-2020)

7.3. Páginas web

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). “Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de resistencias a los antibióticos”. Disponible en:

<https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/otrosdeinteres/seimc-dc-2015-plan-estrategico-antibioticos.pdf>

Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). (2011). Instrucciones de Seguridad para el Manejo de Microorganismos. Universidad de Valencia. Disponible en:

https://www.uv.es/cect2/59 Instrucciones_seguridad

Ministerio de Sanidad. Disponible en:

https://www.sanidad.gob.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/prodQuimicos/sustPreparatorias/docs_biocidas/introduccion.htm

Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales España, Instituto de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Ficha de agentes biológicos. (2021). Disponible en: <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/aspergillus-spp>

Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales España, Instituto de Seguridad e Higiene en el Trabajo. (2001). Prevención del riesgo biológico en el laboratorio: trabajo con bacterias (NTP 585). Gobierno de España. Disponible en: https://www.insst.es/documents/94886/327064/ntp_585.pdf/8b622baa-4fbe-43f4-a796-bc15d2ce0282

Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales España, Instituto de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Ficha de agentes biológicos. (2016). Disponible en: <https://www.insst.es/documents/94886/353495/Pseudomonas+aeruginosa+2017.pdf/7e1ed73b-eca5-4578-a4f7-1c8847e6a799>

Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales España, Instituto de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Ficha de agentes biológicos. (2012). Disponible en: <https://www.insst.es/documents/94886/353495/Staphylococcus+aureus.pdf/0f7074f1-f1d4-441e-b808-edd4523c9fae?version=1.0&t=1528734434245>

Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales España, Instituto de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Ficha de agentes biológicos. (2021). Disponible en: <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/candida-albicans>

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2020) Resistencia a los antimicrobianos. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (Consultado el 15-4-2022)

Plan Nacional de Resistencia a los antibióticos. Gobierno de España. Disponible en: <https://resistenciaantibioticos.es/es/lineas-de-accion>

Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) Revista científica. (2018). Disponible en: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1717295115>

Clasificación de los aceros inoxidables. Características y aplicaciones más comunes. <https://www.bonnet.es/clasificacionacerinox.pdf>. Disponible en: <https://www.bonnet.es/> . (Consultado el 24-5-2022)

